



**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA**

Vinculada ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária - MARA

**CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA - CNPSO**

Rodovia Carlos João Strass (Londrina/Warta) Acesso Orlando Amaral

Caixa Postal, 1061 - Telefone: (043) 320-4166 - 320-4150

Telex: (432) 208 - Fax: (043) 320-4186

CEP: 86.001-970 - Londrina, PR.

# PESQUISA EM ANDAMENTO

Nº 15, jul/93, p.1-13

## EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N<sub>2</sub> E CAPACIDADE COMPETITIVA DAS ESTIRPES SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 E SEMIA 5080 INOCULADAS EM SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)

Eficiencia da fixacao

1993

FL - 4242



2139-1

Catalina Yumi Masuda Nishi<sup>1</sup>  
Mariangela Hungria<sup>2</sup>

ATENÇÃO: Resultados provisórios, sujeitos a confirmação

### Introdução

O interesse mundial na soja é, em grande parte, devido ao seu teor protéico elevado, de cerca de 40%. Um componente químico essencial das proteínas é o N, cuja demanda é bastante elevada pela cultura, que normalmente acumula entre 100 e 200 kg de N/ha. O N necessário ao crescimento da soja pode ser obtido a partir da absorção do N do solo, da decomposição da matéria orgânica, ou dos fertilizantes nitrogenados adicionados ao solo. Mas esse N também pode ser obtido através do processo da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>), realizado por algumas bactérias da espécie *Bradyrhizobium japonicum*, que convertem o N<sub>2</sub> a uma forma que pode ser utilizada eficazmente pela planta. Esse processo biológico permite que uma maior parcela dos nutrientes necessários ao crescimento da soja seja fornecido pelas bactérias, deixando de retirar o N do solo e diminuindo a necessidade de fornecimento de fertilizantes nitrogenados. Isso implica em um menor custo de produção para o agricultor, na diminuição dos problemas de poluição ambiental associados ao uso intensivo de fertilizantes e auxilia a conservação da fertilidade do solo.

Dentro da espécie *B. japonicum*, existem diversas estirpes, que variam quanto à eficiência do processo de fixação do N<sub>2</sub>. A avaliação e seleção de estirpes de *B. japonicum* mais eficientes para a soja vêm sendo feitas desde os primórdios da introdução dessa cultura no Brasil (Döbereiner et al. 1970), mas ainda existe um grande potencial para incrementar os níveis de produtividade dessa cultura via fixação biológica do N<sub>2</sub> (Scotti et al. 1981; Peres et al. 1984; Neves et al. 1985; Vargas et al. 1992b).

Embora seja possível obter estirpes mais eficientes através de seleção ou de modificações genéticas (Maier & Brill 1978; Albrecht et al. 1979; Zablutowitz et al. 1980; Hanus et al. 1981; Williams & Phillips 1983; Peres et al. 1984; Kaneshiro & Kwolek 1985; Maier & Graham 1990), o estabelecimento dessas bactérias no campo é extremamente difícil, devido à baixa competitividade com as estirpes nativas ou naturalizadas do solo (Triplet 1990a). Weaver & Frederick (1974), por exemplo, verificaram que para formar 50% dos nódulos, o número de células bacterianas do inoculante tem que ser 1000 vezes superior ao número de bactérias do solo.

<sup>1</sup> Biomédica, bolsista do CNPq, aluna de mestrado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

<sup>2</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, Ph.D.. EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO). Cx. Postal 1061, CEP 86.001-970. Londrina, PR.





Diversos laboratórios têm concentrado seus esforços na identificação dos fatores que influenciam a capacidade competitiva das bactérias. Alguns exemplos incluem a mobilidade e quimiotaxia (Mellor et al. 1987; Caetano-Anollés et al. 1988ab; Liu et al. 1989; Wadisirisuk et al. 1989; Catlow et al. 1990ab; Thies et al. 1991; Zdor & Pueppke 1991), polisacarídeos da superfície celular (Bagwat et al. 1991; Zdor & Pueppke 1991), produção de bacteriocina (Tripllett 1990b), taxa de infecção (Hahn & Hennecke 1988; McDermott & Graham 1990), capacidade de responder a diversos substratos (Bottomley et al. 1990), taxa de crescimento em substratos de solos (Viteri & Schmidt 1987), eficiência da estirpe em formar nódulos (McDermott & Graham 1990), entre outros. As respostas, porém, são variadas, e pouco se sabe sobre as características genéticas que determinam a capacidade competitiva das estirpes (Bhagwat & Keister 1992). Há indicações, ainda, de que a seleção para maior atividade de fixação do  $N_2$  possa conduzir simultaneamente à seleção para maior habilidade competitiva (Oliveira & Graham 1990).

Nos solos brasileiros, dominam os sorogrupos das estirpes SEMIA 566, SEMIA 5019 (29w) e SEMIA 587, que foram ou são usadas nos inoculantes comerciais. Devido ao uso prolongado da estirpe SEMIA 566, que é muito competitiva e foi recomendada comercialmente de 1966 a 1978, ela se estabeleceu em grande parte dos solos cultivados com soja, particularmente no sul do país. Outra estirpe, a SEMIA 586 (CB 1809, proveniente da Austrália), é muito eficiente (Döbereiner et al. 1970; Neves et al. 1985), mas apresenta baixa capacidade competitiva, além de formar poucos nódulos com a cultivar IAC-2 (Peres, 1979).

Na EMBRAPA-CPAC foram obtidas duas variantes das estirpes SEMIA 566 e SEMIA 586, que, além de permitir ganhos de produção, representam uma fonte de material genético promissora para entender os mecanismos ligados à eficiência e competitividade de *B. japonicum*. A estirpe SEMIA 5080 (CPAC 7) foi obtida através de uma subcultura da SEMIA 586, mas que é caracterizada por apresentar boa capacidade competitiva, além de maior nodulação da cultivar IAC-2. A estirpe SEMIA 5079 (CPAC 15) foi isolada de um solo na região do Distrito Federal, e pertence ao mesmo sorogrupo da SEMIA 566, embora se caracterize por uma maior eficiência de fixação do  $N_2$  (Vargas et al. 1992b).

As estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 têm sido testadas há sete anos nos solos do cerrado, onde promoveram ganhos de rendimento de até 12,5 sacos de soja/ha (756 kg/ha), em solos de primeiro cultivo, em relação ao tratamento sem inoculação, enquanto que as estirpes recomendadas comercialmente, SEMIA 587 e SEMIA 5019 (29w), promoveram aumentos médios de 7 sacos/ha (426 kg/ha) (Vargas et al. 1992a). A partir de 1992, essas duas estirpes passaram a ser recomendadas para utilização nos inoculantes comerciais brasileiros, mas investigações mais detalhadas sobre essas bactérias precisam ser conduzidas.

Neste trabalho, foram realizados estudos procurando entender os mecanismos ligados à eficiência e competitividade dos pares de estirpes SEMIA 566 x SEMIA 5079 e SEMIA 586 x SEMIA 5080, identificando-se os passos iniciais de infecção, as taxas de competitividade e fixação do  $N_2$  em condições estéreis e a nível de campo e alguns parâmetros fisiológicos dessas simbioses.

## Materiais e Métodos

### Estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*

SEMIA 566 - Estirpe isolada de inoculante americano no IPAGRO, RS, em 1966, sendo recomendada comercialmente até 1978.

SEMIA 586 ou CB 1809 - Isolada no CSIRO, Austrália, e enviada para o Brasil em 1966.

SEMIA 5079 ou CPAC 15 - Estirpe pertencente ao sorogrupo da SEMIA 566 e isolada na região do Distrito Federal, pela EMBRAPA-CPAC. Estirpe com elevada eficiência de fixação do  $N_2$ .

SEMIA 5080 ou CPAC 7 - Subcultura da CB 1809, mas é uma estirpe bastante competitiva, além de nodular a cultivar IAC-2. Obtida pela EMBRAPA-CPAC.

SEMIA 5019 ou 29w - Estirpe com eficiência média a elevada e competitiva. Foi isolada da linhagem IAC-70-559, na EMBRAPA-CNPBS, de solos com teores elevados de Mn; é recomendada comercialmente desde 1979.

SEMIA 587 - Isolada pelo IPAGRO, RS, em 1967. Eficiente e competitiva. Recomendada comercialmente de 1968 a 1975 e de 1979 até o presente momento.

Para a padronização do crescimento das estirpes a serem utilizadas, foram realizadas as respectivas curvas de crescimento, determinando-se que a fase logarítmica de todas elas estava entre 45 e 70 horas.



### Cultivares de soja

Os estudos foram conduzidos com a cultivar BR-16, de ciclo semi-precoce. Para o par de estirpes SEMIA 586 e SEMIA 5080 utilizou-se também a cultivar IAC-2 (sementes provenientes da EMBRAPA-CNPSo).

### Estudo sobre os passos iniciais da infecção das raízes

O fenótipo das raízes, em resposta à inoculação, foi estudado em condições axênicas, em meio nutriente-agar. As sementes foram esterilizadas com álcool e  $HgCl_2$  conforme Vincent (1970), pré-germinadas por dois dias e, então, inoculadas com as estirpes de *B. japonicum* (1 ml por semente de culturas com  $10^8$  células/ml) e plantadas em frascos contendo meio sólido com 8 g de agar/l e solução nutritiva isenta de N (Somasegaran & Hoben, 1985), adicionando-se 0,5 ml/l da solução estoque com as seguintes concentrações (M):  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 2,0;  $KH_2PO_4$ , 1,0; Citrato de Fe, 0,02;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5;  $K_2SO_4$ , 0,5;  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ , 0,002;  $H_3BO_3$ , 0,004;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,001;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,0004;  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,0002;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0,0002, pH final de 6,8.

Aos quinze dias após o plantio, os seguintes parâmetros foram avaliados: deformação da raiz principal (Tsr, thick and short root), aumento no número pêlos radiculares (Hai, hair induction, determinado pelo número de pêlos radiculares por campo da câmara de Neubauer), pêlos radiculares deformados (Had, hair deformation, avaliado pelo comprimento e espessura dos pêlos radiculares) e pêlos encurvados (Hac, hair curling, avaliado pela presença ou ausência de encurvamento dos pêlos radiculares). Tsr foi calculado pelo comprimento e espessura da raiz principal (Zaat et al. 1987). Hai, Had e Hac foram investigados após a coloração com 0.01% de azul de metileno (peso/volume) em água deionizada, incubação por 15 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente e lavagem cuidadosa por pelo menos três vezes em água deionizada (Vasse & Truchet 1984).

O experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, e os resultados foram analisados pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

### Estudos sobre a eficiência e capacidade competitiva das estirpes

Os experimentos foram conduzidos sob condições estéreis, em vasos de Leonard modificados (Vincent 1970). As sementes foram esterilizadas conforme descrito acima. Nos estudos sobre a eficiência da fixação do  $N_2$ , adicionou-se 1 ml de inoculante de cada estirpe ( $10^8$  células/ml) por semente. Nos estudos sobre competitividade, as estirpes foram testadas contra a SEMIA 5019. Após atingirem a concentração de  $10^8$  células/ml, procedeu-se à mistura de cada estirpe com a SEMIA 5019, nas proporções de 1:1, 10:1 e 1:10. As plantas foram coletadas após cinco semanas. Os nódulos foram destacados, determinando-se o peso fresco dos mesmos, e guardados a  $-10^\circ C$  para o teste de sorologia. A parte aérea e as raízes foram secas a  $65^\circ C$  até atingirem peso constante, pesadas, procedendo-se, então, à análise do teor de N na parte aérea, pelo método espectrofotométrico do azul de indofenol (Feije & Anger 1972). Os nódulos foram caracterizados sorologicamente (Somasegaran & Hoben 1985), utilizando-se todos os nódulos no caso de baixa nodulação, ou 40 nódulos por repetição nos demais tratamentos.

O experimento foi conduzido em um delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições, e os resultados foram analisados pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

### Teste da eficiência e competitividade das estirpes a campo

O experimento foi conduzido na área experimental da EMBRAPA-CNPSo, em um latossolo roxo, com as seguintes características:

Profundidade (cm)	pH em $CaCl_2$	N %	Al -----	K me/100g de solo	Ca -----	Mg -----	H+Al -----	Al -----	C % -----	P ppm
0-20	5,20	0,17	0,00	0,39	5,39	1,87	4,16	0,00	1,73	12,70
20-40	4,99	0,12	0,00	0,21	3,76	1,54	4,26	0,00	1,30	4,93

Aos 45 dias antes do plantio foram incorporadas ao solo 2 ton/ha de calcário. A parcela experimental teve dimensões de 3,0 m x 2,0 m, com linhas de soja distanciadas de 0,5 m. As parcelas foram separadas umas das outras por caminhos de 2,0 m e por pequenos terraços. A população de rizóbio do solo foi determinada pela técnica do número mais provável em plantas (NMP, Vincent 1970), utilizando-se a cultivar de soja BR-16. O solo mostrou uma população estabelecida de  $2,21 \times 10^5$  células/g de solo.



O experimento foi conduzido com a cultivar BR-16, sendo utilizadas aproximadamente 30 sementes/m linear, e os seguintes tratamentos: 1- SEMIA 5080; 2- SEMIA 5079; 3- SEMIA 586; 4- SEMIA 566; 5- SEMIA 5019; 6- SEMIA 587; 7- Controle não inoculado; 8- Controle não inoculado e recebendo N mineral na dose de 400 kg de N como uréia/ha em cobertura, em 10 parcelas semanais de 40 kg de N/ha, a começar do plantio; 9- Controle não inoculado e recebendo N mineral na dose de 400 kg de N como uréia/ha em cobertura, com 200 kg de N no plantio e 200 kg no florescimento. As sementes foram inoculadas com inoculante líquido, preparado em laboratório, do CNPSo com uma concentração de  $10^9$  células/ml, colocando-se 100 ml de inóculo/kg de semente.

A primeira e segunda coletas foram realizadas aos 30 dias e 48 dias após a semeadura respectivamente. Quinze plantas de cada parcela foram coletadas, determinando-se o teor de clorofila nas folhas (Mirza et al. 1990), o número e peso de nódulos secos, peso de raiz e parte aérea secos e porcentagem de % N nos tecidos das raízes e da parte aérea. Quarenta nódulos por parcela foram utilizados para as análises sorológicas. Na coleta final foram determinados o rendimento dos grãos e o teor de N nos grãos. Para a determinação do teor de lipídeos nos grãos, utilizou-se a extração contínua com hexano em aparelho Soxhlet durante 6 horas (Pregnotatto & Pregnotatto 1985).

O experimento foi conduzido em blocos ao acaso, com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas através do teste de Duncan, ao nível de 5%.

## Resultados e Discussão

### Estudo sobre os passos iniciais da infecção das raízes

A análise dos fenótipos das raízes em resposta à inoculação, tais como Tsr, Hai, Had e Hac, tem sido utilizada, freqüentemente, nos estudos sobre a troca de sinais moleculares que precedem a nodulação e sobre os passos posteriores que conduzem à formação dos nódulos (Vincent 1980; Canter Cremers et al. 1986; Zaat et al. 1987; Faucher et al. 1988). A inoculação da cultivar de soja BR-16 com as estirpes SEMIA 566 ou SEMIA 5079 provocou respostas semelhantes nos fenótipos Tsr, Had e Hac. Pode-se detectar uma diferença entre as duas estirpes, porém, no fenótipo Hai, pois a SEMIA 5079 aumentou significativamente o número de pêlos radiculares (Tabela 1). Essas mudanças no fenótipo das raízes são uma resposta da leguminosa ao rizóbio (van Brussel et al. 1982, 1986), e estão relacionadas com a atividade dos genes comuns da nodulação (genes *nod*), *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nodD* (van Brussel et al. 1986; Zaat et al. 1987). Em algumas simbioses, como a de alfafa com *R. meliloti*, estão envolvidos também genes específicos do hospedeiro (Faucher et al. 1988). Estudos recentes mostram que essas modificações das raízes ocorrem porque os genes *nod* codificam a síntese de compostos solúveis, identificados como lipídeo-oligossacarídeos, que são os responsáveis por alterações nas raízes (Lerouge et al. 1990). Como a SEMIA 5079 diferiu da parental SEMIA 566 no fenótipo Hai, isso conduz à hipótese de que a primeira sofreu uma mutação em algum dos genes *nod*.

**TABELA 1.** Efeito da inoculação da cultivar de soja BR-16 com as estirpes SEMIA 566 e SEMIA 5079 no fenótipo das raízes. Os parâmetros analisados foram o comprimento e espessura da raiz principal (Tsr, thick and short root), a deformação dos pêlos radiculares (Had, hair deformation), aumento no número dos pêlos radiculares (Hai, hair induction) e o encurvamento do pêlo radicular (Hac, hair curling). Plantas coletadas aos quinze dias após a inoculação. Médias de quatro repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ , Tukey). Londrina, PR, 1993.

Estirpe	Raiz Principal (Tsr)		Had		Hai	Hac
	Comprimento (cm)	Espessura (mm)	Comprimento ( $\mu$ )	Espessura ( $\mu$ )	(nº/campo)	
566	19,95 a	2,38 a	62,50 b	23,75 a	50,25 b	+
5079	19,75 a	2,50 a	50,00 b	18,75 a	>100,00 a	+
Controle	22,72 a	1,88 a	205,00 a	10,00 b	23,75 c	-
CV (%)	14,71	22,84	17,18	26,08	12,77	

Quando o par de estirpes SEMIA 586 e SEMIA 5080 foi testado na cultivar BR-16, constatou-se que as mudanças dos fenótipos foram semelhantes. Na cultivar IAC-2, porém, o fenótipo Hai foi maior na presença da SEMIA 5080 (Tabela 2). Isso conduz à hipótese de que, neste caso, a mutação pode estar localizada em algum gene *nod*.



específico do genótipo, como é o caso do gene GSN (genotipic specific gene) *noIA*, identificado em algumas estirpes de *B. japonicum* nos Estados Unidos (Sadowsky et al. 1991). Pode-se visualizar, na Fig. 1, o efeito da inoculação nos fenótipos de raízes.

**TABELA 2.** Efeito da inoculação das cultivares de soja BR-16 e IAC-2 com as estirpes SEMIA 586 e SEMIA 5080 no fenótipo das raízes. Os parâmetros analisados foram o comprimento e espessura da raiz principal (Tsr, thick and short root) a deformação dos pêlos radiculares (Had, hair deformation), aumento no número dos pêlos radiculares (Hai, hair induction) e o encurvamento do pêlo radicular (Hac, hair curling). Plantas coletadas aos quinze dias após a inoculação. Médias de quatro repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ , Tukey). Londrina, PR, 1993.

Estirpe	Raiz Principal (Tsr)		Had		Hai	Hac
	Comprimento (cm)	Espessura (mm)	Comprimento ( $\mu$ )	Espessura ( $\mu$ )	(n <sup>o</sup> /campo)	
..... Cultivar BR-16 .....						
586	16,58 b	2,38 ab	57,50 b	17,50 a	>100,00 a	+
5080	17,05 b	3,25 a	62,50 b	17,50 a	>100,00 a	+
Controle	22,72 a	1,88 b	205,00 a	10,00 b	23,75 b	-
CV (%)	8,53	23,56	17,54	15,71	2,04	
..... Cultivar IAC-2 .....						
586	15,38 b	3,12 a	60,00 b	20,00 a	45,50 b	+
5080	14,75 b	2,88 a	52,50 b	20,00 a	> 100,00 a	+
Controle	21,25 a	2,00 b	207,50 a	10,00 a	23,25 b	-
CV (%)	11,13	7,68	12,30	1,00	2,63	

A comparação entre as estirpes em relação à eficiência da fixação do N<sub>2</sub> e capacidade competitiva das estirpes na fase inicial do processo de fixação do N<sub>2</sub> foi realizada em condições estéreis de casa de vegetação, e pode-se verificar que as estirpes SEMIA 566 e SEMIA 5079 não diferiram no número de nódulos formados aos 30 dias após a emergência. O teor de N da parte aérea, porém, tendeu a ser mais elevado com a SEMIA 5079, embora esses valores não tenham sido estatisticamente diferentes. Essa mutante, porém, apresentou eficiência nodular superior à da SEMIA 566 em 81% (Tabela 3).

**TABELA 3.** Número de nódulos (N<sup>o</sup>Nod), massa de nódulos frescos (MNF), massa das raízes (MRS) e da parte aérea secas (MPAS), % N da parte aérea (%NPA), N total da parte aérea (NTPA) e eficiência dos nódulos (Efic.Nod.) de soja, cultivar BR-16, inoculada com a estirpe SEMIA 566 e com um isolado dessa mesma estirpe, denominado SEMIA 5079. Médias de quatro repetições. As plantas foram coletadas aos 30 dias após a emergência. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ , Tukey). Londrina, PR, 1993.

Estirpe	N <sup>o</sup> Nod (n <sup>o</sup> /pl)	MNF (g/pl)	MPAS (g/pl)	%NPA	NTPA (mgN/pl)	MRS (g/pl)	Efic. Nod. (mgN/gMNF)
566	49,38 a	0,75 a	0,82 a	2,63 a	21,57 a	0,30 a	28,76 b
5079	34,75 a	0,53 a	0,96 a	2,88 a	27,65 a	0,30 a	52,17 a
Controle <sup>1</sup>	0,00	0,00	0,44	0,90	3,96	0,08	0,00
CV (%)	45,08	22,78	27,29	8,42	32,39	7,45	20,55

<sup>1</sup> Os valores para o controle não inoculado não foram considerados na análise estatística



Quando inoculada na cultivar BR-16, a mutante natural SEMIA 5080 apresentou maior nodulação do que a SEMIA 586, tendendo a acumular teores mais elevados de N na parte aérea (Tabela 4). Já foi relatado que a cultivar IAC-2 restringe a nodulação pela SEMIA 586 (Peres 1979) e pode-se observar, na Tabela 4, que a subcultura SEMIA 5080 apresentou maior nodulação do que a parental SEMIA 586, tendendo também a acumular teores mais elevados de N nos tecidos; os níveis de nodulação, porém, ainda foram bastante baixos.

**TABELA 4.** Número de nódulos (NºNod), massa de nódulos frescos (MNF), massa das raízes (MRS) e da parte aérea secas (MPAS), % N da parte aérea (%NPA), N total da parte aérea (NTPA) e eficiência dos nódulos (Efic.Nod.) de soja, das cultivares BR-16 e IAC-2, inoculadas com a estirpe SEMIA 586 e com uma subcultura dessa mesma estirpe, denominada SEMIA 5080. Médias de quatro repetições. As plantas foram coletadas aos 30 dias após a emergência. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ , Tukey). Londrina, PR, 1993.

Estirpe	Nº Nod (nº/pl)	MNF (g/pl)	MPAS (g/pl)	%NPA	NTPA (mgN/pl)	MRS (g/pl)	Efic. Nod. (mgN/gMNF)
..... Cultivar BR-16 .....							
586	19,66b	0,32b	0,64a	3,06a	19,74a	0,52a	61,69a
5080	38,66a	0,63a	0,78a	3,22a	25,12a	0,53a	39,87a
Controle <sup>1</sup>	0,00	0,00	0,44	0,82	3,61	0,08	0,00
CV (%)	17,61	22,81	21,11	10,89	27,30	6,80	44,83
..... Cultivar IAC-2 .....							
586	5,12a	0,12b	0,68a	0,89b	6,05a	0,37a	55,38a
5080	9,88a	0,25a	0,57a	1,27a	7,24a	0,32a	31,62a
Controle <sup>1</sup>	0,00	0,00	0,44	0,90	3,96	0,08	0,00
CV (%)	44,68	32,21	28,17	13,11	38,11	18,33	15,80

<sup>1</sup> Os valores para o controle não inoculado não foram considerados na análise estatística

Deve-se considerar que, para conduzir os estudos sobre eficiência das mutantes em relação às originais, esses experimentos tiveram de ser conduzidos em vasos de Leonard, que não permitem o desenvolvimento ótimo das plantas por um período superior a 30 dias. Nessa época, pode-se constatar que as duas novas estirpes, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, tenderam a apresentar maiores taxas de fixação do N<sub>2</sub>, mas que, provavelmente devido ao período curto de fixação, não foi possível detectar diferenças estatísticas.

Quando inoculadas contra uma estirpe altamente competitiva, SEMIA 5019, observou-se um comportamento semelhante das estirpes SEMIA 566 e SEMIA 5079, ou seja, as maiores nodulações ocorreram quando as estirpes foram misturadas na proporção 1:1 com a SEMIA 5019. O aumento em dez vezes no número de células de qualquer estirpe prejudicou a nodulação, afetando drasticamente as taxas de fixação do N<sub>2</sub> (Tabela 5). Outros experimentos estão sendo conduzidos para confirmar esse decréscimo na nodulação, bem como para investigar a possibilidade de que as estirpes liberem substâncias inibidoras quando adicionadas em proporções desbalanceadas. Foi constatado, porém, que a mutante natural SEMIA 5079, quando inoculada na proporção 1:1 contra a SEMIA 5019, foi mais competitiva do que a SEMIA 566, ocupando 68% a mais dos nódulos (Tabela 5).

De um modo semelhante ao que ocorreu com o outro par de estirpes, as maiores nodulações foram encontradas quando as estirpes SEMIA 586 e SEMIA 5080 foram misturadas na proporção 1:1 com a SEMIA 5019 (Tabela 6). Neste caso, porém, embora a nodulação tenha sido reduzida com o aumento do número de células de uma das estirpes, a queda nas taxas de fixação do N<sub>2</sub> foi menos drástica, ocorrendo principalmente quando a SEMIA 5019 estava em superioridade de número de células. Quando inoculada contra a SEMIA 5019 na proporção 1:1, a mutante SEMIA 5080 tendeu a formar mais nódulos e a proporcionar maiores teores de N nos tecidos, embora tenha conseguido ocupar a mesma porcentagem de nódulos nas raízes.



**TABELA 5.** Número de nódulos (Nº Nod), massa de nódulos frescos (MNF), massa das raízes (MRS) e da parte aérea secas (MPAS), % N da parte aérea (%NPA), N total da parte aérea (NTPA) e porcentagem de ocupação dos nódulos pelas estirpes SEMIA 566 e SEMIA 5079 inoculadas em soja, cultivar BR-16, em diferentes proporções com a estirpe SEMIA 5019. Médias de quatro repetições. As plantas foram coletadas aos 30 dias após a emergência. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ , Tukey). Londrina, PR, 1993.

Relação	Nº Nod (nº/pl)	MNF (g/pl)	MPAS (g/pl)	NPA (%)	NTPA (mgN/pl)	MRS (g/pl)	% ocupação dos nódulos		
							566	5019	566+5019
<b>Estirpes 566:5019</b>									
1:1	51,62 a	0,70 a	0,94 a	2,98 a	28,01 a	0,36 a	52,10 bc	35,40 b	12,50 a
10:1	34,16 a	0,32 b	0,47 b	2,13 b	10,01 b	0,38 a	80,57 ab	8,33 c	11,10 a
1:10	33,66 a	0,47 ab	0,56 b	2,26 b	12,66 b	0,44 a	25,00 c	69,43 a	5,57 b
<b>Estirpes 5079:5019</b>									
1:1	44,50 a	0,72 a	0,98 a	3,07 a	30,09 a	0,34 a	87,50 a	2,00 c	10,50 a
10:1	33,00 a	0,32 b	0,47 b	1,95 b	9,16 b	0,37 a	87,50 a	6,25 c	6,25 b
1:10	40,62 a	0,58 ab	0,56 b	2,01 b	11,25 b	0,40 a	22,23 c	66,67 a	11,10 a
CV (%)	37,00	20,40	18,07	13,01	18,52	16,09	19,05	30,69	20,22

**TABELA 6.** Número de nódulos (Nº Nod), massa de nódulos frescos (MNF), massa das raízes (MRS) e da parte aérea secas (MPAS), % N da parte aérea (%NPA), N total da parte aérea (NTPA) e porcentagem de ocupação dos nódulos pelas estirpes SEMIA 586 e sua mutante natural, SEMIA 5080, inoculadas em soja, cultivar BR-16, em diferentes proporções com a estirpe SEMIA 5019. Médias de quatro repetições. As plantas foram coletadas aos 30 dias após a emergência. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ , Tukey). Londrina, PR, 1993.

Relação	Nº Nod (nº/pl)	MNF (g/pl)	MPAS (g/pl)	NPA (%)	NTPA (mgN/pl)	MRS (g/pl)	% ocupação dos nódulos		
							566	5019	566+5019
<b>Estirpes 586:5019</b>									
1:1	72,50ab	0,91a	0,94a	2,93a	38,38ab	0,44d	68,75a	16,65b	14,60a
10:1	35,50b	0,76a	0,47b	3,14a	40,19ab	0,99a	31,25b	37,50ab	31,25a
1:10	53,25b	0,69a	0,56b	2,71a	28,46b	0,75bc	10,42b	81,25a	8,75a
<b>Estirpes 5080:5019</b>									
1:1	101,50a	1,13a	0,98a	2,87a	54,24a	0,58cd	70,85a	8,32b	20,83a
10:1	47,50b	0,61a	0,47b	3,02a	35,64ab	0,88ab	33,33b	35,45ab	31,21a
1:10	49,00b	0,75a	0,56b	2,89a	31,21b	0,75bc	20,83b	58,35ab	20,82a
CV (%)	27,57	28,49	18,07	8,57	29,02	13,70	41,69	64,11	62,00

#### Inoculação em um solo com população estabelecida

A cada ano a área de primeiro plantio de soja fica menor, e poucos são os resultados de pesquisa sobre o efeito da reinoculação no estabelecimento das estirpes inoculadas e na produtividade da cultura. Neste experimento de campo, conduzido em um solo com uma população bastante elevada de *Bradyrhizobium japonicum*, de  $2,21 \times 10^5$  células/g de solo, foi possível detectar, aos 30 dias após a semeadura, um incremento no número de nódulos nas parcelas inoculadas (Tabela 7). Nessa coleta, observou-se um ótimo desempenho da estirpe SEMIA 586, de sua mutante natural SEMIA 5080 e das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587, quando comparadas com as parcelas não inoculadas ou recebendo níveis elevados de fertilizante nitrogenado.

Na coleta realizada no início do florescimento, destacou-se a maior nodulação das plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 5080, embora essa massa nodular não tenha resultado nos teores mais elevados de N (Tabela 8). Uma vez mais, pode-se notar a boa atividade simbiótica com a SEMIA 586, que chegou a acumular 38% a mais de N em relação às estirpes naturalizadas do solo. Fica evidente, nesta coleta, que a aplicação de N mineral, mesmo nessas doses elevadas, que seriam economicamente inviáveis, não resultou em qualquer benefício para as plantas.



No solo em estudo não havia predominância de nenhum sorogrupo, e os resultados confirmam que as estirpes introduzidas através dos inoculantes foram capazes de se estabelecer na rizosfera e nodular a soja (Tabela 9). Na coleta realizada aos 48 dias após a emergência, resultados semelhantes foram obtidos entre os dois pares de estirpes em estudo, e todas as quatro estirpes foram capazes de formar, em média, 50% dos nódulos das plantas, representando um incremento de 140% em relação à testemunha não inoculada. É interessante observar que a estirpe SEMIA 5019 proporcionou um grande aumento na nodulação e nas taxas de fixação do N<sub>2</sub>, embora tenha tido o menor incremento na ocupação dos nódulos.

**TABELA 9.** Efeito da inoculação de sementes de soja, cv. BR-16 em um solo com uma população de 2,21 x 10<sup>5</sup> células de *B. japonicum*/g de solo na ocorrência dos sorogrupos nos nódulos. Avaliações realizadas aos 30 e 48 dias após o plantio (DAP). Os valores representam médias de quatro parcelas, com 40 nódulos amostrados por parcelas e, quando seguidos pela mesma letra, não diferem estatisticamente dentro de cada sorogrupo (Duncan, P ≤ 0,05). Londrina, PR, 1993.

Tratamento	Estirpe Introduzida							
	Sorogrupo 586		Sorogrupo 566		Sorogrupo 5019		Sorogrupo 587	
	586	5080	566	5079	5019		587	
<b>30 DAP</b>								
Sem inoculação	17,50b		32,50b		20,00a		11,88a	
Inoculado	51,25a	29,38b	78,12a	53,75ab	36,88a		39,88a	
CV (%)	31,34		28,02		34,60		79,38	
<b>48 DAP</b>								
Sem inoculação	20,62b		21,25b		20,62b		12,50b	
Inoculado	51,25a	43,75a	53,75a	51,25a	36,25a		32,50a	
CV (%)	15,55		19,36		5,95		27,97	

A aplicação de 400 kg de N/ha, parcelados em duas ou dez vezes, não resultou em qualquer benefício para o aumento do rendimento e teor de N dos grãos (Tabela 10). Considerando a média dos seis tratamentos inoculados, pode-se concluir que a inoculação permitiu um aumento de rendimento de 108 kg/ha em relação à testemunha não inoculada e de 10 kg/ha em relação aos tratamentos com fertilizantes. A estirpe SEMIA 5019 apresentou os melhores rendimentos, superando em 391 kg/ha a testemunha sem inoculação e em 419 kg/ha o tratamento com fertilizante parcelado duas vezes.

**TABELA 10.** Rendimento de grãos, massa de 100 grãos e teores de óleo e nitrogênio nos grãos de soja, cultivar de soja BR-16, inoculada com seis estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* ou recebendo fertilizante nitrogenado. Experimento conduzido na estação experimental da EMBRAPA-CNPSo, e os valores representam médias de quatro parcelas com quinze plantas amostradas por parcela. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (P ≤ 0,05). Londrina, PR, 1993.

Tratamento	Rendimento de grãos (kg/ha)	Massa Seca de 100 grãos (g)	Teor de N nos grãos <sup>1</sup> (%)	N total dos grãos (kg N/ha)	Teor de óleo nos grãos (%)	Óleo total dos grãos (kg óleo/ha)
SEMIA 5080	4137 ab	18,35 bcd	6,37 b	263,06 abc	18,51 cd	762,78 ab
SEMIA 5079	3892 b	17,75 d	6,32 b	245,37 c	18,92 bcd	737,45 b
SEMIA 586	4043 b	18,91 abc	6,75 a	272,56 ab	19,35 abc	784,46 ab
SEMIA 566	4109 ab	18,42 bcd	6,71 a	275,20 ab	20,42 a	839,98 a
SEMIA 5019	4400 a	18,07 cd	6,50 ab	284,55 a	17,84 d	784,43 ab
SEMIA 587	4124 ab	18,21 bcd	6,60 ab	270,63 ab	19,48 abc	804,91 ab
Testemunha não inoculada	4009 b	19,83 a	6,63 ab	265,78 abc	19,83 abc	795,32 ab
Testemunha + 400 kg N/ha (parcelados 10 vezes)	4234 ab	19,27 ab	6,36 b	269,03 ab	19,63 abc	831,04 a
Testemunha + 400 kg N/ha (parcelados 2 vezes)	3981 b	18,50 bcd	6,34 b	251,52 bc	19,98 ab	794,40 ab
CV (%)	5,17	3,51	3,00	5,40	4,32	6,75

<sup>1</sup> 13% de umidade



Os benefícios da reinoculação ainda são bastante controversos. Resultados obtidos nos Estados Unidos demonstraram que populações tão baixas quanto 20 a 50 células de rizóbio/g de solo eliminam a resposta à inoculação, desde que algumas dessas bactérias sejam eficientes (Singleton & Tavares 1986; Thies et al. 1991). Thies et al. (1991) também observaram que, para haver uma resposta à inoculação, pelo menos 66% dos nódulos da planta precisam ser formados pela estirpe introduzida. Nessas condições, mesmo quando inoculantes muito efetivos formam a maioria dos nódulos, muitas vezes é difícil detectar respostas à inoculação (Weaver & Frederick 1974; Thies et al. 1991). No Brasil, porém, respostas à reinoculação foram relatadas em solos do cerrado (Vargas et al. 1992 b) e, no caso deste experimento, foram capazes de produzir incrementos na produtividade não só na presença de uma população naturalizada elevada, como também sem ter ocupado uma porcentagem alta dos nódulos. Isso indica que mais estudos precisam ser conduzidos sobre a ecologia rizobiana nos solos brasileiros, pois talvez as nossas condições de clima e solo possam conduzir à maior perda da eficiência das estirpes naturalizadas. Os resultados obtidos neste trabalho, portanto, confirmam que respostas à reinoculação podem ser obtidas mesmo em solos brasileiros com população de *B. japonicum* estabelecida.

### Conclusões

A comparação entre os pares de estirpes SEMIA 566 x SEMIA 5079 e SEMIA 586 x SEMIA 5080 mostrou que:

- 1- Em meio nutriente-agar, as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 diferiram das parentais na habilidade de causar o fenótipo Hai (hair induction), provocando um incremento no número de pêlos radiculares.
- 2- Em condições estéreis de casa de vegetação, as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 tenderam a apresentar maiores taxas de fixação de  $N_2$ . A estirpe SEMIA 5079 foi mais competitiva do que a SEMIA SEMIA 566 e a SEMIA 5080 foi capaz de formar maior número de nódulos do que a SEMIA 586.
- 3- Em um solo com população estabelecida de *B. japonicum* ( $2,21 \times 10^5$  células/g de solo) não foi possível detectar diferenças na nodulação entre as parentais e as mutantes, mas todas conseguiram se estabelecer na rizosfera, aumentando o número de nódulos. As estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 também foram boas fixadoras, incrementando o rendimento de grãos. Os tratamentos inoculados permitiram, em média, um aumento no rendimento de 108 kg/ha. A aplicação de fertilizante nitrogenado (400 kg N/ha como uréia), parcelado em duas ou dez vezes, não resultou em aumento na produtividade.

### Agradecimentos

Agradecemos aos pesquisadores Milton A. T. Vargas e Ieda C. Mendes, da EMBRAPA-CPAC, pela colaboração, pelas sugestões e pelo grande apoio em todas as fases de condução dos experimentos. O auxílio técnico de Lígia Maria Chueire, Waldemar de Oliveira Neto, José Zucca Moraes e Rubson N. O. Sibaldelle também foi essencial para a condução dos experimentos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, S.L.; MAIER, R.J.; HANUS, F.J.; RUSSELL, S.A.; ELMERICH, D.W.; EVANS, H.J. Hydrogenase of *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. **Science**, v.203, p.1255-1257, 1979.
- BHAGWAT, A.A.; KEISTER, D.L. Identification and cloning of *Bradyrhizobium japonicum* genes expressed strain selectivity in soil and rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1490-1495, 1992.
- BOTTOMLEY, P.J.K.; LEUNG, S.R.; STRAIN, S.R.; YAK, K.; DASHITI, N.; CLAYCOMB, P. The ecology of indigenous populations of *Rhizobium leguminosarum* bvs. *trifolii* and *viciae*. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation: achievements and objectives**. New York: Chapman and Hall, 1990. p.371-378.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; WALL, L.G.; DeMICHELI, A.T.; MACCHI, E.M.; BAUER, W.D.; FAVELUKES, G. Motility and chemotaxis affect nodulating efficiency of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v.86, p.1228-1235, 1988a.
- CAETANO-ANOLLÉLLS, G.; WALL, L.G.; DeMICHELI, A.T.; MACCHI, E.M.; BAUER, W.D.; FAVELUKES, G. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v.86, p.1228-1235, 1988b.



- CANTER CREMERS, H.C.J.; van BRUSSEL, A.A.N.; PLAZINSKI, J.; ROLFE, B.G. Sym plasmid and chromosomal gene products of *Rhizobium trifolii* elicit developmental responses on various legume roots. **Journal of Plant Physiology**, v.122, p.25-40, 1986.
- CATLOW, H.Y.; GLENN, A.R.; DILWORTH, M.J. The use of transposon-induced non-motile mutants in assessing the significance of motility of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* for movement in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p.331-336, 1990a.
- CATLOW, H.Y.; GLENN, A.R.; DILWORTH, M.J. Does rhizobial motility affect its ability to colonize along the legume root? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p.573-575, 1990b.
- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.155-161, 1970.
- FAUCHER, C.; MAILLET, F.; VASSE, J.; ROSENBERG, C.; van BRUSSEL, A.A.N.; TRUCHET, G.; DÉNARIÉ, J. *Rhizobium meliloti* host range *nodH* determines production of an alfalfa-specific extracellular signal. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.5489-5499, 1988.
- FEIJE, F.; ANGER, V. Spot tests in inorganic analyses. **Analytical Chemistry Acta**, v.149, p.363-367, 1972.
- HAHN, M.; HENNECKE, H. Cloning and mapping of a novel nodulation region from *Bradyrhizobium japonicum* by genetic complementation of a deletion mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p. 55-61, 1988.
- HANUS, F.J.; ALBRECHT, S.L.; ZABLOTOWICZ, R.M.; ELMERICH, D.W.; RUSSELL, S.A.; EVANS, H.J. Yield and N content of soybean seed as influenced by *Rhizobium japonicum* inoculants possessing the hydrogenase characteristic. **Agronomy Journal**, v.73, p.368-372, 1981.
- KANESHIRO, T.; KWOLEK, W.F. Stimulated nodulation of soybeans by *Rhizobium japonicum* mutant (B-14075) that catabolizes the conversion of tryptophan to indol-3-yl-acetic acid. **Plant Science**, v.42, p.141-146, 1985.
- LEROUGE, P.; ROCHE, P.; FAUCHER, C.; MAILLET, F.; TRUCHET, G.; PROMÉ, J.C.; DÉNARIÉ, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide. **Nature**, v.344, p.781-784, 1990.
- LIU, R.; TRAN, V.M.; SCHMIDT, E.L. Nodulation competitiveness of a nonmotile Tn7 mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in nonsterile soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1895-1900, 1989.
- MAIER, R.J.; BRILL, W.J. Mutant strains of *Rhizobium japonicum* with increased ability to fix nitrogen for soybean. **Science**, v.201, p.448-450, 1978.
- MAIER, R.J.; GRAHAM, L. Mutant strains of *Bradyrhizobium japonicum* with increased symbiotic N<sub>2</sub> fixation rates and altered Mo metabolism properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.2341-2346, 1990.
- McDERMOTT, T.R.; GRAHAM, P.H. Competitive ability of efficiency in nodule formation of strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3035-3039, 1990.
- MELLOR, H.Y.; GLENN, A.R.; ARWAS, R.; DILWORTH, M.J. Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifolii* TAL. **Archives of Microbiology**, v.47, 607-612, 1987.
- MIRZA, N.A.; BOHLOOL, B.B.; SOMASEGARAN, P. Non-destructive chlorophyll assay for screening of strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.203-207, 1990.
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DÖBEREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, v.36, p.1179-1192, 1985.
- OLIVEIRA, L.A.; GRAHAM, P.H. Speed of nodulation and competitive ability among strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. **Archives of Microbiology**, v.153, p.311-315, 1990.
- PERES, J.R.R. **Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Porto Alegre : UFRGS, 1979. 81p. Tese de mestrado.
- PERES, J.R.R.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. Variabilidade na eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.8, p.193-196, 1984.
- PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N.P. Métodos analíticos e físicos para análise de alimentos. In: Rebocho, D.D.E. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo : Instituto Adolfo Lutz, 1985. p.42.

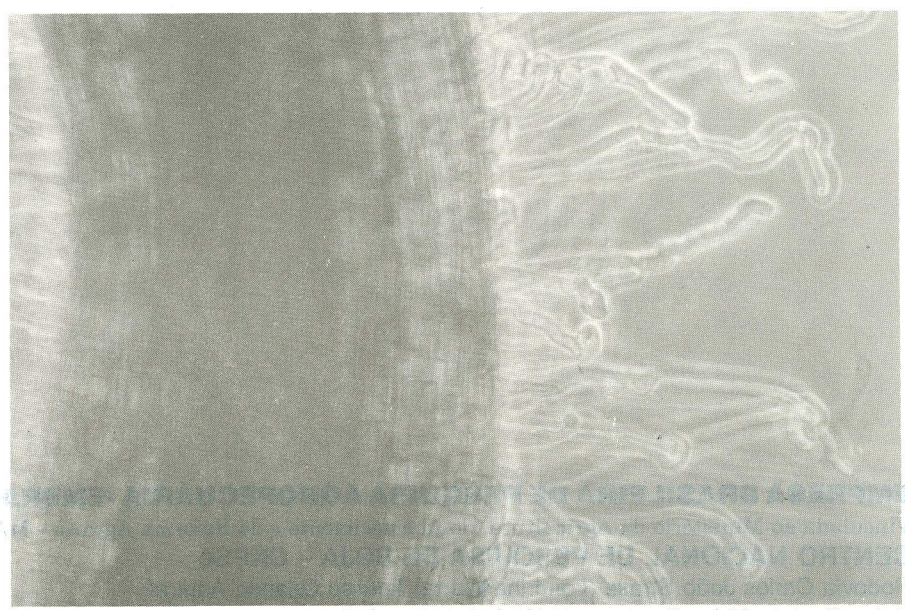


- SADOWSKY, M.J.; CREGAN, P.B.; GOTTFERT, M.; SHARMA, A.; GERHOLD, D.; RODRIGUEZ-QUINONES, F.; KEYSER, H.H.; HENNECKE, H.; STACEY, G. The *Bradyrhizobium japonicum nola* gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.88, p. 637-641, 1991.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; SÁ, N.M.H.; VARGAS, M.A.T.; DÖBEREINER, J. Resistência natural à estreptomicina de estirpes de *Rhizobium* e sua possível influência na nodulação de leguminosas em solos de cerrado. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., 1981, Brasília. **Resumos**. Londrina : EMBRAPA-CNPSo, 1981. p.183-184.
- SINGLETON, P.W.; TAVARES, J.W. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous rhizobium population. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p. 1013-1018, 1986.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Methods in legume-Rhizobium technology**. Hawaii : Niftal, 1985. 367p.
- THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Influence of size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.19-28, 1991.
- TRIPLETT, E.W. Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 98-103, 1990a.
- TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.3, p. 199-206, 1990b.
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.D.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. **Dois novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja**. Planaltina : EMBRAPA-CPAC, 1992a. p.1-3. (EMBRAPA-CPAC. Comunicado Técnico, 62).
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DA SOJA NOS CERRADOS, 1992, Uberaba. **Anais**. Uberaba, sd. 34p.
- van BRUSSEL, A.A.N.; TAK, T.; WETSELAAR, A.; PEES, E.; WIJFFELMAN, C.A. Small leguminosae as test plants for nodulation of *Rhizobium leguminosarum* and other rhizobia and agrobacteria harbouring a leguminosarum sym-plasmid. **Plant Science Letters**, v.27, p.317-325, 1982.
- van BRUSSEL, A.A.N.; ZAAT, S.A.J.; CANTER CREMERS, H.C.J.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; TAK, T.; LUGTENBERG, B.J.J. Role of plant root exudate and sym plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of *Tsr* factor which causes thick and short roots on common vetch. **Journal of Bacteriology**, v.165, p.517-522, 1986.
- VASSE, J.M.; TRUCHET, G.L. The Rhizobium-legume symbiosis: observation of root infection by bright-field microscopy after staining with methylene blue. **Planta**, v.161, p.487-489, 1984.
- VINCENT, J.M. **Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford : Blackwell, 1970. 164p.
- VINCENT, J.M. Factors controlling the Legume-Rhizobium symbiosis. In: NEWTON, W.E.; ORNE-JOHNSON, W.H. **Nitrogen Fixation**. Baltimore : Univ. Park Press, 1980. p.103-129.
- VITERI, S.E.; SCHMIDT, E.L. Ecology of indigenous soil rhizobia: response of *Bradyrhizobium japonicum* to readily available substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1872-1875, 1987.
- WADISIRISUK, P.; DANSO, S.K.A.; HARDARSON, G.; BOWEN, G.D. Influence of *Bradyrhizobium japonicum* location and movement on nodulation and nitrogen fixation in soybean. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1711-1716, 1989.
- WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* (L.) Merrill. I- Greenhouse studies. **Agronomy Journal**, v.66, p. 229-232, 1974.
- WILLIAMS, L.E.; PHILLIPS, D.A. Increased soybean productivity with a *Rhizobium japonicum* mutant. **Crop Science**, v.23, p.246-250, 1983.
- ZAAT, S.A.J.; van BRUSSEL, A.A.N.; TAK, T.; PEES, E.; LUGTENBERG, B.J.J. Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce *nodDABC* gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.3388-3391, 1987.
- ZABLOTOWICZ, R.M.; RUSSEL, S.A.; EVANS, H.J. Effect of the hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* on the nitrogen fixation and growth of soybeans at different stages of development. **Agronomy Journal**, v.72, p.555-559, 1980.
- ZDOR, R.E.; PUEPPKE, S.G. Nodulation competitiveness of Tn5-induced mutants of *Rhizobium fredii* USDA 208 that are altered in motility and extracellular polysaccharide production. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, p.52-58, 1991.





(A)



(B)

**FIG. 1.** Fenótipos das raízes de soja, cv. BR-16, provocados pela inoculação com a estirpe SEMIA 586 de *B. japonicum*. (A) Tratamento não inoculado e (B) Tratamento inoculado. (B) apresenta Hai (hair induction), com maior número de pêlos radiculares, Had (hair deformation-deformação dos pêlos radiculares) e Hac (hair curling-encurvamento dos pêlos radiculares). As raízes das plântulas inoculadas eram mais grossas e mais curtas (Tsr, thick and short root, fenótipo não mostrado). Avaliações realizadas quinze dias após a inoculação das plântulas. Aumento de 20 vezes.