

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

EFICIÊNCIA E COMPETITIVIDADE DE VARIANTES ESPONTÂNEOS ISOLADOS DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* spp RECOMENDADAS PARA A CULTURA DA SOJA (*Glycine max*)⁽¹⁾

Fabiola Gomes de Carvalho⁽²⁾, Pedro Alberto Selbach⁽³⁾ & Mariel Josué Bizarro⁽⁴⁾

RESUMO

O cultivo sucessivo de soja inoculada numa mesma área proporcionou a adaptação de uma população de rizóbios, que podem não ser tão eficientes quanto à capacidade de fixação de N₂, mas apresentam alta competitividade, dificultando a introdução de novas estirpes mais eficientes. Com a finalidade de avaliar o desempenho simbiótico (eficiência e competitividade) de variantes espontâneos isolados de estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019), realizou-se um experimento em casa de vegetação onde os variantes foram inoculados isoladamente e em diferentes combinações entre os variantes e uma estirpe comprovadamente mais competitiva (SEMIA 587 ou SEMIA 5019) a partir da adição de inóculos mistos (1/1; v/v) no cultivar de soja BR-16. Por meio da avaliação das variáveis analisadas (nodulação, produção de matéria de seca da parte aérea, N total acumulado na parte aérea e ocupação nodular), foi possível constatar que o determinante da maior eficiência em tratamentos co-inoculados não foi a ocupação nodular de determinada estirpe ou variante presente no inóculo, mas, sim, o tipo de interação (sinérgica ou antagônica) predominante no tratamento co-inoculado e que é possível selecionar variantes eficientes e competitivos para a cultura da soja a partir de estirpes parentais que já apresentam características desejáveis para utilização em inoculantes comerciais.

Termos de indexação: fixação de N₂, competitividade nodular, *B. japonicum*, *B. elkanii*.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Enviado para publicação em dezembro de 2003 e aprovado em dezembro de 2005.

⁽²⁾ Pesquisador DCR/CNPq, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Caixa Postal 07, CEP 59280-000 Macaíba (RN). E-mail: fgcarvalho@zipmail.com.br

⁽³⁾ Professor adjunto do Departamento de Solos da UFRGS, Caixa Postal 776, CEP 91501-970 Agronomia – Porto Alegre (RS). E-mail: pselbach@uol.com.br

⁽⁴⁾ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, UFRGS. E-mail: marielbizarro@hotmail.com

SUMMARY: EFFECTIVENESS AND COMPETITIVENESS OF SPONTANEOUS MUTANTS ISOLATED FROM *Bradyrhizobium* sp STRAINS RECOMMENDED FOR SOYBEAN CROP (*Glycine max*)

*The continuous cultivation of inoculated soybean in the same area can determine the soil colonization with a rhizobia population presenting low nitrogen fixation effectiveness. This fact can be a problem for the establishment of a more effective population. A greenhouse experiment was carried out to evaluate the symbiotic effectiveness and competitiveness of spontaneous mutants isolated from *B. japonicum* (SEMIA 5079 and SEMIA 5080) and *B. elkanii* (SEMIA 587 and SEMIA 5019) strains. The soybean biovar BR 16 was inoculated with the same proportion of inoculants (1:1; v/v) containing just one of the spontaneous mutants or in different combinations among them in comparison to a competitive strain (SEMIA 587 and 5019). Through the evaluation of nodulation, dry weight yields of plants, total N in plant and nodules occupancy, it was verified that the determinant factor for microorganisms symbiotic effectiveness in co-inoculated treatments was the synergism and the antagonistic interaction and not the nodule occupancy. It was also possible to select effective and competitive spontaneous mutants for soybean from parental strains recommended for commercial inoculants.*

*Index terms: nitrogen fixation, nodule competition, *B. japonicum*, *B. elkanii*.*

INTRODUÇÃO

Espécies vegetais produtoras de grãos, como a soja, destacam-se quanto ao seu potencial para formar simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico (N₂), podendo dispensar, total ou parcialmente a adubação nitrogenada e ainda contribuir para outras espécies em sucessão, garantindo a auto-sustentabilidade do ecossistema com relação ao nitrogênio disponível no solo (Hungria et al., 1994). Atualmente, a soja é uma das culturas que apresentam maior relevância no cenário agrícola mundial, não apenas pelo valor bruto de seus grãos, mas, sobretudo, pelo valor dos produtos agregados à sua produção (Embrapa, 2002). No Brasil, a soja é cultivada em uma área de 15 milhões de hectares, sendo responsável por uma produção de mais de 40 milhões de toneladas de grãos, o que torna o País o segundo maior produtor mundial (IBGE, 2001).

A capacidade de fixação de N₂ sempre foi levada em consideração desde que se iniciou a produção da soja em escala comercial no Brasil. Embora a indicação das estirpes para inoculação seja baseada em estudos de seleção de estirpes de comprovada eficiência fixadora de nitrogênio, de permanência no solo e resistência a fatores limitantes, tem-se observado que o cultivo sucessivo de soja inoculada numa mesma área levou ao estabelecimento de populações de rizóbios que nem sempre são as mais eficientes quanto à capacidade de fixação de N₂, mas que podem ser altamente competitivas, dificultando a introdução de estirpes mais eficientes, ainda que

estas estejam presentes em maior quantidade (Vargas et al., 1994).

A ocorrência de mutações espontâneas nas estirpes das coleções de culturas de rizóbios e bradirrizóbios é outro fator que tem comprometido o processo simbiótico, uma vez que esta variabilidade representa um problema potencial para a manutenção e indicação de estirpes para estudos de taxonomia e fabricação de inoculantes (Bangel, 2000). Em geral, ao serem comparados às estirpes parentais, os variantes apresentam alteração de importantes características simbióticas, que envolve desde a perda de infectividade (Kuykendall & Elkan, 1976) a alterações na eficiência e potencial de competição por sítios nodulares (Mullen & Wollum II, 1989). Contudo, tem sido observada a ocorrência de variantes com alta eficiência simbiótica e poder competitivo (Peres et al., 1984; Sato, 1995). Desta forma, acredita-se que estirpes do mesmo sorogrupo de reação ou variantes genéticos da mesma estirpe poderiam estar fazendo parte de um mesmo material biológico (Meyer & Pueppke, 1980; Kozusny-Andreani, 1997).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o potencial simbiótico de variantes espontâneas isolados de estirpes de bradirrizóbio que já apresentam características desejáveis para a produção de inoculantes, como as estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, como uma ferramenta auxiliar ao processo de seleção de novas estirpes que possam competir com a população de bradirrizóbios naturalizada nos solos cultivados e fixar eficientemente o N₂ na cultura da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O desempenho simbiótico dos variantes foi avaliado sob condições axênicas em casa de vegetação localizada no Campus da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em um experimento que seguiu um arranjo fatorial e obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, em que os variantes das estirpes SEMIA 5079 (1A, 2A e 3A), SEMIA 5080 (1B, 3B e 4B), SEMIA 587 (1C, 3C e 6C) e SEMIA 5019 (1D e 2D) foram inoculados no cultivar de soja BR-16, isoladamente e em diferentes combinações entre os variantes e uma estirpe comprovadamente mais competitiva (SEMIA 587 ou SEMIA 5019).

Neste experimento, foram utilizados vasos de Leonard autoclavados, por duas horas, a 120 °C, tendo como substratos areia e vermiculita na proporção de 3:1. Variantes e estirpes de *Bradyrhizobium* sp foram obtidos de meio extrato de levedura manitol (Vincent, 1970) com pH ajustado para 6,8, por um período de 72 h, a 28 °C, sob agitação de 120 rpm. Depois de certificada a pureza do inoculante, foi adicionado 1 mL de inóculo misto (1/1; v/v) por planta, continha 10⁸ células viáveis, tendo sido esta quantidade estimada de acordo com o método descrito em Vincent (1970).

De acordo com o tratamento, as parcelas constituídas por cada vaso receberam solução nutritiva de Norris (Vincent, 1970) isenta de nitrogênio, autoclavada e com pH ajustado para 6,0. Além dos tratamentos inoculados, havia tratamentos controle sem inoculação: testemunha sem adição de nitrogênio e testemunha nitrogenada (2,14 g vaso⁻¹ de N na forma de NH₄NO₃, fornecidos em solução parcelada aos 15 e 30 dias após o plantio).

As sementes do cultivar de soja BR-16 foram desinfestadas por imersão em álcool, durante 2 min, e em solução de hipoclorito de sódio comercial (3%) diluído a 20% durante 3 min, sendo, em seguida, lavadas repetidas vezes em água destilada esterilizada. Inicialmente, foi realizada uma pré-germinação e após 4 dias procedeu-se ao transplante, colocando-se quatro plântulas por vaso. Sete dias após o transplante, foi efetuado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

A colheita foi realizada 45 dias após o plantio, coletando-se a parte aérea e as raízes. Os nódulos foram separados das raízes, contados, pesados e, em seguida, acondicionados em recipientes com sílica gel para conservação e armazenamento, objetivando, posteriormente, a análise sorológica. A tipificação nodular foi realizada pela soroaglutinação, segundo a técnica descrita por Lemos (1994). Para cada tratamento foram tomados ao acaso 40 nódulos, e, no caso de baixa nodulação, foram utilizados todos os nódulos do tratamento. Os anti-soros das estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 foram cedidos pelo Laboratório de

Microbiologia do MIRCEN – FEPAGRO, tendo sido utilizados os títulos superiores a 1:800.

A parte aérea foi submetida à secagem em estufa a 60 °C até massa constante, sendo, em seguida, seca, pesada e moída para determinação química do teor de nitrogênio total, segundo o método semimicro Kjeldahl (Tedesco et al., 1995). O índice de eficiência simbiótica (Efra) dos variantes foi calculado, através da fórmula abaixo, conforme descrito por Brockwell et al. (1966) *apud* Sá (2001).

$$Efra = \frac{N_{total\ fixado} - N_{total\ T\ S/N}}{N_{total\ T\ C/N} - N_{total\ T\ S/n}} \times 100$$

em que N_{total fixado} = Nitrogênio total do tratamento; N_{total T S/N} = Nitrogênio total da testemunha sem nitrogênio; N_{total T C/N} = Nitrogênio total da testemunha nitrogenada.

Os resultados obtidos com a nodulação, produção de matéria seca e N-total acumulado na parte aérea foram analisados no programa estatístico SANEST e submetidos à análise de variância com teste de F, utilizando-se o Teste de Tukey a 5% para comparação entre médias de tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de nodulação (número de nódulos e massa nodular), produção de matéria seca e nitrogênio total acumulado dos tratamentos inoculados em soja, a partir da adição de inóculos individuais ou misturas que continha estirpes originais e, ou, variantes de *Bradyrhizobium* spp, são apresentados nos quadros 1 e 2.

Em geral, os tratamentos que envolveram a inoculação dos variantes originados da estirpe SEMIA 5079 (1A, 2A e 3A) e da estirpe SEMIA 5080 (1B, 3B e 4B), não diferiram entre si quanto à nodulação (número de nódulos e massa nodular) (Quadro 1). Exceto pelos tratamentos inoculados com os variantes 2A e 3A, foram observadas significativas reduções no número de nódulos formados e massa nodular quando os variantes 1A, 1B, 3B e 4B foram inoculados conjuntamente com a estirpe SEMIA 5019.

Nos resultados de produção de matéria seca e N total acumulado, também não foram observadas diferenças entre os tratamentos envolvendo as co-inoculações dos variantes originados das estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (Quadro 1).

Um comportamento distinto foi observado quando variantes das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 foram inoculados em mistura com a estirpe SEMIA 5019, pois, embora os tratamentos tenham obtido padrão de nodulação (número e massa nodular) semelhante, observa-se que os

Quadro 1. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (*Glycine max*) cultivar BR-16, inoculada com a estirpe SEMIA 5019 e, ou, variantes de *Bradyrhizobium japonicum*, a partir da adição de inóculos individuais ou mistos, aos 35 dias após o plantio

Tratamento	Nodulação		Parte aérea	
	Nódulo ⁽¹⁾	Massa seca	Matéria seca	N-total
	(N° vaso ⁻¹)	mg vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	mg vaso ⁻¹
1A	62,7 ab	361,33 abc	1,92 de	36,93 efghi
2A	33,7 bcde	196,00 jk	1,31 hijk	26,98 klm
3A	11,0 f	89,66 mn	1,37 ghijk	23,41 lmn
1A : 2A	44,8 abcd	238,00 hij	1,42 fghij	32,27 hijk
1A : 3A	44,4 abcd	238,00 hij	1,55 fghi	30,13 ijk
2A : 3A	38,2 bcde	241,00 ghij	1,63 efgh	31,18 ijk
1B	58,3 ab	305,00 cdef	2,27 d	50,08 d
3B	57,6 ab	278,00 defghi	1,66 efgh	39,67e fg
4B	54,9 ab	243,00 fghij	1,71 efg	40,24 ef
1B : 3B	34,8 bcde	196,00 jk	1,19 ijkl	18,98 n
1B : 4B	53,8 ab	220,00 ij	1,67 efgh	35,35 fghij
3B : 4B	46,8 abcd	135,00 klm	1,56 efgh	35,94 fghi
1A : 1B	71,1 a	335,00 bed	1,69 efg	34,48 fghij
2A : 1B	39,3 bcde	256,66 efghij	1,16 jkl	21,05 mn
3A : 1B	49,4 abc	283,00 defgh	1,37 ghijk	31,90 ijk
1A : 3B	52,7 ab	412,00 a	0,92 lm	20,14 mn
2A : 3B	52,0 ab	234,00 hij	1,76 ef	35,88 fghi
3A : 3B	54,5 ab	302,00 cdefg	1,64 efgh	39,25 efgh
1A : 4B	42,8 abcd	267,33 efghi	1,45 fghij	32,76 ghijk
2A : 4B	53,6 ab	378,00 ab	1,18 jkl	30,24 ijk
3A : 4B	48,6 abc	314,00 cde	1,36 ghijk	32,90 ghijk
1A : SEMIA 5019	25,2 cdef	157,33 kl	3,19 c	65,96 c
2A : SEMIA 5019	17,5 ef	117,00 lm	3,61 b	74,75 b
3A : SEMIA 5019	18,9 ef	126,00 lm	3,23 c	66,87 c
1B : SEMIA 5019	17,1 ef	106,00 lm	1,35 ghijk	28,41 jkl
3B : SEMIA 5019	13,1 f	37,66 no	1,75 ef	36,15 fghi
4B : SEMIA 5019	13,0 f	22,33 o	1,66 efgh	43,87 de
SEMIA 5019	22,8 def	143,66 klm	1,25 kl	21,81 lmn
TA	—	—	0,71 m	7,31 o
TN	—	—	7,18 a	126,03 a
CV (%)	20,9	23,1	18,2	20,3

⁽¹⁾ Dados transformados por $\sqrt{x+1}$.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 %. TA – testemunha absoluta; TN – testemunha nitrogenada.

tratamentos em que a estirpe SEMIA 5019 foi inoculada conjuntamente com os variantes 1A, 2A e 3A houve melhor desempenho simbiótico, uma vez que, com uma menor nodulação, foram capazes de obter produção de matéria seca e N total significativamente superiores aos dos demais tratamentos, resultando em expressivos aumentos de eficiência relativa (Figura 1). De acordo com Vinuesa et al. (1998), isolados de uma mesma espécie, que possuem o mesmo sorotipo, podem diferir significativamente quanto à eficiência de fixação de nitrogênio, bem como na sua habilidade para ocupar nódulos em competição com outras estirpes intimamente relacionadas.

Dentre tratamentos inoculados com os variantes originados da estirpe SEMIA 5079 (1A, 2A e 3A), verifica-se que o variante 1A apresentou índice de eficiência superior ao dos demais variantes e que as inoculações mistas deste variante com os variantes menos eficientes (2A e 3A) resultaram em uma menor eficiência (Figura 1). De acordo com Weiser et al. (1990), nem sempre efetividade e competitividade estão estritamente correlacionadas, uma vez que quando variantes menos eficientes são co-inoculados, podem apresentar maior ocupação nodular resultando numa baixa produtividade.

No presente ensaio de competitividade, contudo, não foi possível determinar a percentagem de

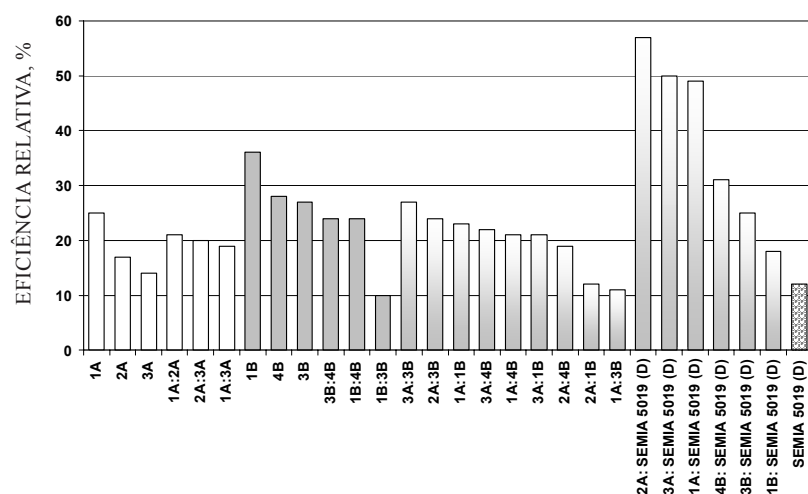


Figura 1. Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com variantes de *B. japonicum* e, ou, a estirpe SEMIA 5019, em relação ao N total acumulado em soja cultivar BR-16, 35 dias após o plantio.

ocupação nodular obtida pelos variantes 1A, 2A e 3A, em qualquer tratamento no qual estes variantes foram inoculados, uma vez que não foram verificadas reações de aglutinação usando extratos nodulares dos tratamentos com estes variantes e o anti-soro produzido a partir da estirpe original SEMIA 5079. Por serem variantes espontâneos, é provável que existam alterações nos determinantes antigênicos espécie-específicos que interferiram nos resultados da análise, uma vez que reações de aglutinação foram observadas quando foram utilizadas suspensões antigênicas a partir de extratos nodulares ou crescimento bacteriano da própria estirpe original SEMIA 5079, usando o mesmo soro.

Schingamer & Dudman (1980) observaram que mutantes espontâneos de *Rhizobium* spp resistentes à espectinomicina podem diferir quanto a propriedades antigênicas e fixação de nitrogênio em relação à estirpe original. Lemos (1994) observou que a estirpe de *B. japonicum*, SEMIA 5052 (USDA 6), classificada no sorogrupo 1, pertence a um grupo de rizóbios que se mostram deficientes tanto para a produção de soros hiperimunes como para a reatividade sorológica e que esta baixa reatividade é devida à falta do antígeno-O, constituinte do lipopolissacarídeo da parede celular das bactérias pertencentes a este grupo.

Os resultados da análise sorológica com os variantes originados da estirpe SEMIA 5079 demonstraram um problema comum aos métodos sorológicos usados na caracterização de estirpes de bradirrizóbio, que se caracteriza pela presença de estirpes que não reagem ao soro testado. De acordo com Lindermann et al. (1974) *apud* Peres (1979), a caracterização do rizóbio no nódulo mostra-se muito dependente da técnica sorológica adotada, uma vez que, em sua maioria, os métodos sorológicos não apresentam suficiente sensibilidade para diferenciar

a presença de duas estirpes no mesmo nódulo, quando um segundo sorogrupo está presente em menor número.

É importante enfatizar que a análise de aglutinação foi realizada a partir de soros hiperimunes não purificados, sendo provável que a purificação do soro para eliminação das imunoglobulinas inespecíficas, ou a produção de soros monoclonais para a estirpe SEMIA 5079, tornaria mais específica a análise de aglutinação para este grupo de variantes, o que não foi possível ser realizado no presente estudo.

Os variantes da estirpe SEMIA 5080 apresentaram índices de ocupação nodular variando de 75 a 97%, quando inoculados em mistura com os variantes 1A, 2A e 3A (Figura 2). Reduções nas percentagens de ocupação nodular dos variantes 1B, 3B e 4B foram observadas quando estes variantes foram inoculados conjuntamente com a estirpe SEMIA 5019. Isto era esperado pois, em razão da elevada competitividade apresentada, a estirpe SEMIA 5019, juntamente com a SEMIA 587 e a SEMIA 566, têm sido as estirpes indicadas para estudos de competitividade com a cultura da soja (Hungria et al., 1994). Pode também ser observado, na figura 2 que, quanto maior a ocupação nodular da estirpe SEMIA 5019 no tratamento inoculado, menor a eficiência relativa observada no tratamento, uma vez que a eficiência relativa obtida pela estirpe SEMIA 5019 foi significativamente inferior à observada para os variantes 1B, 3B e 4B (Figura 1). Na co-inoculação do cultivar de soja BR 16 com as estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 5079, Boddey (1995) observou que os índices de ocupação nodular foram 73 e 27% respectivamente, tendo sido observados aumentos significativos de N total em relação ao tratamento inoculado apenas com a estirpe SEMIA 5019.

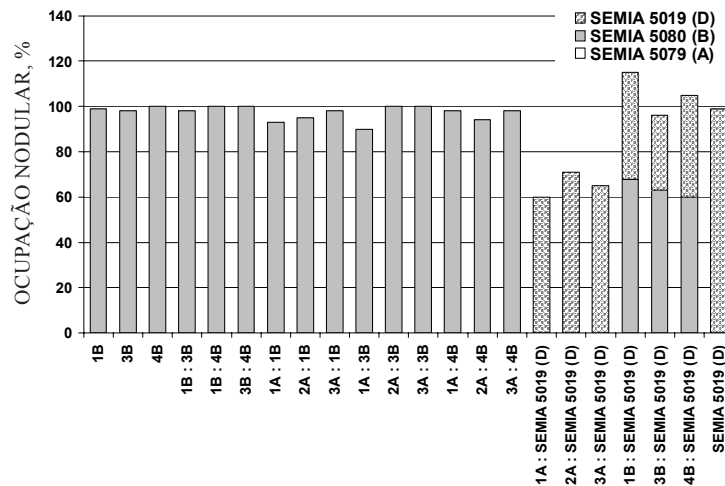


Figura 2. Percentagem de ocupação nodular dos tratamentos inoculados com variantes de *B. japonicum* e a estirpe SEMIA 5019, isolados e em mistura (1:1).

Os resultados do experimento de competição envolvendo variantes (1C, 3C, 6C, 1D e 2D) e estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) demonstraram que, na inoculação conjunta, houve menor número de nódulos formados e massa nodular, quando comparados os tratamentos com inoculação individual ou em mistura (Quadro 2). Nishi (1995) também observou, em experimentos de competitividade, reduções no número de nódulos, massa nodular e produção de matéria seca.

Embora nos tratamentos de inoculação conjunta com variantes originados de uma mesma estirpe (1C:3C, 1C:6C, 3C:6C e 1D:2D) e nos tratamentos 1C:2D e 2D:SEMIA 587 também tenha ocorrido menor formação de nódulos, observa-se, contudo, que, nestes tratamentos, houve um efeito sinérgico entre os diferentes organismos co-inoculados, evidenciado pela maior produção de matéria seca e N total acumulado na parte aérea (Quadro 2) e, conseqüentemente, uma eficiência relativa significativamente superior foi obtida em relação aos demais tratamentos inoculados (Figura 3). Rolfe et al. (1980) observaram que, na inoculação conjunta de um mutante não-nodulante e um mutante ineficiente de *R. trifolii*, houve um efeito estimulatório sobre o mutante ineficiente, que resultou na formação de nódulos eficientes.

Em geral, que os variantes 1D e 2D demonstraram maior percentagem de ocupação nodular que a sua estirpe original SEMIA 5019, quando foram inoculados em mistura com os variantes 1C, 3C e 6C (Figura 4). Observa-se que a inoculação conjunta com o variante 2D apresentou índices de eficiência relativa superiores e uma média de ocupação nodular de 87% para este variante 2D. Nos tratamentos onde os variantes 1C, 3C e 6C foram inoculados em conjunto com o variante 1D, observa-se que, embora o variante 1D tenha apresentado

elevados índices de ocupação nodular (Figura 4) e bom desempenho simbiótico, provavelmente a competição nestes tratamentos tenha levado à baixa eficiência observada, prejudicando o desenvolvimento da soja (Figura 4). Bromfield & Jones (1980) constataram a existência de competição ou antagonismo quando estirpes são co-inoculadas, sendo observada uma menor eficiência nos tratamentos que utilizaram inóculo misto, quando comparados aos tratamentos em que foram utilizados inóculo simples (apenas uma estirpe).

Comparando-se a eficiência relativa obtida pelo tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 5019, em relação aos tratamentos em que esta estirpe foi co-inoculada com um dos variantes originados da estirpe SEMIA 587, observa-se que a eficiência relativa dos tratamentos com os inóculos mistos se eleva, em virtude da maior eficiência e ocupação nodular apresentada pelos variantes 1C, 3C e 6C (Figuras 3 e 4). Champion et al. (1992), estudando a inoculação conjunta entre variantes eficientes e ineficientes na cultura da soja, observaram que a presença do variante eficiente em 60% dos nódulos ocasionava bons rendimentos de matéria seca e N total.

Quando estirpes e variantes foram utilizadas individualmente, a sua ocupação nos nódulos variou de 96 a 100%. Porém, na presença de um segundo variante ou estirpe, a percentagem de ocupação nodular foi reduzida e alterações de nodulação, rendimentos de matéria seca e N total foram observadas. As percentagens de nódulos ocupados acima de 100% (Figura 4), principalmente nos tratamentos de co-inoculação entre os variantes originados das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, devem-se à ocorrência de infecções duplas nos nódulos. Estudando a competição em *B. japonicum* de um mutante *nif* em comparação à estirpe

Quadro 2. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (*Glycine max*) cultivar BR-16, inoculada com estirpes e, ou, variantes de *Bradyrhizobium elkanii*, a partir da adição de inóculos individuais ou mistos, aos 35 dias após o plantio

Tratamento	Nodulação		Parte aérea	
	Nódulo ⁽¹⁾	Massa seca	Matéria seca	N-total
	(N° vaso ⁻¹)	mg vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	mg vaso ⁻¹
1C	73,5 a	330,00 c	1,78 de	36,93 de
3C	53,0 b	317,00 cd	1,68 defg	34,81 defg
6C	37,8 c	253,00 de	1,30 ghi	27,01 ghi
1C : 3C	27,9 cd	193,00 ef	3,58 b	74,00 b
1C : 6C	8,3 fg	166,00 fg	3,39 b	70,10 b
3C : 6C	22,6 de	167,33 fg	3,53 b	73,20 b
1D	64,9 ab	441,00 b	1,61 defgh	33,25 defgh
2D	61,8 ab	417,00 b	1,80 de	37,20 de
1D : 2D	37,9 c	256,66 de	1,86 de	38,50 d
1C : 1D	26,2 de	180,00 f	1,22 hi	25,20 hi
3C : 1D	28,9 cd	155,00 fg	1,45 efghi	29,93 efghi
6C : 1D	9,0 f	106,00 g	1,33 fghi	27,47 fghi
1C : 2D	25,6 de	172,66 fg	2,95 c	61,15 c
3C : 2D	23,9 de	164,00 fg	1,83 de	37,94 de
6C : 2D	27,9 cd	156,00 fg	1,75 def	36,20 de
1C : SEMIA 5019	20,9 de	145,00 fg	1,59 defgh	33,00 defgh
3C : SEMIA 5019	2,7 h	20,00 h	1,78 de	36,78 de
6C : SEMIA 5019	3,2 gh	23,00 h	1,90 d	39,44 d
1D : SEMIA 587	17,0 e	136,00 fg	1,72 defg	35,56 def
2D : SEMIA 587	30,7 cd	198,00 ef	3,23 bc	68,88 bc
SEMIA 587	69,9 a	615,00 a	1,92 d	39,79 d
SEMIA 5019	22,8 de	143,66 fg	1,25 i	21,81 i
TA	—	—	0,71 j	7,31 j
TN	—	—	7,18 a	126,03 a
CV (%)	17,5	14,4	17,8	15,7

⁽¹⁾ Dados transformados por $\sqrt{x+1}$.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. TA – testemunha absoluta; TN – testemunha nitrogenada.

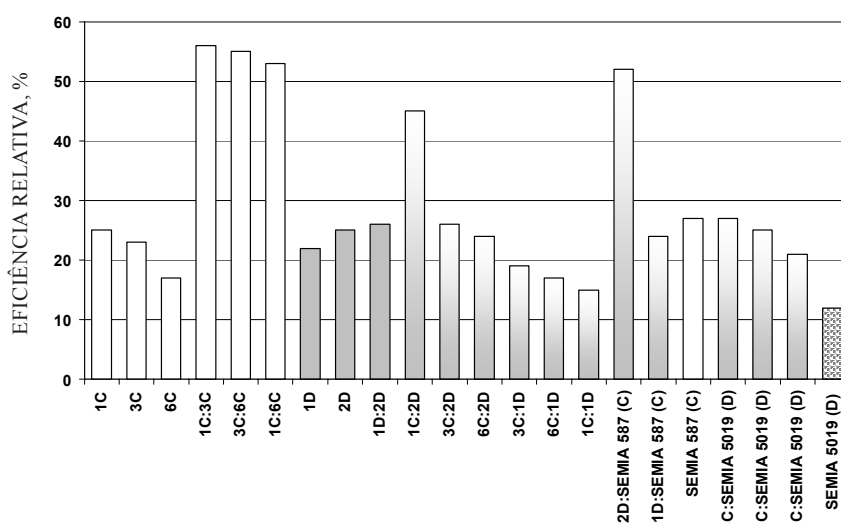


Figura 3. Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e, ou, variantes de *Bradyrhizobium elkanii*, em relação ao N total acumulado em soja cultivar BR-16, 35 dias após o plantio.

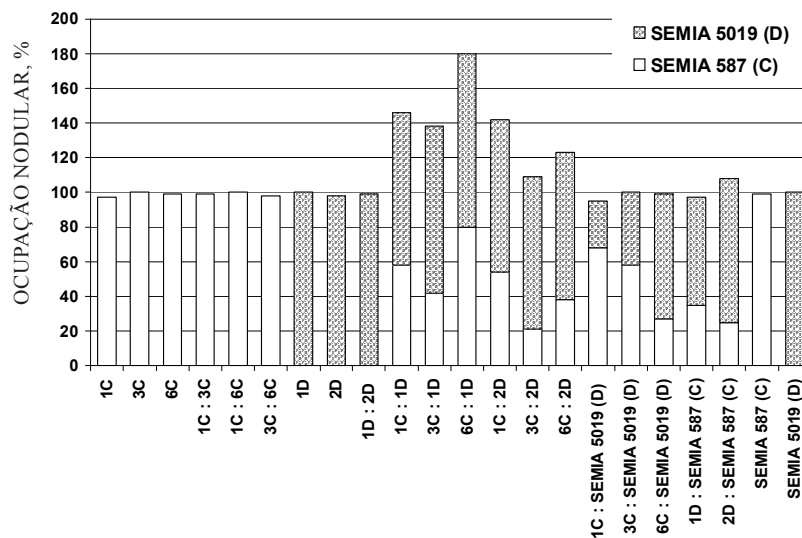


Figura 4. Percentagem de ocupação nodular dos tratamentos inoculados com variantes e estirpes de *B. elkanii*, isolados e em mistura (1:1).

original, Hahn & Studer (1986) observaram uma elevada percentagem de nódulos com dupla ocupação, sendo sugerido pelos autores que uma alta densidade de inóculo (10^8 e 10^9 células planta⁻¹) seja requerida para que ocorra uma elevada frequência de infecções mistas, uma vez que, após inoculação com uma mistura com baixa concentração celular (10^2 a 10^3 bactérias mL⁻¹), poucos nódulos apresentaram dupla ocupação.

No presente estudo, constatou-se que o determinante da maior eficiência em tratamentos co-inoculados não foi a ocupação nodular de determinada estirpe ou variante presente no inóculo, mas, sim, a interação destes no tratamento co-inoculado, demonstrando como é complexa e variável a interação entre os rizóbios que apresentam diferentes graus de eficiência e competitividade (Daramola et al., 1994). É importante enfatizar que o experimento de competitividade foi realizado sob condições controladas, eliminando-se, assim, grande número de fatores e interações que são extremamente importantes nos estudos de competitividade. Desta forma, para confirmação dos resultados obtidos, é necessária a realização de experimentos posteriores sob condições de campo cultivado com população estabelecida de bradirrizóbios noduladores de soja.

CONCLUSÃO

1. No presente estudo, foi observado que variantes com diferentes potenciais para fixação de nitrogênio podem coexistir numa mesma população de bradirrizóbios, podendo alterar a eficiência simbiótica e a competitividade das estirpes utilizadas em inoculantes para a cultura da soja.

LITERATURA CITADA

- BANGEL, E.V. Caracterização de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. 114p. (Tese de Mestrado)
- BODDEY, L.H. Determinação das características das espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* nas estirpes brasileiras noduladoras de soja. Londrina, Universidade Estadual de Londrina, 1995. 130p. (Tese de Mestrado)
- BROMFIELD, E.S.P & JONES, D.G. Studies on double strain occupancy of nodules and the competitive ability of *Rhizobium trifolii* on red and white clover grown in soil and agar. *Ann. Appl. Biol.*, 94:51-59, 1980.
- CHAMPION, R.A.; MATHIS, J.N.; ISRAEL, D.W. & HUNT, P.G. Response of soybean to inoculation with efficient and inefficient *Bradyrhizobium japonicum* variants. *Crop Sci.*, 32:457-463, 1992.
- DARAMOLA, D.S.; DANSO, S.K.A. & HARDARSON, G. Nodulation, N₂ fixation and dry matter yield of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) inoculated with effective and ineffective *Bradyrhizobium japonicum* strains. *Soil Biol. Biochem.*, 26:883-889, 1994.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Tecnologias de produção da soja - Região central do Brasil 2003. Londrina, Embrapa Soja : Embrapa Cerrado : Embrapa Agropecuária Oeste : ESALQ, 2002. 199p.
- HAHN, M. & STUDER, D. Competitiveness of a *nif*⁻ *Bradyrhizobium japonicum* mutant against the wild-type strain. *FEMS Microbiol. Letters*, 33:143-148, 1986.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. & PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAÚJO, R.S. & HUNGRIA, M., eds. Microorganismos de importância agrícola. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.9-89.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Levantamento sistemático de produção agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/lspa>>. Acesso em 20 jun. 2001.
- KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Descrição de marcadores endógenos em *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* e utilização em estudos de competição em campo. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 1997. 97p. (Tese de Doutorado)
- KUYKENDALL, L.D. & ELKAN, G.H. *Rhizobium* derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. Appl. Environ. Microbiol., 32:511-519, 1976.
- LEMOS, E.G.M. Classificação e identificação de bradirrízobios que nodulam soja por análise de padrões enzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade de hidrogenase. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 1994. 108p. (Tese de Livre Docência)
- MEYER, M.C. & PUEPPKE, S.G. Differentiation of *Rhizobium japonicum* strain derivatives by antibiotic sensitivity patterns, lectin binding, and utilization of biochemicals. Can. J. Microbiol., 26:606-612, 1980.
- MULLEN, M.D. & WOLLUM II, A.G. Variation among different cultures of *Bradyrhizobium japonicum* strains USDA 110 and 122. Can. J. Microbiol., 35:583-588, 1989.
- NISHI, C.Y.M. Infecção, competitividade e eficiência da fixação biológica do N₂ em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) inoculada com as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Londrina, Universidade Estadual de Londrina, 1995. 115p. (Tese de Mestrado)
- 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, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 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*. R. Bras. Ci. Solo, 8:193-196, 1984.
- ROLFE, B.G.; GRESSHOFF, P.M.; SHINE, J. & VINCENT, J.W. Interaction between a non-nodulating and an ineffective mutant of *Rhizobium trifolii* resulting in effective (nitrogen-fixing) nodulation. Appl. Environ. Microbiol., 39:449-452, 1980.
- SÁ, E.L.S. Diversidade fenotípica e genética de rizóbios isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em solos ácidos de Cunha – SP. Piracicaba, Universidade de São Paulo, 2001. 109p. (Tese de Doutorado)
- SATO, M.L. Sobrevivência e estabilidade genética da SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* submetida à liofilização. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 157p. (Tese de Doutorado)
- SCHWINGHAMER, E.A. & DUDMAN, W.F. Methods for identifying strains of diazotrophs. In: BERGENSEN, F. J. ed. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. New York, John Wiley, 1980, p.337-365.
- TEDESCO, M.J.; GIANELO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 188p. (Boletim Técnico de Solos, 5)
- VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C. & PERES, J.R. Fixação biológica de nitrogênio em solos de Cerrados. Brasília, Embrapa-SPI, 1994. 83p.
- VINCENT, J.M. Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, Blackwell, 1970. 164p.
- VINUESA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; BRUJIN, F.J. & WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic wood legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction fragment Length polymorphism analysis of gens encoding 16S rRNA (16rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. Appl. Environ. Microbiol., 64:2096-2104, 1998.
- WEISER, G.C.; SKIPPER, H.D. & WOLLUM II, A.G. Exclusion of inefficient *Bradyrhizobium japonicum* sero groups by soybean genotypes. Plant Soil, 121:99-105, 1990.