

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA EM SOLOS
CULTIVADOS COM PASTAGENS E CULTURAS ANUAIS DO OESTE
PAULISTA**

LEILA ELVIRA PAVANELLI

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA EM SOLOS
CULTIVADOS COM PASTAGENS E CULTURAS ANUAIS DO OESTE
PAULISTA**

LEILA ELVIRA PAVANELLI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.
Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Fernando Araújo

633.2
P337f

Pavanelli, Leila Elvira.

Fixação biológica de nitrogênio em soja em solos cultivados com pastagens e culturas anuais do Oeste Paulista / Leila Elvira Pavanelli, Presidente Prudente : [s.n.], 2007.
28 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia)
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE:
Presidente Prudente – SP, 2007.

1. *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, nodulação, competitividade. I. Autor. II. Título.

LEILA ELVIRA PAVANELLI

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA EM SOLOS CULTIVADOS
COM PASTAGENS E CULTURAS ANUAIS DO OESTE PAULISTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Produção Vegetal.

Presidente Prudente, 07 de maio de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Fernando Araújo
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Carlos Sérgio Tiritan
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. Rubens José Campo
Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja
Londrina - PR

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Bernardo e Terezinha, que nunca mediram esforços e estiveram sempre presentes em todos os momentos de sua realização. Pela educação exemplar, pelo amor, carinho, confiança e apoio incondicional em todas as minhas decisões.

Dedico também, ao meu noivo, Cesar, pelo amor, compreensão, carinho e por todo o apoio tão imprescindível para que esta caminhada terminasse com sucesso. Essa vitória também é de vocês!

Agradecimentos

A Deus pelo imensurável Dom da vida e pelas valiosas oportunidades concedidas.

A meu orientador, professor Fábio Fernando de Araújo, que muito me ensinou para a vida profissional e pessoal, e em quem encontrei não somente confiança e estímulo, mas amizade.

As amigas dos laboratórios de fitopatologia, genética molecular, bromatologia e solos, Márcia Guaberto, Luciana Guaberto, Edna Torquato e Lindaura Helena, pela ótima amizade, pela atenção, apoio e companheirismo. Obrigada por tudo.

Ao prof. Dr. Sérgio Kronka, pela ajuda e pelas valiosas dicas com a estatística, colaborando na validação do trabalho.

Ao amigo do áudio-visual, Edson, aos funcionários do laboratório de informática Alexandre e Fabrício e a secretária da pós-graduação Keid, pela eficiência e pelo apoio, mesmo que indireto, mas, da mesma forma importante, e pela convivência agradável e cordial.

À Simone Teixeira, Estela Mara, Carol Rubini, Vera Lúcia, Lucas Alves, Luciano Camargo e Lucas Bondezan, pela sincera amizade, pela agradável convivência e pela participação fundamental em todas as etapas. A vocês, só tenho a agradecer pela confiança, companheirismo e os muitos momentos de alegria compartilhados, colaborando enormemente para a conclusão deste trabalho. Compartilho com vocês esta vitória. Muito obrigada!

A meu irmão Carlos Alexandre pelo incentivo e pelo amor prestados.

RESUMO

Fixação biológica de nitrogênio em soja em solos cultivados com pastagens culturas anuais do oeste paulista

Foi realizado um experimento com soja (cv. Conquista), em casa de vegetação, utilizando-se amostras de solo de áreas sob cultivo de pastagens e culturas anuais, oriundas de sete municípios da região oeste paulista. Foram avaliados componentes da fixação biológica de nitrogênio e competitividade das estirpes de *Bradyrhizobium* em resposta à inoculação comercial em soja. Houve resposta à inoculação na maioria dos locais avaliados, o que refletiu na maior nodulação e acúmulo de N total na parte aérea. Os parâmetros número e massa seca de nódulos na raiz de soja apresentaram interação significativa com as variáveis, local e inoculação avaliadas. O aumento da nodulação da soja inoculada em solos ácidos mostra boa adaptação das estirpes recomendadas para o uso em inoculantes comerciais para os locais avaliados. A estirpe SEMIA 5080 foi encontrada na maioria dos nódulos avaliados na tipificação sorológica.

Palavras-Chaves: *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, nodulação, competitividade

ABSTRACT

Fixation of nitrogen in soybean in soils under pasture and annual cultures in the west from São Paulo

An experiment with soybean (cv. Conquista) was conducted in greenhouse, using soil samples of areas under pastures and annual cultures, obtained from seven cities of the region west of São Paulo. It was evaluated nitrogen fixation component and competitiveness of the recommended *Bradyrhizobium* strains in the soybean inoculation. The inoculation in the majority of the treatments had effect which is reflected in the increment in nodulation and total N yield accumulation. The parameter number and dry mass of nodules in the soybean root showed significant interaction with local variables and evaluated inoculation. The increase in the soybean nodulation inoculated in acid soil shows good adaptation of the recommended strains. The strain SEMIA 5080 was found in the majority of the nodules evaluated by serology.

Keywords: *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, nodulation, competitive.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 ARTIGO: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA EM SOLOS CULTIVADOS COM PASTAGENS E CULTURAS ANUAIS DO OESTE PAULISTA	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

A exploração agrícola na região oeste paulista é caracterizada pela predominância da atividade pecuária, com cultivo sucessivo de gramíneas. Este manejo baseado no monocultivo com pouco emprego de técnicas de conservação do solo e correção da acidez, tem ocasionado diversos impactos nas propriedades dos solos da região.

Os solos predominantes na região apresentam concentrações elevadas de ferro, muitas vezes associado à presença de alumínio e baixa concentração de matéria orgânica. As intervenções efetuadas, pela aplicação de insumos agrícolas (corretivos, fertilizantes e herbicidas) têm sido efetuadas, na maioria das vezes, de forma pontual sem plano de manejo sustentável. Sendo observado também que, na maioria das vezes as intervenções efetuadas não têm proporcionado a resposta esperada.

Neste contexto a eficiência de aproveitamento dos fertilizantes minerais, aplicados nestes solos, tem sido muito questionada. Com isto, cada vez mais, busca-se reduzir as perdas de nitrogênio para o ambiente.

Com a expansão da cultura da soja no Brasil, nos últimos anos, algumas propriedades da região oeste paulista foram arrendadas para o plantio desta cultura. Segundo informações da bolsa de arrendamento, na safra 2004/2005, foram cultivadas aproximadamente 100.000 hectares de soja na região. A rotação de cultura, efetuadas nestas áreas, proporciona mudanças nas propriedades química e biológica do solo. Isto devido, principalmente, as mudanças no sistema de cultivo e aplicação intensiva de insumos agrícolas.

A mudança deste perfil agroecológico poderá representar recuperação gradual de alguns fatores nas propriedades do solo importantes para o desenvolvimento agrícola da região, principalmente em áreas sob plantio direto. Além disto, neste processo de recuperação, existe grande contribuição da fixação do nitrogênio atmosférico efetuada por bactérias em simbiose com a soja. Esta fixação de nitrogênio no solo (100 a 160 Kg de N/ha), após alguns anos de cultivo da soja, tem suprido as necessidades de N em diferentes gramíneas cultivadas em sucessão a leguminosa.

Na soja a relação simbiótica para fixação de nitrogênio é efetivada com bactérias pertencentes às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. No entanto, existe uma grande variabilidade, entre as estirpes que nodulam a soja, quanto à eficiência e competitividade.

A soja é uma leguminosa introduzida e uma das poucas espécies que se associa com *B. japonicum*, portanto, é pouco provável a ocorrência natural dessa bactéria em nossos solos, havendo, entretanto, a possibilidade de que algumas estirpes introduzidas no solo sobrevivam e se estabeleçam.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a fixação biológica de nitrogênio em soja, competitividade das estirpes introduzidas em solos de sete municípios do oeste paulista sob cultivo de pastagens e culturas anuais.

2 ARTIGO: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA EM SOLOS CULTIVADOS COM PASTAGENS E CULTURAS ANUAIS DO OESTE PAULISTA

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) é considerada uma das plantas mais antigas do mundo. Segundo a literatura chinesa, possivelmente, tenha sido cultivada na China e Manchúria aos 2.500 a.C. No Brasil, essa leguminosa foi introduzida no século passado, no estado da Bahia. Nas décadas seguintes, a cultura migrou para São Paulo e Rio Grande do Sul, mas apenas nos anos 60, com a expansão do trigo, houve o grande impulso na produção nacional de soja, em decorrência da sucessão do plantio de trigo no Rio Grande do Sul (GOMES, 1990). Desde então, o País vem se destacando no cultivo desta leguminosa, e, em 1976, o Brasil atingiu a vice-liderança mundial na produção de soja, perdendo apenas para os EUA (IBGE, 2001).

A cultura da soja apresenta elevada demanda por nitrogênio, devido ao elevado teor protéico, cerca de 40% nos grãos (BOHRER; HUNGRIA, 1998). Estima-se que sejam necessários cerca de 240 kg de N para a produção de 3.000 kg ha⁻¹ de soja (HUNGRIA et al., 2001). As fontes de N capazes de suprir tal demanda restringem-se aos fertilizantes nitrogenados e pelo processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico. Considerando-se o baixo aproveitamento dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas (em torno de 50%) seria necessária uma quantidade estimada de 480 kg em N para obtenção da produtividade de 3.000 kg ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 1999; MERCANTE, 2005). Essa quantidade de nitrogênio seria equivalente a 1.067 kg de uréia, o que tornaria a cultura da soja, economicamente, inviável para o Brasil (MERCANTE, 2005). Por outro lado, o processo de fixação biológica do nitrogênio, realizado por bactérias da ordem Rhizobiales pode fornecer todo o nitrogênio que a soja necessita, desde que respeitados os procedimentos para uma boa nodulação. A recomendação atual para o cultivo da soja é a utilização de inoculante sem a suplementação com fertilizante nitrogenado. Calcula-se que, com o uso dessa técnica, haja uma economia para o País de, aproximadamente, três bilhões de dólares por ano (MERCANTE, 2005).

As bactérias que nodulam a soja foram classificadas, inicialmente, na espécie *Rhizobium japonicum* (FRED et al., 1932), posteriormente reclassificadas

como *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN, 1982) e, dez anos depois, subdivididas nas espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* (KUYKENDALL et al., 1992). No entanto, há uma grande variabilidade entre as estirpes que nodulam a soja, quanto à eficiência do processo simbiótico e à capacidade competitiva com bactérias estabelecidas no solo (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999). Com o cultivo sucessivo da soja, as estirpes utilizadas nos inoculantes se estabeleceram no solo e, hoje, poucas são as áreas sem uma população rizobiana elevada. Hungria et al., (1994) constataram que os sorogrupos que dominam nos solos brasileiros são das estirpes SEMIA 566, SEMIA 5019 (=29W) e SEMIA 587, caracterizadas pela competitividade elevada.

A região oeste paulista apresenta solos arenosos onde no passado as matas naturais foram substituídas por pastagens e culturas anuais. A mudança na vegetação causa desequilíbrio no ecossistema e as propriedades intrínsecas da nova vegetação influenciam os processos físicos, químicos e biológicos do solo (BERNARDES; SANTOS, 2006). A soja é uma leguminosa introduzida no Brasil e apresenta alta especificidade em relação às estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* com as quais consegue estabelecer uma simbiose efetiva. Assim, é pouco provável a ocorrência natural dessa bactéria em nossos solos, havendo entretanto, a possibilidade de que algumas estirpes introduzidas no solo sobrevivam e se estabeleçam (LIMA et al., 1998).

Objetivou-se avaliar a fixação biológica de nitrogênio em soja e o desempenho das estirpes introduzidas em solos de sete municípios do oeste paulista, sob cultivo de pastagens e culturas anuais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um experimento de avaliação de fixação biológica de nitrogênio em soja, em casa de vegetação, utilizando-se as amostras de solo coletadas em sete municípios da região oeste paulista.

A área de estudo situa-se na zona fisiográfica denominada de Pontal do Paranapanema, pertencente à Unidade de gerenciamento de Recursos Hídricos Pontal do Paranapanema (UGRHI – 22), com 11.838 km², localizada no oeste do Estado de São Paulo e formada por 26 municípios. Nessa região, foram selecionados sete municípios representativos, nos aspectos edafoclimáticos e geográficos, para amostragem e coleta de solos. Nesses municípios foram escolhidas duas propriedades rurais para coleta de solo, uma com cultivo de soja e outra com pastagens, ambas com histórico de, no mínimo, três anos com cada cultura. Para coleta de amostra de solo, em cada área de manejo, foi realizada uma subamostragem em oito pontos (na profundidade 0-0,20 m) dentro de um hectare representativo do local. A profundidade de coleta foi escolhida por representar a camada do solo com maior atividade biológica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Para a avaliação da fertilidade do solo (Tabela 1) as amostras de cada local, foram submetidas à análise química da terra, utilizando-se metodologia descrita por Van Raij e Quaggio (1983).

O experimento para a avaliação de fixação biológica de nitrogênio em soja, em casa de vegetação, teve início em 20 de setembro de 2005 e foi realizado utilizando-se o solo coletado nos municípios da região. Os solos de cada localidade foram acondicionados em vasos com capacidade para 1kg. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, empregando-se um fatorial de 7(municípios) x 2 (cultivos) x 2 (tratamentos, inoculado e não inoculado) com quatro repetições.

Para a inoculação das sementes foi utilizado inoculante turfoso comercial (concentração de $1,0 \cdot 10^9$ células g⁻¹) o qual continha as quatro estirpes de *Bradyrhizobium* (SEMIA 587, 5019 5079 e 5080) recomendadas pela pesquisa. A dosagem utilizada foi de 500 g de inoculante para 50 Kg de semente, recomendada pelo fabricante quando do plantio da soja em solo de primeiro cultivo da soja. A inoculação foi realizada com o umedecimento prévio das sementes de soja com uma solução açucarada (10% p v⁻¹) na proporção de 6 ml Kg⁻¹ de semente. Cinco

sementes de soja cultivar conquista foram semeadas e após a emergência, foi feito o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso, que foram conduzidas durante 50 dias, sob condições ambiente. Decorrido este período, as plantas foram coletadas e a parte aérea separada das raízes, as quais foram lavadas em água corrente, e, posteriormente, destacados os nódulos para contagem. A parte aérea e os nódulos foram pesados após a secagem em estufa (65°C), com aeração forçada até a obtenção de massa seca constante. Em seguida amostras da parte aérea seca foram submetidas a análise foliar de N total seguindo metodologia descrita por Malavolta et al. (1997)

TABELA 1 - Caracterização química dos solos em cada município escolhido para o experimento em ambas as culturas

Local	pH CaCl ₂	M.O. dm ⁻³	H+Al K ----- ----- ----- -----	Ca mmolc	Mg dm ⁻³	P S ---mg dm ⁻³	TC molc dm ⁻³	V %		
Taciba cultura	3,9	12	45	4	1	2,0	50	1,3	52	13
Taciba pastagem	5,3	19	25	25	19	4,8	57	17,8	74	66
Anhumas cultura	5,3	10	23	29	6	3,4	14 1	1,3	61	63
Anhumas pastagem	4,5	9	25	5	2	1,6	4	1,3	34	25
Iepê cultura	5,7	28	23	38	33	4,1	11 5	5,3	98	77
Iepê pastagem	5,2	24	27	20	12	6,0	15	18,0	65	59
P. Venceslau cultura	4,6	11	27	4	4	1,3	3	1,3	36	26
P. Venceslau pastagem	4,4	11	28	4	3	1,1	3	4,4	36	22
S. Anastácio cultura	5,0	13	21	8	7	4,4	5	1,3	40	48
S. Anastácio pastagem	4,9	26	33	15	9	2,5	16	3,9	60	44
Rancharia cultura	5,0	7	19	6	4	1,2	4	1,3	30	38
Rancharia pastagem	4,8	7	22	7	3	0,6	3	1,3	32	33
T. Sampaio cultura	4,3	17	59	5	3	0,7	3	3,9	68	13
T. Sampaio pastagem	4,1	19	24	2	1	0,5	3	1,7	28	13

Os nódulos coletados dos tratamentos: inoculado e não inoculado, com pelo menos dois milímetros de diâmetro e coloração rósea, foram submetidos ao procedimento descrito por Hungria e Araújo (1994), para isolamento e autenticação

do rizóbio presente no interior dos mesmos. Para o isolamento do rizóbio, foram utilizados dezesseis nódulos de cada tratamento que representava local inoculado com estirpes conhecidas, sendo coletados quatro nódulos por repetição. O método consistiu em imergir os nódulos, por cerca de 5 a 10 segundos, em álcool a 90%.

A seguir, os nódulos foram transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 3%. Os nódulos, depois de retirados da solução, foram lavados por cinco vezes em água destilada e esterilizada. Toda manipulação foi feita em câmara asséptica. Após a última lavagem, os nódulos foram colocados em tubo de ensaio contendo 5 mL de água estéril onde, com auxílio de um bastão de vidro, foram amassados. Na seqüência, foi introduzida a ponta da alça de platina no tubo de ensaio e, em seguida, procedeu-se a riscagem em placa de petri contendo meio de cultura YM (VINCENT, 1970), com corante vermelho congo. Esse corante foi utilizado para facilitar a observação de contaminantes, que absorvem a cor vermelha, enquanto que as colônias de rizóbio absorvem muito pouco este corante, principalmente se forem novas. As placas foram mantidas a 25° C em estufa bacteriológica e o crescimento do rizóbio foi verificado diariamente. Não foi possível realizar isolamento dos nódulos de todos os municípios devido problemas encontrados na conservação dos mesmos.

Para comprovação inicial do rizóbio, foram feitas preparações para visualização no microscópio e o teste de coloração de Gram (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994). A autenticação final do rizóbio foi efetivada por teste sorológico. Neste caso o antígeno celular foi preparado conforme metodologia descrita por Fuhrmann e Wollum (1985), a partir das bactérias previamente isoladas dos nódulos de soja. Após a preparação dos antígenos (suspensão contendo as bactérias isoladas dos nódulos), foram realizados os procedimentos do teste ELISA. Os poços das placas foram preenchidos com 100 µL de antígeno e incubou-se a temperatura ambiente por 1 hora. Lavaram-se as placas com solução tampão PBS-Tween (tampão fosfato salinizado com Tween): NaCl – 8,0 g; KH₂PO₄ – 0,20 g; Na₂HPO₄.12H₂O – 2,90 g; KCL – 0,20 g; NaNO₃ – 0,20 g + Tween – 0,5 mL e H₂O - 1.000 mL; pH 7,4), por quatro vezes, secando-se bem entre as lavadas e cuidando-se para não haver contaminação entre os compartimentos. Adicionaram-se 100 µL de antissoro, diluído em tampão PBS (1:3000), por compartimento (um compartimento para cada sorogrupo testado). Os antissoros das estirpes SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080 foram cedidos pelo laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja, Londrina - PR.

Incubou-se a 28°C por 1 hora e em seguida, lavou-se como descrito anteriormente. Adicionaram-se, então, 100 µl do conjugado (imunoglobulina IgG de cabra conjugados com fosfatase alcalina, produzidos contra imunoglobulinas de coelho SIGMA #A8025), diluído 5.000 vezes em PBS-Tween (solução fresca). As placas foram mantidas em geladeira (4°C) por 16 horas. Decorrido esse período, lavou-se como descrito acima e adicionaram-se 100 µl de solução fresca de substrato (p-nitrofenil fosfatase) contendo 1 mg mL⁻¹ de tampão. Incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos, até a cor amarela das reações positivas aparecerem. As leituras de absorbância, depois do desenvolvimento da reação, foram realizadas utilizando espectrofotômetro (leitor para placas de Elisa), dotado de um filtro de interferência de 405 nm.

Realizou-se análise estatística dos dados utilizando-se o programa SISVAR. Para comparação das médias foi utilizado o teste de Scott-Knott (5%) e, para comparação dos produtos médios, foi utilizado o teste de Tukey a 1%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relacionados à nodulação (número e massa seca de nódulos) apresentaram, pela análise de quadrados médios, interações significativas entre local de coleta da amostra de solo e inoculação efetuada (Tabela 2). Dessa forma, a nodulação serviria como parâmetro mais confiável para avaliar a resposta à inoculação nos solos avaliados. Bohrer e Hungria (1998), em experimento para selecionar genótipos de soja com melhor resposta à inoculação com *Bradyrhizobium* spp. também concluíram que o parâmetro de nodulação seria o mais indicado para esta seleção.

TABELA 2 - Quadrados médios obtidos em experimento com soja (cv. Conquista) com e sem inoculação, em solo de diferentes locais (municípios) da região oeste paulista

Tratamentos	Nº de nódulos	Massa seca de nódulos	Massa seca da parte aérea	Massa seca de raiz
Locais	5,958 ^{**1}	99,0 ^{**}	2,0113 ^{**}	1,1744 ^{**}
Inoculação	0,851 ^{**}	60,0 ^{**}	0,4973 ^{ns}	0,2701 ^{ns}
Locais x inoculação	8,609 ^{**}	6,0 ^{**}	0,1994 ^{ns}	0,1988 ^{ns}
CV (%)	4,25	8,80	33,60	38,90

1-^{**} Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A nodulação da soja foi incrementada na maioria dos locais, quando se procedeu à inoculação (Tabela 3), excetuando-se o solo de Taciba pastagens, que proporcionou melhor nodulação quando não se procedeu a inoculação. Os municípios Anhumas, Presidente Venceslau e Santo Anastácio apresentaram baixa nodulação quando não inoculados. Esses municípios, pelos relatos obtidos no local, constituem áreas recentes de entrada da cultura da soja na região (últimos quatro anos). Os solos do município de Taciba apresentaram boa nodulação, revelando que nestes possa existir população de *Bradyrhizobium* spp. estabelecida, decorrente de provável aplicação de inoculantes de soja no passado. Este município também é considerado como a área mais antiga da entrada da soja na região oeste paulista.

Os solos do município de Teodoro Sampaio e Rancharia pastagem apresentaram baixo número de nódulos representando falta de resposta à inoculação. Coincidentemente, esses solos também apresentaram baixo padrão de fertilidade (Tabela 1). Esse fato pode reforçar a tese de que, a baixa fertilidade do solo tenha sido limitante ao desenvolvimento da simbiose. Na comparação entre os municípios, foi mostrado que existe efeito de local e inoculação da soja (Tabela 2), indicando que fatores de classificação e fertilidade de solo são fundamentais para o desenvolvimento da soja na região. Graham e Temple (1984) citam que condições de baixa fertilidade e altas doses de N combinado, podem afetar a nodulação de leguminosas.

Cattelan e Hungria (1994) concluíram que uma planta de soja bem nodulada pode ser considerada aquela que, na época do florescimento, apresente entre 15 a 30 nódulos na raiz. Neste trabalho, foi encontrada nodulação acima de 15 nódulos por planta, antes do florescimento, em solos de oito tratamentos, ou seja, em 60% dos locais avaliados, sendo a inoculação considerada satisfatória. Foi observado que o rizóbio apresentou boa adaptação a solos ácidos, nodulando bem a soja mesmo em solos com pH inferior a 5,0. Desse modo, pode-se reafirmar o que já foi citado por Silva et al. (2002), de que as estirpes estabelecidas no solo, bem como as presentes no inoculante, estão adaptadas a esta característica, encontrada com frequência nos solos da região oeste paulista. Sendo este fato alertado por Hungria et al. (2001) quando relataram que o trabalho de inoculação pode ser perdido se o agricultor não realizar calagem na dose adequada e com antecedência.

Foi observado, também, que o cultivo atual do solo (cultura ou pastagem) não interferiu no desempenho da nodulação na maioria das áreas avaliadas. Apenas em três municípios avaliados (Taciba, Anhumas e T. Sampaio), o cultivo de culturas anuais foi mais benéfico que o de pastagens no quesito de nodulação de plantas inoculadas (Tabela 3).

TABELA 3 - Nodulação (nº de nódulos por planta) em soja (cv. conquista) inoculada e não inoculada, cultivada em solos de municípios da região oeste paulista

Tratamentos	Inoculado	Não inoculado
Taciba cultura	49,10 a	38,31b
Taciba pastagem	37,21 b	49,84 a
Anhumas cultura	52,85 a	29,70 b
Anhumas pastagem	4,84 d	6,30 d
Iepê cultura	15,21 c	22,65 c
Iepê pastagem	17,55 c	20,34 c
P. Venceslau cultura	14,66 c	2,07 d
P. Venceslau pastagem	14,35 c	5,85 d
S. Anastácio cultura	20,77 c	2,95 d
S. Anastácio pastagem	19,89 c	2,85 d
Rancharia cultura	14,06 c	7,67 d
Rancharia pastagem	12,46 c	5,95 d
T. Sampaio cultura	13,98 c	6,00 d
T. Sampaio pastagem	10,89 d	8,88 d

Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente. Teste realizado Scot-Knott (5%).

A avaliação de massa seca de nódulos em soja, cultivada nos solos dos diferentes locais (Tabela 4), revelou diferença significativa apenas em três locais inoculados (Taciba pastagem, Anhumas cultura e P. Venceslau cultura). Esta avaliação também mostra que diferenças encontradas na avaliação de número de nódulos pode não se repetir na avaliação de massa seca de nódulos, conforme encontrado em Taciba pastagens e Teodoro Sampaio. Este fato pode indicar que ambos parâmetro número e massa seca de nódulos sejam aceitáveis para avaliar a nodulação em soja inoculada, contudo dependendo da época de avaliação pode ser encontrado diferenças. Isto porque a curva de aumento da massa seca de nódulos é

diferente da curva de número de nódulos, podendo aumentar com o desenvolvimento da soja (LIMA et al., 1998).

TABELA 4 - Massa seca de nódulos (mg pl^{-1}) em soja (cv. conquista) inoculada e não inoculada, cultivada em solos de municípios da região oeste paulista

Tratamentos	Inoculado	Não inoculado
Taciba cultura	110 b	115 a
Taciba pastagem	173 a	168 a
Anhumas cultura	245 a	130 a
Anhumas pastagem	30 b	50 b
Iepê cultura	83 b	82 b
Iepê pastagem	68 b	60 b
P. Venceslau cultura	150 a	68 b
P. Venceslau pastagem	85 b	77 b
S. Anastácio cultura	80 b	20 b
S. Anastácio pastagem	108 b	15 b
Rancharia cultura	108 b	65 b
Rancharia pastagem	115 b	107 b
T. Sampaio Cultura	43 b	25 b
T. Sampaio pastagem	20 b	17 b

Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente. Teste realizado Scott-Knott (5%).

Com relação ao desenvolvimento das plantas, avaliado pela produção de massa seca (Tabela 5), observou-se que as respostas à inoculação não proporcionaram aumento de massa seca na maioria dos locais no momento desta avaliação (50 dias). Este fato confirma o que foi encontrado por Lira Júnior et al. (1993), que observaram ausência de resposta à inoculação na produção de massa seca em soja cultivada em vasos com solo não esterilizado. As diferenças significativas de produção de massa seca encontradas nos diferentes solos pode ter sido resposta ao padrão de fertilidade encontrado em cada um dos locais avaliados (Tabela 1). Os solos de Taciba pastagem e Anhumas cultura apresentaram os

maiores valores de produção de massa seca de soja quando inoculados. Foi observado que o efeito de acidez do solo foi determinante, em alguns locais, como fator limitante ao desenvolvimento da cultura.

TABELA 5 - Massa seca da parte aérea de soja (cv. conquista) inoculada e não inoculada, cultivada em solos de diversos municípios da região oeste paulista

Tratamentos	Inoculado	Não inoculado
Taciba cultura	0,73 c	0,87 c
Taciba pastagem	2,13 b	1,89 b
Anhumas cultura	2,94 a	1,86 b
Anhumas pastagem	1,30 c	1,07 c
Iepê cultura	1,36 c	1,08 c
Iepê pastagem	1,06 c	1,28 c
P. Venceslau cultura	0,79 c	0,77 c
P. Venceslau pastagem	1,02 c	1,00 c
S. Anastácio cultura	1,13 c	1,38 c
S. Anastácio pastagem	1,59 b	1,40 c
Rancharia cultura	0,95 c	0,92 c
Rancharia pastagem	0,76 c	1,06 c
T. Sampaio cultura	1,23 c	0,99 c
T. Sampaio pastagem	0,58 c	0,44 c

Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente. Teste realizado Scott-Knott (5%).

A avaliação de acúmulo de N na parte aérea, mostrou que a maioria dos tratamentos inoculados apresentou incremento desse nutriente nas folhas (Tabela 6). Esses resultados confirmam a importância da inoculação da soja no melhor aproveitamento do N atmosférico, ou seja, na eficiência da fixação de N pelas plantas cultivadas em solos de primeiro cultivo ou com baixa população de rizóbio (HUNGRIA et al., 2001). O maior valor encontrado de acúmulo de N nas

plantas foi observado no tratamento Anhumas cultura. Este tratamento também apresentou a maior concentração de fósforo solúvel no solo (Tabela 1), o que pode indicar que esse solo tenha recebido adubação mineral recentemente, o que pode ter influenciado no desenvolvimento da soja. A acidez do solo encontrada em alguns municípios avaliados, não foi fator importante para limitar o acúmulo de N na parte aérea na maioria dos locais avaliados, fato este também observado por Silva et al. (2002), quando avaliaram a calagem e a inoculação da soja cultivada em solos ácidos. O cultivo atual do solo, na maioria dos locais, não influenciou no aumento de N total na parte aérea da soja.

TABELA 6 - Nitrogênio total na parte aérea (mg por planta) em soja (cv. conquista) inoculada e não inoculada, cultivada em solos de municípios da região oeste paulista

Tratamentos	N total na parte aérea (mg pl ⁻¹)	
	Inoculado	Não inoculado
Taciba cultura	19,60 e	29,48 d
Taciba pastagem	59,06 b	46,67 c
Anhumas cultura	86,61 a	54,83 b
Anhumas pastagem	24,74 d	20,72 e
Iepê cultura	25,88 d	-
Iepê pastagem	27,02 d	35,66 d
P. Venceslau cultura	18,98 e	15,99 e
P. Venceslau pastagem	27,13 d	20,56 e
S. Anastácio cultura	24,74 d	20,45 e
S. Anastácio pastagem	41,74 c	15,68 e
Rancharia cultura	19,53 e	15,93 e
Rancharia pastagem	17,58 e	15,68 e
T. Sampaio Cultura	29,64 d	19,69 e
T. Sampaio pastagem	14,79 e	10,10 f

Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente. Teste realizado Scott-Knott (5%).

Os resultados de sorologia encontrados demonstram que o sorogrupo SEMIA 5079 predominou na ocupação dos nódulos avaliados (Tabela 8). Este fato confirma o indicado por Vargas et al. (1992) sobre a adaptação dessa estirpe para solos de cerrado, revelando com isso, que as propriedades do solo influenciam na competitividade das estirpes do inoculante (LIRA JÚNIOR, 1993). A ausência de reações positivas nos nódulos coletados na área de pastagem em Taciba revela também, que possa existir estirpes de *Bradyrhizobium* adaptadas e estabelecidas nestes solos, resultantes de possíveis inoculações de soja no passado.

TABELA 7 - Porcentagem de nódulos com reações positivas, pelo teste Elisa, com antissoros de quatro estirpes (sorogrupos) inoculadas em soja, em solos de três municípios do oeste paulista

Tratamento	Sorogrupos				
	87	019	079	080	N.I
Taciba pastagem	0	0	0	0	00
Taciba cultura	0	0	0	0	50
S. Anastácio pastagem	0	0	00	0	0
S. Anastácio cultura	0	0	89	1	0
Rancharia cultura	0	0	80	20	0

5 CONCLUSÕES

- A inoculação da soja cultivada nos solos avaliados apresentou incrementos de nodulação e fixação de N.
- O histórico de cultivo dos solos, avaliados em diferentes municípios, teve pouca influência nos parâmetros da fixação biológica de N.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p.1 633-1643, 1999.

BERNARDES, C. M.; SANTOS, M. A. População microbiana como indicadora de interferência de diferentes manejos de solos de cerrado com cultivo de soja. **Bioscience journal**, Uberlândia, v. 22, p. 7-16, 2006.

BOHRER, T. R. J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 937-952, 1998.

CATTELAN, A. J.; HUNGRIA M. Nitrogen nutrition and inoculation. In: FAO (ed.) **Tropical soybean – improvement and production**. Rome: FAO, 1994.

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

FUHRMANN, J. J.; WOLLUM, A. G. Simplified enzima-linked immunorbent for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 49, p. 1010-1013, 1985.

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

GRAHAM, P. H.; TEMPLE, S. R. Selection for improved nitrogen fixation in *Glycine max* (L.) Merrill and *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 82, p. 315-327, 1984.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. 542 p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; VARGAS, M. A. T.; ANDRADE, D. S. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosa de grãos. In: REUNIÃO BRASILEIRA FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23, REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRÍZAS, 7., **Anais...** Caxambu, UFLA, 1999. p. 597-620.

HUNGRIA, M.; CAMPO, J. R.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina : EMBRAPA-CNPSO, 2001. 48 p.

HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 9-89.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Levantamento sistemático de produção agrícola, 2001. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticias_visualiza.php?id_noticia=498&id_pagina=1>. Acesso em 27 de fevereiro de 2007.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriological**, Washington, v. 32, p. 136-139, 1982.

KUYKENDALL, L. D. et al. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum*, Jordan, 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 501-505, 1992.

LIMA, S. C.; LOPES, E. S.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de rizóbios (*Bradyrhizobium japonicum*) e produtividade da soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, p. 360-366, 1998.

LIRA JUNIOR, M. A. et al. Competitividade de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* em fase de recomendação para a cultura da soja. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v. 17. p. 185-191, 1993.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: Associação Brasileira para pesquisa de potassa e do fosfato, 1997. 201 p.

MERCANTE, F. M. **Uso de inoculante garante economia de 3 bilhões de dólares na cultura soja no país**. Disponível em: <http://www.embrapa.br/noticias/artigos/folder.2005-02-02.1550581232/artigo.2005-12-05.0506770395/mostra_artigo>. Acesso em: 05 de dezembro de 2006.

MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

SILVA, A. F.; FREITAS, A. D. S.; STAMFORD, N. P. Efeito da inoculação da soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, p. 1327-1333, 2002.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.

VAN RAIJ, B.; QUAGGIO, J. A. **Método de análise de solo para fins de fertilidade**. Campinas: Instituto agrônomo, 1983. 31 p. (Boletim técnico, 81).

VARGAS, M. A. T. et al. **Duas novas estirpes para a inoculação da soja**. Planaltina: Embrapa cerrados, 1992. 3 p. (Comunicado técnico, 62).