

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Fracionamento isotópico do ^{15}N na fixação biológica
de nitrogênio na soja em função da intensidade de
luz e estirpe de *Bradyrhizobium* spp. inoculada**

Karla Emanuelle Campos Araujo

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**FRACIONAMENTO ISOTÓPICO DO ^{15}N NA FIXAÇÃO
BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA SOJA EM FUNÇÃO DA
INTENSIDADE DE LUZ E ESTIRPE DE *BRADYRHIZOBIUM* SPP.
INOCULADA**

KARLA EMANUELLE CAMPOS ARAUJO

Sob a Orientação do Pesquisador
Segundo Sacramento Urquiaga Caballero

Co-orientação do Pesquisador
Robert Michael Boddey

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre, em Ciências**, no curso de Pós-graduação em Fitotecnia.

Seropédica, R J
Julho de 2014

633.34

A663f

T

Araújo, Karla Emanuelle Campos, 1982-

Fracionamento isotópico do ¹⁵N na fixação biológica de nitrogênio na soja em função da intensidade de luz e estirpe de *Bradyrhizobium* spp. Inoculada / Karla Emanuelle Campos Araújo. - 2014.

50f. : il.

Orientador: Segundo Sacramento Urquiaga Caballero. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Bibliografia: f. 35-40.

1. Soja - Cultivo - Teses. 2. Soja - Inoculação - Teses. 3. Soja - Fotomorfogênese - Teses. 4. Nitrogênio - Fixação - Teses. 5. Micro-organismos do solo - Teses. I. Urquiaga Caballero, Segundo Sacramento, 1950- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

KARLA EMANUELLE CAMPOS ARAUJO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Ciências** no curso de Pós-graduação em Fitotecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/07/2014

Robert Michael Boddey. Ph. D. Embrapa Agrobiologia
(Co-orientador)

Jorge Jacob Neto. Dr. UFRRJ

Luís Henrique de Barros Soares. Dr. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Paulo e Adelite por fazerem da minha vida uma alegria constante e serem tão amáveis, em todos os momentos.

Dedico com amor.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus.

À minha mãe, pela paciência, dedicação, apoio, amizade, carinho e amor.

Aos meus irmãos Tália e Tadeu, por serem sempre tão companheiros.

Aos meus amados sobrinhos, por tornarem meus dias mais felizes.

À Carlos Vergara, pela amizade, dedicação, compreensão e ajuda.

As minhas amigas e companheiras de jornada durante o mestrado, Mara Alexandre, Giovanna Eika e Pâmela Difanir.

Aos meus amigos de sempre e longa data, Samuel, Michelle, Júlia, Margarida, Fabiana, Cláudia, Claudizângela, Alessandra e Thamara. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida.

Aos amigos do laboratório de Ciclagem de Nutrientes, Ricardo, Selenobaldo, Nivaldo, Márcio, Josimar, Fernando, Thais, Felipe, Selmo, Rodrigo, Ianca, Lucero, Felizardo, Luiz Claudio por toda ajuda e boa convivência.

Aos analistas da EMBRAPA Agrobiologia, Andréia Loviane e em especial ao Renato Moutinho, pela a realização das análises realizadas nas plantas.

Aos laboratoristas da EMBRAPA Agrobiologia, Roberto Grégio, Ednelson e Altiberto pela realização das análise das plantas.

Aos funcionários da EMBRAPA Agrobiologia, Roberto Carlos, Alderi, Claudinho, Naldo, Ernani, Nivaldo, Aurélio, Arley pela amizade, paciência e participação na condução do experimento.

Ao Robert Boddey e a Ana Paula Guimarães, por todos os ensinamentos, orientação, disponibilidade e principalmente pela paciência.

Ao Bruno Alves, por seus ensinamentos, colaboração, e apoio nos trabalhos realizados.

Ao Segundo Urquiaga pelo incentivo e por permitir desenvolver o treinamento científico sob sua orientação.

Ao professor Jorge Jacob, pela participação na banca de defesa da dissertação e por todos os ensinamentos na graduação.

Ao Luís Henrique e sua equipe, pelo fornecimento dos inoculantes e pela sua participação na banca de defesa da dissertação.

À Embrapa Agrobiologia e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela capacitação e formação.

BIOGRAFIA

Karla Emanuelle Campos Araujo nasceu na cidade de Araripina, PE, em 28 de agosto de 1982. Chegou à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2002, diplomando-se em Licenciatura em Ciências Agrícolas em 2006. Ingressou no Curso de Mestrado em Fitotecnia em 2012, concluindo na presente data, a dissertação sob a orientação dos Drs. Segundo Urquiaga e Robert Michael Boddey.

RESUMO GERAL

ARAÚJO, Karla Emanuelle Campos. Fracionamento isotópico do ^{15}N na fixação biológica de nitrogênio na soja em função da intensidade de luz e estirpe de *Bradyrhizobium* spp. inoculada. 2014. 40f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Este trabalho teve como objetivo estudar o fracionamento isotópico do N proveniente da FBN, em função de estirpes e intensidade de luz na simbiose da planta de soja com *Bradyrhizobium*. O valor 'B' foi avaliado para dez estirpes de *Bradyrhizobium*, assim como sua interação com a planta de soja (*Glycine max*, L.). Foi conduzido o experimento na casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. As plantas de soja inoculadas com as diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e um controle, não inoculado, foram crescidas em condições semelhantes em vasos Leonard, utilizando substrato de areia e vermiculita na proporção 2:1 (v/v). No segundo experimento para avaliar o valor 'B' da FBN resultante da simbiose entre as cultivares (cv) de soja BRS 133, BRS 184, MONSOY9144 e nove estirpes de *Bradyrhizobium*. As plantas de soja para todos os tratamentos, foram crescidas em condições iguais, o cultivo da soja foi realizado em vasos Leonard, utilizando substrato de areia e perlita na proporção 1:1 (v/v). Nos dois experimentos após 47 dias do plantio as plantas foram colhidas e calculou o valor 'B'. No terceiro experimento avaliou-se o efeito de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e da redução na intensidade de luz sobre abundância natural de ^{15}N do N_2 fixado pelas estirpes em simbiose com a cv. de soja BRS 133. Foi conduzido um experimento no campo experimental da Embrapa Agrobiologia. As plantas de soja inoculadas com 11 estirpes de *Bradyrhizobium* e um tratamento não inoculado, foram crescidas em condições semelhantes em vasos plásticos, utilizando substrato de areia e perlita na proporção 1:1 (v/v). Após 75 dias do plantio as plantas foram colhidas e calculou-se o valor 'B'. No experimento 1, os valores de ' B_{pa} ' variaram entre -2 e -4 ‰, de acordo com a estirpe usada. No experimento 2, os valores de ' B_{pa} ' não apresentaram diferença entre as cultivares de soja inoculadas com os *Bradyrhizobium* quanto a abundância isotópica de ^{15}N nas plantas crescida inteiramente dependente da FBN. Houve uma tendência para a abundância de ^{15}N nos valores de ' B_{pa} ' das plantas dos tratamentos inoculados com estirpes de *B. elkanii* a serem menos negativo do que no caso de plantas inoculadas com *B. japonicum*. No experimento 3 os valores de ' B_{pa} ' apresentaram valores de abundância natural de ^{15}N significativamente mais negativos do que as plantas sombreadas. Houve uma tendência para a abundância de ^{15}N na parte aérea (e os valores de ' B_{pa} ') das plantas dos tratamentos inoculados com estirpes de *B. japonicum* a serem menos negativo do que no caso de plantas inoculadas com *B. elkanii*. Para à determinação do valor 'B', as plantas devem estar no mesmo estágio de maturidade que as que estão sendo utilizadas para amostrar as plantas no campo, a avaliação do valor 'B' em condições de intensidade de luz reduzida (casa de vegetação) pode levar ao resultado de um valor 'B' menos negativo do que aquele determinado em pleno sol e assim provavelmente menos apropriado utiliza-lo, para calcular a contribuição da FBN em leguminosa em condições de campo.

Palavras chaves: FBN. valor 'B'. luminosidade controlada.

GENERAL ABSTRACT

ARAÚJO, Karla Emanuelle Campos. Isotopic fractionation of ^{15}N in nitrogen fixation in soybean due to light intensity and *Bradyrhizobium* spp. strain inoculated. 2014. 40f. Dissertation (Master in Plant Science). Institute of Agronomy, Department of Plant Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

This work aimed to study the isotopic fractionation of N from BNF in stems function and light intensity in soybean plant symbiosis with *Bradyrhizobium*. The 'B' value was evaluated for ten *Bradyrhizobium* strains, as well as their interaction with the soybean plant (*Glycine max* L.). The experiment was conducted at Embrapa greenhouse Agrobiologia, Seropédica, RJ. The soybean plants inoculated with the different strains of *Bradyrhizobium* and a control not inoculated, were grown under conditions similar to Leonard vessels using substrate of sand and vermiculite in a 2: 1 (v / v). In the second experiment to assess the value 'B' of the resulting symbiosis BNF among cultivars (cv) of soybean BRS 133, BRS 184, MONSOY9144 nine *Bradyrhizobium*. Soybean plants in all the treatments, were grown under the same conditions, the soybean cultivation was performed in vessels Leonard with sand and perlite substrate in the proportion 1: 1 (v / v). In both experiments after 47 days of planting the plants were harvested and calculated the value 'B'. In the third experiment evaluated the effect of different strains of *Bradyrhizobium* and the reduction in the intensity of light on natural abundance of ^{15}N N_2 fixed by the strains in symbiosis with soybean cv BRS 133. An experiment was conducted in the experimental field of Embrapa Agrobiologia. The soybean plants inoculated with 11 *Bradyrhizobium* and treatment uninoculated were grown under similar conditions in plastic pots with sand substrate and perlite in the proportion 1: 1 (v / v). After 75 days after planting the plants were collected and calculated the value 'B'. No experiment 1, the values of ' B_{pa} ' ranged between -2 and -4 ‰, according to the strain used. In experiment 2, the values of ' B_{pa} ' showed no difference between the soybean cultivars inoculated with *Bradyrhizobium* as the isotopic abundance of ^{15}N in plants grown entirely dependent on FBN. There was a tendency for the abundance of ^{15}N values in ' B_{pa} ' treatment of plants inoculated with strains of *B. elkanii* to be less negative than in the case of plants inoculated with *B. japonicum*. In experiment 3 the values of ' B_{PA} ' showed natural ^{15}N abundance values significantly more negative than the shaded plants. There was a tendency for the abundance of ^{15}N in the shoot (and values of ' B_{pa} ') treatment of the plants inoculated with *B. japonicum* strains to be less negative than in the case of plants inoculated with *B. elkanii*. For the determination of the 'B' value, the plants should be in the same stage of maturity that being used to sample the plants in the field, to assess the value 'B' in low light intensity conditions (green house) can lead to the result of a 'B' value less negative than that given in full sun and so probably less appropriate uses it to calculate the contribution of BNF in legume under field conditions.

Key words: BNF. Value B. controlled lighting.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Bradyrhizobium elkanii</i> utilizadas no experimento.	7
Tabela 2: Estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Bradyrhizobium elkanii</i> utilizadas no experimento.	9
Tabela 3: Estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Bradyrhizobium elkanii</i> utilizadas no experimento.	10
Tabela 4: Acúmulo de matéria seca por vaso (2 plantas por vaso) de soja cv BRS 133 inoculada com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e colhidas aos 46 dias após o plantio..	12
Tabela 5: Acúmulo de nitrogênio total por vaso (2 plantas por vaso) de soja cv BRS 133 inoculada com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e colhidas aos 46 dias após o plantio.	14
Tabela 6: Abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) em plantas de soja cv BRS 133 inoculada com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> ; e valor 'B' em plantas de soja colhidas aos 46 dias após plantio.	15
Tabela 7: Acúmulo de matéria seca em plantas de soja cv BRS 133, BRS 184, Monsoy 9144 e inoculadas com as estirpes <i>Bradyrhizobium</i> , colhidas aos 47 dias após o plantio.	17
Tabela 8: Acúmulo de matéria seca em plantas inteiras de soja e eficiência nodular nas cv BRS 133, BRS 184, Monsoy 9144 e inoculadas com as estirpes <i>Bradyrhizobium</i> , colhidas aos 47 dias após o plantio.	19
Tabela 9: Acúmulo de nitrogênio total por vaso (2 plantas por vaso) de soja cv BRS 133 inoculada com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e colhidas aos 47 dias após o plantio.	21
Tabela 10: Acúmulo de nitrogênio total por vaso (2 plantas por vaso) de soja cv BRS 133 inoculada com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e colhidas aos 47 dias após o plantio.	22
Tabela 11: Abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) em diferentes variedades de soja inoculadas com estirpes de <i>B. japonicum</i> ou <i>B. elkanii</i> e colhidas aos 47 dias após o plantio.	23
Tabela 12: Valor 'B' em diferentes variedades de soja inoculadas com estirpes de <i>B. japonicum</i> ou <i>B. elkanii</i> e colhidas aos 47 dias após o plantio.	24
Tabela 13: Acúmulo de matéria seca em plantas de soja cv BRS 133 inoculada com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e colhidas aos 75 dias após o plantio. Valores são médias de 5 repetições.	26
Tabela 14: Nitrogênio acumulado em plantas de soja cv BRS 133 e inoculadas com as estirpes <i>Bradyrhizobium</i> , colhidas aos 75 dias após o plantio. Valores são médias de 5 repetições.	28
Tabela 15: Nitrogênio acumulado em plantas de soja cv BRS 133 e inoculadas com as estirpes <i>Bradyrhizobium</i> , colhidas aos 75 dias após o plantio.	29
Tabela 16: Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e Valor 'B'	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio para a cultura da soja	3
2.2	Desempenho das estirpes de Bradyrhizobium.....	4
2.3	Quantificação da FBN para a cultura da soja	5
3.	MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1	Primeiro experimento em casa de vegetação.....	7
3.2	Segundo Experimento casa de vegetação	8
3.3	Terceiro experimento conduzidos em vasos no campo	10
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1	Primeiro experimento: Teste de interação entre plantas de soja e diferente estirpes de Bradyrhizobium em casa de vegetação	12
4.1.1	Acúmulo de massa seca e nitrogênio total em plantas de soja	12
4.1.2	Abundância natural de ¹⁵ N e valor ‘B’	14
4.2	Segundo experimento casa de vegetação.....	16
4.2.1	Massa seca da parte aérea, raiz, nódulos e planta inteira	16
4.2.2	Eficiência nodular	18
4.2.3	Acúmulo de N total na parte aérea, raiz, nódulo e planta inteira	20
4.2.4	Abundância natural de ¹⁵ N na parte aérea, raiz, nódulo e planta inteira	22
4.3	Terceiro experimento em vasos no campo	25
4.3.1	Acúmulo de massa seca nas plantas	25
4.3.2	Nitrogênio total acumulado nas plantas de soja	27
4.3.3	Valores de $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	29
5.	DISCUSSÃO GERAL	32
6.	CONCLUSÕES.....	34
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glicine max* L.) é uma cultura de grande importância para humanidade, em função da diversidade dos seus produtos e ainda constitui um dos commodities de maior importância na economia brasileira (CASTOLDI et al., 2009). Esta cultura ocupa uma área de 27.715 milhões de hectares, com uma produção de 81.281 milhões de toneladas de grãos em 2013, o que torna o nosso país o segundo maior produtor mundial deste grão (CONAB, 2014).

O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura da soja, uma vez que os grãos são muito ricos em proteínas, apresentando um teor médio de 6,5 % de nitrogênio. A soja é um membro da sub-família Papilionoideae da família Leguminosae e como a grande maioria dos membros desta família é capaz de formar uma simbiose com bactérias do grupo rizóbio que pode fornecer até 100% do N da planta através do processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (N₂) (EMBRAPA, 2002; ALVES et al., 2003). Em geral, o sucesso da FBN e da nodulação pode estar relacionado com as características das populações específicas de rizóbios existente no solo e com o teor de nitrogênio (N) mineral presente neste (HOLSTEN et al., 1971). As estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a cultura da soja no Brasil são as SEMIA 587 e 5019 (29 W), pertencentes a espécie *Bradyrhizobium elkanii*, e as estirpes SEMIA 5079 (CPAC 15) e SEMIA 5080 (CPAC 7), pertencentes a espécie *Bradyrhizobium japonicum* (FREIRE & VERNETTI, 1999). Essas duas espécies de *Bradyrhizobium* apresentam diferenças no seu metabolismo, podendo assim ter influência na quantidade de N fixado pela planta. Uma diferença entre as espécies é a existência da enzima hidrogenase presentes nos *Bradyrhizobium japonicum*, que é capaz de reciclar o H₂ liberado (chamada 'hydrogen uptake' – HUP) e recuperar parte da energia perdida durante o processo de FBN onde a enzima nitrogenase está envolvida (EVANS et al., 1982). Alguns trabalhos deixam claro o efeito positivo das estirpes que possuem a hidrogenase, mostrando maiores crescimento de plantas e produção de grãos (EVANS et al., 1985; NEVES et al., 1985; NEVES E HUNGRIA, 1987; HUNGRIA et al., 1989; SANTOS et al., 1997), porém em outros estudos conduzidos em condições controladas têm mostrado resultados diferentes (DREVON et al., 1987; FUHRMANN, 1990). Neves et al. (1985) indicou que experimentos conduzidos em casa de vegetação ou fitotron não estabelecem relação com os experimentos conduzidos em campo. Outro fator que pode interferir e que foi sugerido por Bethlenfalvay e Phillips (1979) é a irradiação. Esses autores mostraram que a eficiência relativa pode variar com a irradiância, o que foi confirmado mais tarde por Nelson (1983). Ambos sugerem que sob sombreamento, as estirpes que apresentam a HUP aumentam a eficiência simbiótica.

Em estudos sobre FBN existem muitas técnicas que podem ser utilizadas como o balanço de N no sistema solo-planta (BREMNER, 1965), a diferença de N total (BODDEY, 1987), a redução de acetileno (BURRIS, 1975), abundância relativa de ureídeos (MCCLURE et al., 1979; ALVES, 1996) e as técnicas isotópicas baseadas no uso do ¹⁵N.

As técnicas baseadas no uso de isótopos têm sido utilizadas e se mostram bastante eficientes (PEOPLES et al., 1997). Podemos citar como exemplo a abundância natural de ¹⁵N (δ ¹⁵N) (SHEARER & KOHL, 1986) e a diluição isotópica de ¹⁵N (VALLIS et al., 1967; BODDEY et al., 1994).

A técnica da abundância natural de ¹⁵N tem como base o fato de que, geralmente, o N do solo é levemente enriquecido em ¹⁵N em comparação ao N₂ atmosférico (SHEARER e KOHL, 1986), sendo que a composição isotópica do N₂ atmosférico é de 99,6337% e 0,3663% de átomos de ¹⁴N e ¹⁵N, respectivamente (JUNK e SVEC, 1958) Os processos de

mineralização/imobilização, nitrificação/desnitrificação, lixiviação e volatilização podem resultar em pequenas variações na composição isotópica (^{14}N e ^{15}N) no solo e nas plantas (MARIOTTI et al., 1982; HÖGBERG, 1997).

Geralmente, estas alterações resultam em um pequeno enriquecimento em ^{15}N do N do solo e das plantas em relação ao ar atmosférico (MARIOTTI et al., 1982; SHEARER e KOHL 1986). É através desse enriquecimento que se pode quantificar a FBN, e a interpretação dos resultados baseia-se no fato de que a planta não fixadora de N_2 (planta testemunha) apresenta um enriquecimento de ^{15}N muito semelhante ao solo e maior do que o da planta fixadora de N_2 (SHEARER e KOHL, 1986). Para a estimativa da FBN através da abundância natural de ^{15}N , é importante conhecer a abundância isotópica de ^{15}N na planta leguminosa crescida inteiramente dependente da FBN (valor ' B '), que a princípio, seria constante para cada cultura. O valor ' B ' é obtido após o crescimento das plantas fixadoras em um meio livre de N, ou seja, na total dependência de N derivado da FBN (BODDEY et al., 2000; OKITO et al., 2004).

Este trabalho teve como objetivo estudar o fracionamento isotópico do N proveniente da FBN, em função de estípes e intensidade de luz na simbiose da planta de soja com *Bradyrhizobium*, como específico:

- a) Avaliar a capacidade de nodulação e a abundância natural de ^{15}N do N_2 fixado por estirpes *B. japonicum* e *B. elkanii* em simbiose com a soja;
- b) Avaliar a capacidade de nodulação e a abundância natural de ^{15}N do N_2 fixado por estirpes *B. japonicum* e *B. elkanii* em simbiose com três cultivares de soja e;
- c) Determinar o efeito da intensidade da luz na abundância natural de ^{15}N do N_2 fixado por estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com a soja.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio para a cultura da soja

O elemento mais importante para se obter elevadas produções na agricultura tropical é o nitrogênio (N), que forma quase 80% da atmosfera na forma gasosa de N_2 , não diretamente assimilável pelas plantas. É o componente responsável por várias reações nas plantas, além de fazer parte da estrutura da clorofila, de enzimas e proteínas (FAGAN et al., 2007). O N é um nutriente essencial, por isso o seu balanço interfere na formação das raízes, no processo de fotossíntese, na produção, na translocação de fotoassimilados e na taxa de crescimento entre folhas e raízes, sendo que primeiramente afeta o crescimento foliar (RYLE et al., 1979; TAIZ & ZIEGER, 2004). Com isso ocorrerá à diminuição do crescimento das plantas e uma redução na produtividade.

O suprimento de nitrogênio para as culturas pode ocorrer de formas diferenciadas, variando de acordo com a espécie vegetal. Este nutriente pode ser absorvido do solo na forma de NH_4^+ ou de NO_3^- ou através do N_2 atmosférico pela fixação biológica. Nas leguminosas o N é absorvido na forma de N_2 e transformado em NH_4^+ através do processo simbiótico com bactérias diazotróficas (GERAHTY et al., 1992; TAIZ & ZIEGER, 2004), esse processo é conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN) que é um processo biológico de quebra da tripla ligação do N_2 através de um complexo enzimático, denominado nitrogenase. Este processo ocorre no interior de estruturas específicas, denominadas de nódulos, onde bactérias do grupo de rizóbio que inclui, entre outros, os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* convertem o N_2 atmosférico em amônia, que é incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização por plantas da família das leguminosas (ARAÚJO et al., 2006). As associações simbióticas contribuem com 40 a 180 kg/ha/ano (REIS et al., 2006).

A FBN não é um processo isolado e necessita de outros fatores para seu funcionamento eficiente. O sistema de plantio direto, pode favorecer a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas (ALVES et al., 2003), pois parece estimular o processo simbiótico, provavelmente pela redução na disponibilidade de N no solo, em razão da maior imobilização da população microbiana do solo (KESSEL & HARTLEY, 2000). Fatores de produção e morfológicos também são importantes para a compreensão da interação entre a planta e o ambiente, que influenciará no estabelecimento da planta e conseqüentemente na FBN na cultura da soja, (JACOB NETO & DUQUE, 1981). A eficiência da FBN também está relacionada com o pH e a disponibilidade de alguns nutrientes. Para obter boa eficiência de bactérias fixadoras, este deve apresentar pH em torno de 6,5. Altos teores de alumínio trocável e íons H^+ prejudicam o desenvolvimento radicular, o crescimento do rizóbio e a infecção radicular (SILVA et al., 2002).

A soja é uma cultura introduzida da Ásia e as bactérias (rizobios) capazes de formar nódulos nesta cultura foram quase isentas originalmente nos solos do continente Americano. Por isso um dos fatores mais importantes para a eficiência da FBN, é o processo de inoculação das sementes (HUNGRIA, 1997) especialmente em áreas de primeiro cultivo com soja. Entretanto, esse processo é de grande importância também em áreas em que é feita a reinoculação Nishi et al. (1995); Hungria et al. (2006); e Bizarro (2008) citam que pode obter incrementos médios da ordem de 4 a 5% no rendimento de grão da cultura. Com isso reforça os benefícios da reinoculação, mesmo em solos com altas populações de *Bradyrhizobium*.

O N é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura da soja, para produzir 1000 kg de grãos são necessários 80 kg de N. Essas quantidades de N requerida pela cultura podem ser supridas pelo processo de fixação biológica de nitrogênio. Isso se deve ao fato do

programa de melhoramento da cultura da soja associado à seleção de estirpes de rizóbio mais eficientes e competitivas garantir, total independência da cultura da soja em relação à adubação nitrogenada (ALVES et al., 2003).

Em estudo feito por Macedo (2003) foram realizadas estimativas da fixação biológica de nitrogênio para lavouras de soja em sistemas de plantio direto, no noroeste do estado do Paraná, o N total acumulado variou de 60 a 99,8%. . Em um estudo realizado em Dourados-MS utilizando a técnica de abundância natural, Alves et al. (2006) registrou contribuições da FBN à cultura de soja de entre 173 e 196 kg N ha⁻¹ (entre 83 e 88% N total acumulado) e resultados semelhantes foram obtidas utilizando a técnica de abundância de ureídos por Hungria et al. (2006). Pelo apresentado mostra-se que se entendermos o processo de fixação biológica do nitrogênio e os fatores que o controlam é de grande importância, pois com esses conhecimentos é possível adequar o manejo da planta visando aumentar a eficiência de utilização de N e incrementar a produtividade da cultura, o que é de grande interesse.

2.2 Desempenho das estirpes de *Bradyrhizobium*

No Brasil, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) em soja é um dos exemplos de maior sucesso, uma vez que a utilização de inoculantes com *Bradyrhizobium* possibilita uma economia anual aproximada de US\$ 3 bilhões em fertilizantes nitrogenados (FAGAN et al., 2007).

A fixação biológica do N envolve uma sucessão de processos que começam com a adaptação da bactéria à planta e culminam na fixação do N₂ atmosférico (FAGAN et al., 2007). Os rizóbios são bactérias habitantes do solo que se associam intimamente com os pêlos radiculares das plantas. Trocas de sinais moleculares entre os simbioses iniciam o processo de nodulação, dando origem aos nódulos, que são estruturas especializadas onde a simbiose é estabelecida (PERRET et al., 2000). O começo da sequência de processos que iniciam a nodulação ocorre aproximadamente 2 h após o contato da bactéria com as raízes. Os nódulos primários se desenvolvem em regiões de alongamento e nas zonas de formação de pequenos pêlos radiculares, considerada a região preferencial para a infecção da bactéria fixadora (BHUVANESWARI et al., 1980). No período de quatro a cinco semanas do início da infecção, há a paralisação do crescimento do nódulo, considerando-o completamente maduro (GUIMARÃES, 2005). Na planta de soja, os nódulos podem ter vida ativa de seis a sete semanas, quando se inicia a paralisação da atividade fixadora e o processo de degeneração (HOLSTEN et al., 1971).

A potencialidade da nodulação e eficiência na fixação de nitrogênio estão relacionadas não apenas a um único fator, é um somatório que limita a eficiência dos rizóbios fixadores de nitrogênio (SANTOS, 1988), dentre os fatores limitantes podemos citar as populações inespecíficas de rizóbios existentes no solo, salinidade, pH e temperaturas do solo desfavoráveis e o teor de nitrogênio mineral no solo. Estudos feitos por Hungria (2006), Mendes (2008) e Albareda (2009) mostram efeitos deletérios nos parâmetros de nodulação da soja quando aplica N-fertilizante. Os mesmos autores mostram que a aplicação de 50 kg ha⁻¹ de N promoveu uma redução na nodulação da soja, o que resultou na diminuição da quantidade de N fixado e do rendimento de grão.

As estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a produção de inoculantes para soja no Brasil são oriundas da coleção SEMIA (seção de microbiologia agrícola) mantida pela organização FEPAGRO do Rio Grande do Sul, sendo elas a SEMIA 587 e 5019 (29 W), ambas pertencentes a espécie dos *Bradyrhizobium elkanii*, sendo posteriormente incluídas as estirpes SEMIA 5079 (CPAC 15) e a SEMIA 5080 (CPAC 7), pertencentes a espécie *Bradyrhizobium japonicum* (FREIRE & VERNETTI, 1999). Essas duas espécies de *Bradyrhizobium* apresentam diferença no seu metabolismo, podendo assim ter influência na quantidade de N fixado pela planta.

Estas estirpes têm um metabolismo diferenciado entre si que pode influenciar a quantidade de N fixado e acúmulo de matéria seca pela leguminosa. Uma diferença entre os grupos é a existência ou não da enzima hidrogenase, que é capaz de reciclar o H₂ liberado (chamada 'hydrogen uptake' – HUP) e recuperar parte da energia perdida durante o processo de FBN onde a enzima nitrogenase está envolvida (EVANS et al., 1987). Desde os anos 60 sabe-se que no processo da redução de N₂ a NH₃ exige obrigatoriamente a redução de prótons a H₂ (DILWORTH, 1966), como demonstrado na equação 1:



A produção de H₂ durante a redução de N₂ foi demonstrada por Bulen et al. (1966), e conta com 25 a 35% do fluxo de elétrons direto do sistema da nitrogenase (HUNGRIA et al., 1989). Aliado ao processo de fixação de nitrogênio, a enzima nitrogenase libera H₂, com desperdício de elétrons e ATP que poderiam ser reutilizado para redução de N₂ na presença da enzima hidrogenase. Subsequentemente quando as espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* foram diferenciados por homologia de DNA e a sequenciamento parcial de DNA 16 S (WEISBURG et al., 1991) foi descoberto que o enzima HUP era presente na maioria de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e ausente em todas estirpes de *Bradyrhizobium elkanii*. Devido a isso, estirpes que reabsorvem o H₂ (HUP⁺) eram conhecidas como mais eficientes, e um dos objetivos dos estudos de Neves et al. (1985) foi determinar se havia alguma relação entre a eficiência das estirpes com respeito a HUP, e a eficiência, definida como N fixado por mg de massa seca de nódulo, observada por Dobereiner et al. (1970). Os resultados mostraram que todas as três estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* avaliadas foram HUP+ (eficientes pelos dois critérios) e as 3 estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* foram HUP- (ineficientes pelos dois critérios).

No final da década de 70, alguns autores observaram que várias leguminosas de origem tropical, incluindo soja, transportavam o N fixado dos nódulos para a parte aérea através do xilema (FUJIHARA et al., 1977; PATE et al., 1980). Houve um grande interesse na eficiência de translocação de N fixado nos nódulos na forma de ureídos (alantoína e ácido alantóico) e Neves et al. (1985) também estudaram as concentrações de ureídos na seiva do xilema da soja inoculada separadamente com as 6 estirpes. Encontraram que as plantas noduladas com as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (HUP+) tiveram maiores concentrações de ureídos na seiva do que aquelas noduladas com as estirpes do *Bradyrhizobium elkanii* (HUP-), e que as plantas noduladas com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* translocaram maiores proporções do N das folhas para o grão na fase da maturação dos grãos.

2.3 Quantificação da FBN para a cultura da soja

Em estudos sobre FBN existem muitas técnicas que podem ser empregadas e dentre elas podemos citar o balanço de N no sistema solo-planta (BREMNER, 1965), a diferença de N total (Boddey, 1987), a redução de acetileno (BURRIS, 1975), abundância relativa de ureídos (MCCLURE et al., 1979; ALVES, 1996) e as técnicas isotópicas baseadas no uso do ¹⁵N.

As técnicas baseadas no uso de isótopos de nitrogênio mostram-se bastante eficientes no estudo da fixação biológica de nitrogênio em sistemas agrícolas (PEOPLES et al., 1997). Dentre as técnicas isotópicas temos a do N₂ marcado com ¹³N ou ¹⁵N (MEEKS et al., 1978), a de diluição isotópica de ¹⁵N (VALLIS et al., 1967; BODDEY et al., 1994) e a abundância natural de ¹⁵N (δ¹⁵N) (SHEARER & KOHL, 1986).

Para aplicar a técnica de diluição isotópica é necessário cultivar a planta fixadora de N₂ e uma planta referência não fixadora de N₂ em um solo onde o N mineral presente uma

marcação com ^{15}N acima da abundância natural. Plantas que obtenham, além do N do solo, o N atmosférico, sofrem uma diluição no seu enriquecimento em ^{15}N . Quanto maior a diluição, maior a quantidade de N atmosférico incorporado e, por consequência, maior a contribuição da FBN.

Porém, nesta técnica é preciso considerar que a leguminosa e a planta referência absorvam nitrogênio do solo com a mesma marcação e que apresentem uma marcha de absorção de nitrogênio do solo muito semelhante (BODDEY, 1987). Além disso, entradas de nitrogênio no sistema solo-planta através da água de irrigação, chuvas, agroquímicos, fertilizantes nitrogenados, se existirem, devem ser iguais tanto para a planta fixadora de N_2 como para a planta referência.

Plantas referência que explorem volumes de solo diferentes da planta fixadora absorverão N com diferentes enriquecimentos de ^{15}N , levando a estimativas errôneas da FBN (BODDEY & VICTORIA, 1986; PEOPLES et al., 1989). Com intuito de eliminar ou reduzir este erro, tem sido proposta a utilização de plantas da mesma espécie da planta teste, porém de variedades não nodulante, ou também pelo uso de pelo menos três espécies diferentes de plantas referência, de preferência pertencentes a diferentes famílias (BODDEY et al, 1986).

A quantificação da FBN pelo método da abundância natural ^{15}N ou $\delta^{15}\text{N}$, foi desenvolvido a partir da constatação de que ocorre pequeno enriquecimento de ^{15}N no solo em comparação ao N_2 do ar. A partir do enriquecimento natural do solo em ^{15}N , pode-se então distinguir a proporção entre o N fixado e o N do solo presente no tecido vegetal (SHEARER & KOHL, 1986).

Contudo, essa técnica também apresenta limitações, exigindo algumas considerações específicas. É importante, por exemplo, considerar os valores de fracionamento isotópico que parecem ocorrer durante as transformações nitrogênio e durante o processo de fixação biológica pelos nódulos, tornando-se necessário à determinação do Valor 'B', que é a abundância natural de ^{15}N da leguminosa crescida em total dependência da FBN (SHEARER & KOHL, 1986). Alguns autores alegam que o fracionamento pode não existir no processo de fixação de nitrogênio (UNKOVICH & PATE, 2000) e outros acreditam que o fracionamento isotópico depende da espécie cultivada, das estirpes de bactérias envolvidas, e do estágio e condições de crescimento da planta (PEOPLES et al., 1989).

No estudo realizado por Okito et al. (2004) e Pauferro et al. (2010) duas estirpes de *Bradyrhizobium* foram testadas: *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CPAC 7, mostrou um valor do 'B' significativamente menos negativo do que a estirpe *Bradyrhizobium elkanii* estirpe 29 W. Em um trabalho feito por Guimarães et al. (2008) foi visto que uma outra estirpe CPAC 15 *Bradyrhizobium japonicum* mostrou um valor de 'B' muito semelhante ao da estirpe CPAC 7 e duas estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* mostraram valores do 'B' bem menores.

Normalmente são encontrados valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ na parte aérea de muitas espécies leguminosas quando o seu crescimento é inteiramente dependente da fixação de N_2 indicando uma distribuição diferenciada na planta do ^{15}N durante o processo de fixação de N_2 (UNKOVICH & PATE, 2000).

O uso da técnica de abundância natural de ^{15}N apresenta semelhanças com a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , por isso, é atualmente, a técnica mais difundida e aceita para fins de quantificação da contribuição da FBN para as plantas (PEOPLES et al., 1989), apesar de sofrer os mesmos problemas dos outros métodos isotópicos. SHEARER & KOHL (1986) destaca que apesar dos problemas voltados para a real estimativa do valor de 'B', a técnica de abundância natural de ^{15}N apresenta a vantagem de não haver necessidade de adição de N marcado, evitando os problemas de inibição da fixação de N_2 e de estabilidade da marcação ao longo do tempo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Primeiro experimento em casa de vegetação

O objetivo do primeiro experimento foi de conferir a capacidade de nodulação e a fixação de N₂ de quatro estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e oito estirpes de *B. elkanii* e a abundância natural de ¹⁵N do N₂ fixado pelas estirpes em simbiose com uma cultivar de soja.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Seropédica- RJ, e instalado em 08 de Novembro de 2012. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os tratamentos consistiram de plantas de soja cultivadas com adição de inoculante turfoso e sem inoculação (controle) de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (Tabela 1), em cinco repetições. Foram utilizadas sementes da cultivar BRS 133 (*Glycine max* L.), que foram imersas por 30 segundos em álcool etílico (92.8° I.N.P.M.), por dois minutos no peróxido de hidrogênio (30%) seguida de 10 lavagens sucessivas com água destilada autoclavada, para desinfestação. Foram semeadas cinco sementes por vaso, o desbaste foi aos oito dias após a emergência, deixando-se apenas duas plantas por vaso.

Tabela 1. Estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* utilizadas no experimento.

Estirpe	Outras nomenclaturas	Origem
<i>B. japonicum</i>		
CPAC 7	BR 85, SEMIA 5080	Brasileira
CPAC 15	BR 86, SEMIA 5079	Brasileira
USDA 06*	BR 114	USA (originalmente Ásia)
USDA 110	BR 116	USA (originalmente Ásia)
<i>B. elkanii</i>		
USDA 76*	BR 113	
29 W	BR 29, SEMIA 5019	Brasileira
SEMIA 587	BR 96	Brasileira
DF 395	BR 76	Brasileira
SM1b	BR 1	Brasileira
USDA 31	BR 123	USA (originalmente Ásia)
USDA 46	BR 120	USA (originalmente Ásia)
USDA 94	BR 121	USA (originalmente Ásia)
USDA 130	BR 122	USA (originalmente Ásia)

*= estirpes padrão “type strains”

O cultivo das sementes de soja foi realizado em vasos Leonard (VINCENT, 1970), utilizando substrato de areia e vermiculita na proporção 2:1 (v/v). Foram previamente autoclavados por duas vezes (120 °C por 1 h com um intervalo de 24 h), no plantio foi colocada 300 mL de água destilada autoclavada nos vasos. Decorridos oito dias, após a germinação a água contida nos vasos foi substituída pela solução nutritiva isenta de N, solução de Norris (NORRIS e T'MANNETJE, 1964) com um quarto da concentração recomendada. Após sete dias, substituiu-se essa solução por outra com metade da concentração recomendada. Seguindo-se sete dias a solução foi trocada por outra com a

concentração recomendada. Depois desse procedimento, a troca da solução com a concentração recomendada foi realizada a cada sete dias.

A coleta foi realizada aos 46 dias após o plantio, no estádio R4, no começo da floração. Separou-se a parte aérea, a raiz e os nódulos (quando presentes). Em seguida, procedeu-se à secagem da parte aérea e da raiz em estufa a 65°C por um período de quatro dias, e dos nódulos em sílica gel até estabilização do peso, para a determinação da proporção de matéria seca (MS). Passados esse período determinou-se o peso seco do material. Após esse procedimento, as amostras foram processadas em moinho tipo Wiley (peneiras de 2 mm), e posteriormente em moinho de rolos similar ao descrito por Arnold e Schepers (2004), até formar pó.

Em seguida, pesaram-se sub-amostras da parte aérea, da raiz e dos nódulos, para determinação do N total, análises do $\delta^{15}\text{N}$ nos tecidos da planta e da semente pelo método de Dumas (BODDEY et al., 1994) em um analisador elementar CHNS-O (Modelo ECS 4010, CostechAnalytical Technologies Inc., Valencia, USA), acoplado a um espectrômetro de massas de razão isotópica (Modelo Delta V, Thermo Scientific, Bremen, Alemanha), conforme descrito por Ramos et al. (2001).

Valor 'B': é o valor da abundância natural de ^{15}N do N na leguminosa derivada da FBN. Para a determinação do valor 'B' para a planta inteira e para a parte aérea, utilizando-se a técnica de abundância natural de ^{15}N usou-se a fórmula seguinte, respectivamente:

$$'B_{pi}' = \frac{(N_{Tnod} \times \delta^{15}\text{N}_{nod}) + (N_{TPA} \times \delta^{15}\text{N}_{PA}) + (N_{TR} \times \delta^{15}\text{N}_R) - (N_{TS} \times \delta^{15}\text{N}_S)}{(N_{Tnod} + N_{TPA} + N_{TR} - N_{TS})}$$

$$'B_{pa}' = \frac{(N_{TPA} \times \delta^{15}\text{N}_{PA}) - (N_{TS} \times \delta^{15}\text{N}_S)}{(N_{TPA} - N_{TS})}$$

Onde:

' B_{pi} ': valor 'B' da planta inteira

' B_{pa} ': valor 'B' da parte aérea

N_{Tnod} : N total dos nódulos;

N_{TPA} : N total da parte aérea;

N_{TR} : N total da raiz;

N_{TS} : N total da semente;

$\delta^{15}\text{N}_{nod}$: delta ^{15}N dos nódulos;

$\delta^{15}\text{N}_{PA}$: delta ^{15}N da parte aérea;

$\delta^{15}\text{N}_R$: delta ^{15}N da raiz.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente para separar as médias ao teste de Student, por meio do software Sisvar (FERREIRA, 2003).

3.2 Segundo Experimento casa de vegetação

O objetivo do segundo experimento foi de conferir a capacidade de nodulação e a fixação de N_2 de três estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e seis estirpes de *B. elkanii* e a abundância natural de ^{15}N do N_2 fixado pelas estirpes em simbiose com três cultivares de soja.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Seropédica- RJ, foi instalado em 28 de Maio de 2013. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os tratamentos consistiram de plantas de soja cultivadas com adição de inoculante turfoso e sem inoculação (controle) de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (Tabela 2), em cinco repetições. Foram utilizadas sementes da cultivar BRS 133, BRS 184, MONSOY 9144 que foram imersas por 30 segundos em álcool etílico (92.8° I.N.P.M.), por dois minutos no peróxido de hidrogênio

(30%) seguida de 10 lavagens sucessivas com água destilada autoclavada, para desinfestação. Foram semeadas cinco sementes por vaso, o desbaste foi aos oito dias após a emergência, deixando-se apenas duas plantas por vaso.

Tabela 2. Estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* utilizadas no experimento.

Estirpe	Outras nomenclaturas	Origem
<i>B. japonicum</i>		
CPAC 7	BR 85, SEMIA 5080	Brasileira
USDA 06*	BR 114	USA (originalmente Ásia)
USDA 110	BR 116	USA (originalmente Ásia)
<i>B. elkanii</i>		
29 W	BR 29, SEMIA 5019	Brasileira
USDA 130	BR 122	USA (originalmente Ásia)
USDA 94	BR 121	USA (originalmente Ásia)
USDA 76*	BR 113	USA (originalmente Ásia)
USDA 31	BR 123	USA (originalmente Ásia)
USDA 46	BR 120	USA (originalmente Ásia)

*= estirpes padrão “type strains”

O cultivo das sementes de soja foi realizado em vasos Leonard (VINCENT, 1970), utilizando substrato de areia e perlita na proporção 1:1 (v/v) os quais foram previamente autoclavados por duas vezes (120 °C por 1 h com um intervalo de 24 h), no plantio foi colocada 300 mL de água autoclavada nos vasos. Decorridos oito dias, após a germinação a água contida nos vasos foi substituída pela solução nutritiva isenta de N, solução de Norris (NORRIS e T'MANNETJE, 1964) com um quarto da concentração recomendada. Após sete dias, substituiu-se essa solução por outra com metade da concentração recomendada. Seguindo-se sete dias a solução foi trocada por outra com a concentração recomendada. Depois desse procedimento, a troca da solução com a concentração recomendada foi realizada a cada sete dias.

A coleta foi realizada aos 47 dias após o plantio, no estágio R5, na floração plena. Separou-se a parte aérea, a raiz e os nódulos (quando presentes). Em seguida, procedeu-se à secagem da parte aérea e da raiz em estufa a 65°C por um período de quatro dias e dos nódulos em sílica gel até estabilização do peso para a determinação da proporção de matéria seca (MS). Passados esse período determinou-se o peso seco do material. Após esse procedimento, as amostras foram processadas em moinho tipo Wiley (peneiras de 2 mm), e posteriormente em moinho de rolo similar ao descrito por Arnold e Schepers (2004) até formar pó.

Em seguida, pesaram-se sub-amostras da parte aérea, da raiz e dos nódulos, para determinação do N total, e para análises da razão isotópica de ¹⁵N nos tecidos da planta e da semente pelo método de Dumas (BODDEY et al., 1994) em um analisador elementar CHNS-O (Modelo ECS 4010, CostechAnalytical Technologies Inc., Valencia, USA), acoplado a um espectrômetro de massas de razão isotópica (Modelo Delta V, Thermo Scientific, Bremen, Alemanha), conforme descrito por RAMOS et al. (2001).

O valor ‘B’ foi determinado conforme descrito no experimento anterior.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente

para separar as médias ao teste de Student, por meio do software Sisvar (FERREIRA, 2003).

3.3 Terceiro experimento conduzidos em vasos no campo

O objetivo deste experimento foi de determinar o efeito de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e redução da intensidade de luz na abundância natural de ^{15}N do N_2 fixado pelas estirpes em simbiose com uma cultivar de soja.

O experimento foi instalado em 31 de janeiro de 2014 na área experimental da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com cinco repetições. Os tratamentos consistiram de plantas de soja cultivadas com adição de inoculante turfoso e sem inoculação (controle) de quatro estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e sete de *Bradyrhizobium elkanii* (Tabela 3), e de plantas crescidas sob condições de luz normal, e de plantas crescidas em condições protegidas, onde recebeu aproximadamente 50% do total de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos.

Foram utilizadas sementes da cultivar BRS 133 (*Glycine max* L.), que foram imersas por 30 segundos em álcool etílico (92.8° I.N.P.M.), por dois minutos no peróxido de hidrogênio (30%) seguida de 10 lavagens sucessivas com água destilada autoclavada, para desinfestação. Foram semeadas cinco sementes por vaso, o desbaste foi aos oito dias após a emergência, deixando-se apenas duas plantas por vaso.

Tabela 3. Estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* utilizadas no experimento.

Estirpe	Outras nomenclaturas	Origem
<i>B. japonicum</i>		
CPAC 7	BR 85, SEMIA 5080	Brasileira
CPAC 15	BR 86, SEMIA 5079	Brasileira
USDA 06*	BR 114	USA (originalmente Ásia)
USDA 110	BR 116	USA (originalmente Ásia)
<i>B. elkanii</i>		
29 W	BR 29, SEMIA 5019	Brasileira
SEMIA 587	BR 96	Brasileira
DF 395	BR 76	Brasileira
SM1b	BR 1	Brasileira
USDA 76*	BR 10242 ¹	USA (originalmente Ásia)
USDA 31	BR 123	USA (originalmente Ásia)
USDA 46	BR 120	USA (originalmente Ásia)

*= estirpes padrão “type strains”

¹= estirpe cedida pela Dr. Mariângela Hungria, Embrapa soja.

O cultivo das sementes de soja foi realizado em vasos plásticos, utilizando 6 kg substrato de areia e perlita na proporção 1:1 (v/v). O substrato foi previamente autoclavado por duas vezes (120 °C por 1 h com um intervalo de 24 h), Decorridos oito dias, após a germinação foi colocada nos vasos solução nutritiva isenta de N, solução de Norris (NORRIS e T'MANNETJE, 1964) com um quarto da concentração recomendada. Após sete dias, substituiu-se essa solução por outra com metade da concentração recomendada. Seguindo-se sete dias a solução foi trocada por outra com a concentração recomendada. Depois desse

procedimento, a troca da solução com a concentração recomendada foi realizada a cada sete dias. A água foi fornecida através do sistema de irrigação por gotejamento.

A coleta foi realizada aos 75 dias após o plantio, no meio do enchimento do grão. Separou-se a parte aérea, a raiz e os nódulos (quando presentes). Em seguida, procedeu-se à secagem da parte aérea e da raiz em estufa a 65°C por um período de quatro dias e dos nódulos em sílica gel até estabilização do peso para a determinação da proporção de matéria seca (MS). Passados esse período determinou-se o peso seco do material. Após esse procedimento, as amostras foram processadas em moinho tipo Wiley (peneiras de 2 mm), e posteriormente em moinho de rolos similar ao descrito por Arnold e Schepers (2004), até formar pó.

Em seguida, pesaram-se sub-amostras da parte aérea, da raiz e dos nódulos, para determinação do N total, por meio de digestão Kjeldahl, em mistura digestora contendo ácido sulfúrico e catalisadores, com posterior destilação a vapor e titulometria com ácido sulfúrico (ALVES et al., 1994). Também foram retiradas alíquotas para análises da razão isotópica de ¹⁵N nos tecidos da planta e da semente pelo método de Dumas (BODDEY et al., 1994) em um analisador elementar CHNS-O (Modelo ECS 4010, Costech Analytical Technologies Inc., Valencia, USA), acoplado a um espectrômetro de massas de razão isotópica (Modelo Delta V, Thermo Scientific, Bremen, Alemanha), conforme descrito por RAMOS et al. (2001).

O valor 'B' foi determinado conforme descrito no experimento anterior.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente para separar as médias ao teste de Student, por meio do software Sisvar (FERREIRA, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Primeiro experimento: Teste de interação entre plantas de soja e diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* em casa de vegetação

4.1.1 Acúmulo de massa seca e nitrogênio total em plantas de soja

A ausência de nódulos nas plantas não inoculadas mostra que não houve contaminação deste tratamento com bactérias derivadas dos outros inoculantes e indica que não houve contaminação cruzada de um tratamento com outro. A produção de massa seca pelas plantas de soja inoculadas com as diferentes estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* foram muito superiores as plantas controle, não inoculada confirmando a contribuição da FBN das simbioses formadas por todas as estirpes de *B. japonicum* e seis das nove estirpes de *B. elkanii* (Tabela 4). As estirpes USDA 76, USDA 94 e USDA 130 testadas neste experimento foram as únicas exceções, apresentaram baixa eficiência, não promoveram nodulação significativa e os resultados de massa seca foram muito próximos ao do controle. Desta observação concluímos que estas estirpes não são capazes de formar simbioses efetivas com a cultivar de soja utilizada (BRS 133), ou como estas estirpes foram estocadas (liofilizadas) há muito anos na coleção da Embrapa Agrobiologia, perderam sua efetividade.

Nas plantas inoculadas com as demais estirpes o acúmulo de massa seca foi muito semelhante, em média de 5,39 g massa seca.vaso⁻¹ para planta inteira de *B. japonicum* e de 5,27 g massa seca.vaso⁻¹ quando inoculada com *B. elkanii*.

Tabela 4. Acúmulo de matéria seca por vaso (2 plantas por vaso) de soja cv BRS 133 inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e colhidas aos 46 dias após o plantio.

Tratamentos	Parte Aérea	Raiz	Nódulo	Planta Inteira
	g massa seca.vaso ⁻¹			
CPAC7 ¹	4,27 ab	1,00 ^{ns}	0,53 a	5,80 abc
CPAC 15 ¹	3,72 bc	0,84	0,36 b	4,91 d
USDA 6 ¹	3,81 bc	0,91	0,40 b	5,11 cd
USDA 110 ¹	4,16 abc	1,05	0,56 a	5,76 abc
29 W ²	3,85 bc	0,78	0,61 a	5,24 bcd
SEMIA 587 ²	4,30 ab	1,14	0,63 a	6,07 a
SM1b ²	3,95 abc	0,96	0,60 a	5,51 abcd
DF395 ²	4,51 a	0,89	0,57 a	5,97 ab
USDA 46 ²	3,60 c	0,93	0,59 a	5,11 cd
USDA 31 ²	2,57 d	0,83	0,35 b	3,75 e
CV (%)	13	20	16	12
Não Inoculada	0,65	0,30	0,00	0,96
USDA 76 ²	0,53	0,28	0,03	0,84
USDA 94 ²	0,66	0,28	0,14	1,08
USDA 130 ²	0,56	0,22	0,13	0,91

Valores médios de 5 repetições. Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo. ¹*Bradyrhizobium japonicum*; ²*Bradyrhizobium elkanii*.

Apesar de não haver uma diferença marcante entre as duas espécies de bactérias os resultados de análise de variância mostraram que houve diferenças significativas entre os tratamentos para massa seca da parte aérea, nódulos e planta inteira.

As plantas que apresentaram maiores valores de médias de massa seca na parte aérea e na massa seca da planta inteira, quando comparadas ao tratamento controle foram as inoculadas com as estirpes CPAC 7, SEMIA 587, USDA 110 e DF 395. Com isso observou-se que as estirpes USDA 110 e DF 395 estabelecem simbioses eficientes quando comparada as estirpe atualmente recomendadas pelo Ministério da Agricultura (CPAC 7, CPAC 15, 29 W, SEMIA 587). Okito et al. (2004) em trabalho realizado, usando a cv de soja Celeste e coletando as plantas aos 82 dias após o plantio não encontrou diferença significativa para acúmulo de MS na parte aérea e na planta inteira usando as estirpes CPAC 7 e 29 W.

Com relação ao peso dos nódulos as estirpes que apresentaram maiores acúmulos de MS foram as estirpes CPAC 7, USDA 110, DF 395, USDA 46, SM1b, 29W, SEMIA 587. Estudo realizado por Okito et al. (2004), mostrou que a estirpe 29 W apresentou maior acúmulo de massa seca de nódulos, enquanto a estirpe CPAC 7 apresentou um menor acúmulo de massa seca de nódulos. Pauferro et al. (2010) e Guimarães et al. (2008), em trabalho conduzido em vasos no campo com solo, mostrou que os tratamentos de inoculação com as estirpes 29 W e SEMIA 587 apresentou maiores valores de massa seca de nódulos do que estirpes CPAC 7 e CPAC 15.

Tratando-se do N total acumulado nas plantas de soja, as que apresentaram maior acúmulo na parte aérea e na planta inteira, foram as plantas inoculadas com as estirpes CPAC 7, SEMIA 587, DF 395, USDA 110 (Tabela 5). Os valores de N total foram muito próximos para a parte aérea das plantas de soja, a média variou entre 79 mg N. vaso⁻¹ e 74 mg N. vaso⁻¹ para *B. japonicum* e *B. elkanii* respectivamente. Resultado semelhante foi observado por Nishi et al. (1996) com soja, onde observou que as plantas com maiores quantidades de matéria seca apresentaram também maior acúmulo de N.

Quanto ao acúmulo de N total nos nódulos, as estirpes que apresentaram maiores médias quando comparadas ao tratamento controle foram SM1b, DF 395, SEMIA 587, USDA 46, 29 W (*B. elkanii*) e USDA 110, CPAC 7 (*B. japonicum*), isso mostra que estas estirpes não apresentaram diferenças quanto ao N acumulado nos nódulos, mesmo pertencendo a espécies diferentes. Okito et al. (2004) observou que a estirpe 29 W apresentou maior acúmulo de N total, comparando com a estirpe CPAC 7, porém apesar dessa constatação, a média de MS da parte aérea foram iguais para as duas estirpes.

Tabela 5. Acúmulo de nitrogênio total e eficiência nodular por vaso (2 plantas por vaso) de soja cv BRS 133 inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e colhidas aos 46 dias após o plantio.

Tratamentos	Parte Aérea	Raiz	Nódulo	Planta Inteira	Eficiência Nodular
	mg N.vaso ⁻¹				mg N PLMS Nódulo ⁻¹
CPAC7 ¹	91 a	21 a	33 bc	145 a	224 b
CPAC 15 ¹	64 d	15 c	21 f	100 f	204 bc
USDA 6 ¹	73 c	17 b	22 ef	113 e	258 a
USDA 110 ¹	88 ab	21 a	30 cd	138 bc	228 b
29 W ²	84 b	18 b	33 bc	135 c	208 bc
SEMIA 587 ²	88 a	21 a	33 bc	143 ab	214 bc
SM1b ²	72 c	15 c	34 ab	121 d	191 cd
DF395 ²	90 a	19 b	30 bcd	139 abc	223 b
USDA 46 ²	63 d	18 b	38 a	118 de	166 d
USDA 31 ²	47 e	18 b	26 de	91 ga	216 b
CV (%)	4	7	11	4	10
Não Inoculada	7	4		11	

Valores médios de 5 repetições. ¹Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade. ¹*Bradyrhizobium japonicum*; ²*Bradyrhizobium elkanii*.

Dobereiner et al. (1970) mostraram que a estirpe CB 1809 (subsequentemente Rumjanek et al. [1993] mostrou que CPAC 7 é uma re-isolada de CB 1809) foi muito mais eficiente na fixação de N₂ quando comparada a estirpe 29 W. Neste caso a eficiência nodular é definida como a quantidade de N fixado (acumulado na planta inteira) por mg de massa seca de nódulo. Neves et al. (1985) também mostrou que a concentração ureídica na seiva em plantas de soja inoculadas com CB 1809 foi maior do que para as plantas inoculadas com 29 W.

As menores médias de acúmulo de N total foram para as estirpes USDA 6, USDA 31, CPAC 15, não apresentando nenhuma tendência de ser maior para as estirpes de *B. elkanii* em comparação com as estirpes de *B. japonicum*.

As plantas inoculadas com as estirpes USDA 76, USDA 130, USDA 94, não foram analisadas quanto a esse parâmetro, por apresentarem capacidade extremamente baixa de formar nódulos.

4.1.2 Abundância natural de ¹⁵N e valor 'B'

O tratamento inoculado que apresentou valor de $\delta^{15}\text{N}$ mais negativo na parte aérea foi a estirpe USDA 31, quando comparado aos tratamentos inoculados. Os demais tratamentos apresentaram valores menos negativos. Estes resultados são diferentes dos encontrados por Okito et al. (2004) onde observou valores de médias na parte aérea e planta inteira mais negativos em plantas inoculadas com a estirpe 29 W e valores menos negativos, porém maiores quando a planta foi inoculada com a estirpe CPAC 7.

Tabela 6. Abundância natural de ^{15}N (‰) em plantas de soja cv BRS 133 inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*; e valor ‘B’ em plantas de soja colhidas aos 46 dias após plantio.

Tratamentos	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)			Valor ‘B’	
	Parte Aérea	Raiz	Nódulo	Parte Aérea	Planta Inteira
CPAC7 ²	-2,63 d ¹	-0,51 bcd	8,17 a	-2,99 b	0,07 ab
CPAC 15 ²	-2,63 d	-0,28 ab	5,93 fg	-3,16 b	-0,65 e
USDA 6 ²	-2,74 d	-0,76 cd	6,41 de	-3,21 b	-0,74 e
USDA 110 ²	-2,42 c	-1,53 e	6,13 ef	-2,78 a	-0,53 e
29 W ³	-2,36 ab	-0,50 bc	5,66 g	-2,72 a	-0,24 cd
SEMIA 587 ³	-2,65 d	-0,36 ab	5,80 fg	-3,02 b	-0,47 de
SM1b ³	-2,65 d	-0,52 bcd	6,89 c	-3,12 b	0,24 b
DF395 ³	-2,73 d	-0,15 a	7,52 b	-3,10 b	-0,23 cd
USDA 46 ³	-2,22 a	-0,81 d	3,84 h	-2,71 a	-0,17 bc
USDA 31 ³	-3,07 e	-0,51 bcd	6,57 cd	-3,94 c	0,14 a
DMS	0,18	0,30	0,36	0,19	0,30

Valores médios de 5 repetições. ¹Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste DMS (Student) a 5% de probabilidade. ²*Bradyrhizobium japonicum*. ³*Bradyrhizobium elkanii*.

Os valores $\delta^{15}\text{N}$ das raízes, independente do tratamento de inoculação apresentaram - se todos negativos, diferente do encontrado em trabalhos realizados por Okito et al. (2004); Guimarães et al. (2008), Pauferro et al. (2010).

Todas as estirpes, de uma maneira geral, apresentaram valores de $\delta^{15}\text{N}$ altos nos nódulos, se destacando, as plantas inoculadas com as estirpes DF 395 e CPAC 7, resultados semelhantes foram encontrados por Okito et al. (2004); Guimarães et al.(2008); Pauferro et al. (2010), quando testaram as estirpes 29 W e CPAC 7.

O valor ‘B’ da parte aérea (denominada ‘ B_{pa} ’ em paralelo da nomenclatura utilizada por Okito et al. [2004] que usou ‘ B_s ’- ‘B’ “shoot”) é o valor ‘B’ util para calcular contribuições da FBN às leguminosas noduladas em campo onde a coleta total das raízes é impossível ou extremamente difícil. Os valores de ‘ B_{pa} ’ neste experimento foram aproximadamente da mesma magnitude, negativo entre -2 e -4 ‰ daqueles valores encontrados anteriormente pela equipe da Embrapa Agrobiologia (OKITO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2008; PAUFERRO et al., 2010). Entretanto, nestes trabalhos anteriores encontram-se valores para estirpes 29 W e/ou SEMIA 587 (ambas *B. elkanii*) significativamente mais negativo dos valores de plantas noduladas com as estirpes CPAC 7 e/ou CPAC 15 (ambas *B. japonicum*).

Para a estimativa do valor ‘B’ para a planta inteira, encontram-se valores mais negativos nas plantas inoculadas com as estirpes USDA 110, CPAC 15, SEMIA 587, USDA 6. Todos os valores de ‘B’ da planta inteira (denominado ‘ B_{pi} ’) em todos tratamentos foram menos de 1 unidade de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) diferente de zero sugerindo que as simbioses tem pouco tendência de mostrar fracionamento isotópico significativo conforme alegado por Unkovich et al (2013). Este resultado foi em contraste dos trabalhos anteriores da equipe da Embrapa Agrobiologia (op. cit.) que encontraram valores mais negativo quando utilizou a estirpe 29 W e valor menos negativo quando usou a estirpe CPAC 7.

4.2 Segundo experimento casa de vegetação

4.2.1 Massa seca da parte aérea, raiz, nódulos e planta inteira

Este experimento foi feito para comparar o comportamento de três estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* com seis estirpes de *B. elkanii*, referente à sua capacidade de formar uma simbiose fixadora de N₂ com três cultivares de soja. Como foi utilizada três variedades, o número de estirpes estudadas neste experimento foi reduzido para limitar o tamanho de experimento (ainda com 150 vasos). A única colheita foi realizada 47 dias após plantio, quando as plantas estavam em pleno florescimento.

Na acumulação de massa seca na parte aérea, as raízes e os nódulos não houve diferenças significativas entre as três cultivares de soja (Tabela 7). As estirpes que mais acumulou MS foram as três estirpes de *B. japonicum*, destacando a estirpe CPAC 7 recomendada para a fabricação de inoculantes no Brasil, desde 1992 e a estirpe 29 W de *B. elkanii* também uma estirpe recomendada, desde 1979 (Tabelas 7 e 8). As outras estirpes recomendadas hoje (SEMIA 587 e CPAC 15) não foram incluídas neste experimento.

Mais uma vez a nodulação USDA 76, a estirpe padrão de *B. elkanii*, formou poucos nódulos nas três cultivares de soja. Porém, concluímos que a estirpe estocada há muito anos na coleção de Embrapa Agrobiologia perdeu sua capacidade de nodular eficientemente com soja. Em seguida Dra Mariângela Hungria, da Embrapa Soja gentilmente forneceu um isolado desta estirpe da sua coleção, que foi utilizada no experimento subsequente.

Tabela 7. Acúmulo de matéria seca em plantas de soja cv BRS 133, BRS 184, Monsoy 9144 e inoculadas com as estirpes *Bradyrhizobium*, colhidas aos 47 dias após o plantio.

Tratamento	Parte Aérea				Raiz				Nódulo			
	BRS 133	BRS 184	Monsoy 9144	Média	BRS 133	BRS 184	Monsoy 9144	Média	BRS 133	BRS 184	Monsoy 9144	Média
	g massa seca.vaso ⁻¹											
CPAC 7 ¹	3,44 a	3,10 a	3,58 a	3,37 a	0,69 a	0,60 a	0,67 a	0,65 a	0,31 b	0,20 b	0,25 b	0,25 bc
USDA 6 ¹	2,57 b	2,63 a	2,15 cd	2,45 c	0,60 abc	0,51 a	0,41 de	0,51 bc	0,19 cd	0,19 b	0,15 c	0,18 d
USDA 110 ¹	3,01 ab	2,65 a	2,59 bc	2,75 b	0,65 ab	0,54 a	0,55 abcd	0,58 ab	0,27 bc	0,25 b	0,26 b	0,26 b
29 W ²	2,85 b	2,71 a	2,77 b	2,78 b	0,67 ab	0,52 a	0,58 ab	0,59 ab	0,47 a	0,41 a	0,35 a	0,41 a
USDA 31 ²	1,45 cd	1,93 b	1,32 e	1,57 e	0,54 bc	0,54 a	0,48 bcde	0,52 bc	0,18 cd	0,25 b	0,18 bc	0,20 cd
USDA 46 ²	1,92 c	2,00 b	1,86 d	1,93 d	0,61 abc	0,54 a	0,57 abc	0,58 ab	0,30 b	0,34 a	0,23 bc	0,29 b
USDA 76 ²	0,84 e	1,27 c	1,16 e	1,09 f	0,57 abc	0,51 a	0,51 bcd	0,53 bc	0,02 f	0,03 c	0,04 d	0,03 f
USDA 94 ²	0,97 de	1,02 c	0,90 e	0,96 f	0,48 c	0,51 a	0,43 cde	0,48 c	0,05 ef	0,04 c	0,03 d	0,04 ef
USDA 130 ²	1,04 de	0,82 c	1,00 e	0,95 f	0,48 c	0,32 b	0,35 e	0,38 d	0,12 de	0,06 c	0,06 d	0,08 e
Média	2,01	2,01	1,92		0,59	0,51	0,50		0,21	0,20	0,17	
Não Inoculado	0,27	0,43	0,69	0,46	0,39	0,50	0,47	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00
CV(%)	18				19				32			

Valores médios de 5 repetições. Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade. ns não significativo. ¹*Bradyrhizobium japonicum*; ²*Bradyrhizobium elkanii*.

4.2.2 Eficiência nodular

Conforme explicado nos Resultados e Discussão do Experimento 1, foi calculado a eficiência nodular (mg N derivada da FBN por g de MS dos nódulos) (Tabela 8). Como a nodulação das estirpes USDA 76, USDA 94 e USDA 130 foi muito baixa e talvez os nódulos não foram efetivos, a eficiência nodular para estas estirpes não foram tabuladas.

Neste experimento a diferença em eficiência nodular entre as plantas inoculadas por estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* foi grande, sendo este parâmetro maior para as estirpes de *B. japonicum* conforme relatada anteriormente pelas equipes trabalhando na Embrapa Agrobiologia desde 1970 (DOBEREINER et al., 1970; NEVES et al., 1985; SANTOS et al., 1996; SANTOS et al., 1997; OKITO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2008 e PAUFERRO et al., 2010).

Tabela 8. Acúmulo de matéria seca em plantas inteiras de soja e eficiência nodular nas cv BRS 133, BRS 184, Monsoy 9144 e inoculadas com as estirpes *Bradyrhizobium*, colhidas aos 47 dias após o plantio.

Tratamentos	Planta Inteira (g massa seca.vaso ⁻¹)				Eficiência Nodular (mg N PI.MS nódulo ⁻¹)			
	BRS 133 ^{ns}	BRS 184	Monsoy 9144	Média	BRS 133 ^{ns}	BRS 184	Monsoy 9144	Média
CPAC 7 ¹	4,43 a	3,90 a	4,50 a	4,28 a	591 bc	860 ^{ns}	694 ^{ns}	720 a
USDA 6 ¹	3,35 bc	3,33 bc	2,71 c	3,13 c	742 bc	738	690	729 a
USDA 110 ¹	3,93 ab	3,44 ab	3,39 b	3,59 b	600 bc	524	526	554 b
29 W ²	3,99 a	3,64 a	3,69 b	3,77 b	317 c	319	432	359 c
USDA 31 ²	2,18 d	2,71 c	1,98 d	2,29 d	374 bc	377	337	368 c
USDA 46 ²	2,83 c	2,89 bc	2,66 c	2,79 c	352 c	314	426	368 c
USDA 76 ²	1,43 e	1,80 d	1,71 d	1,65 e	nd	nd	nd	nd
USDA 94 ²	1,50 e	1,58 d	1,36 d	1,48 e	nd	nd	nd	nd
USDA 130 ²	1,64 de	1,20 d	1,41 d	1,42 e	nd	nd	nd	nd
Média	2,81	2,72	2,60		499	526	523	
Não Inoculado	0,66	0,93	1,16					
CV(%)			17				86	

Valores médios de 5 repetições. Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo. nd – não determinada devido ao baixo peso de nódulos (<0.05 g). ¹*Bradyrhizobium japonicum*. ²*Bradyrhizobium elkanii*.

4.2.3 Acúmulo de N total na parte aérea, raiz, nódulo e planta inteira

Da mesma maneira que não houve diferenças significativas entre variedades da soja referente à sua acumulação de MS na parte aérea, raízes ou nos nódulos, também não houve diferenças no acúmulo de N total entre as cultivares (Tabela 9). Houve uma forte influência das estirpes de *Bradyrhizobium* no acúmulo de N total nas plantas, conforme observado para acúmulo de MS. A estirpe CPAC 7 destacou-se como aquela que mais promoveu o acúmulo de N da FBN, seguidas pelas outras duas estirpes de *B. japonicum* (USDA 06 e USDA 110) e a estirpes 29 W da *B. elkanii*.

Tabela 9. Acúmulo de nitrogênio total por vaso (2 plantas por vaso) de soja cv BRS 133, BRS 184, Monsoy 9144 inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e colhidas aos 47 dias após o plantio.

Tratamentos	Parte Aérea				Raiz				Nódulo			
	BRS 133	BRS 184	Monsoy 9144	Média	BRS 133	BRS 184	Monsoy 9144	Média	BRS 133	BRS 184	Monsoy 9144	Média
	mg N.vaso ⁻¹											
CPAC 7 ¹	134 a	115 a	134 a	128 a	24 a	20 a	23 a	22 a	20 b	14 c	17 ab	17 b
USDA 6 ¹	101 b	110 ab	80 cd	97 b	21 ab	17 abc	13 bc	17 b	13 cd	15 bc	10 c	13 c
USDA 110 ¹	122 a	99 ab	92 bc	104 b	19 bc	18 abc	15 b	17 b	16 bc	17 abc	17 ab	17 b
29 W ²	101 b	95 b	107 b	101 b	18 bc	15 bc	15 b	16 bc	28 a	21 a	23 a	24 a
USDA 46 ²	68 c	69 c	62 c	66 c	19 b	19 ab	15 b	18 b	16 bc	20 ab	14 bc	17 b
USDA 76 ²	9 f	15 d	18 f	14 f	11 de	9 d	10 cd	10 d	1 g	1 d	2 d	1 d
USDA 94 ²	14 ef	19 d	12 f	15 f	9 e	9 d	9 d	9 d	2 fg	2 d	1 d	2 d
USDA 130 ²	31 de	27 d	29 ef	29 f	11 de	7 d	8 d	9 d	7 ef	3 d	3 d	4 d
Média	71	73	71		17	14	14		13	12	11	
Controle	3	5	9		10	10	8		0	0	0	
CV (%)	21				23				36			

Valores médios de 5 repetições. Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade.

¹*Bradyrhizobium japonicum*; ²*Bradyrhizobium elkanii*.

Tabela 10. Acúmulo de nitrogênio total por vaso (2 plantas por vaso) de soja cv BRS 133, BRS 184, Monsoy 9144 inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e colhidas aos 47 dias após o plantio.

Tratamentos	Planta Inteira (mg N.vaso ⁻¹)			Média
	BRS 133	BRS 184	Monsoy 9144	
CPAC 7 ¹	179 a	148 a	174 a	167 a
USDA 6 ¹	136 b	142 a	104 cd	127 b
USDA 110 ¹	157 ab	133 ab	124 bc	138 b
29 W ²	148 b	130 ab	145 b	141 b
USDA 31 ²	68 d	92 c	60 e	73 d
USDA 46 ²	104 c	108 bc	91 c	101 c
USDA 76 ²	21 f	25 d	29 f	25 f
USDA 94 ²	26 ef	30 d	22 f	26 f
USDA 130 ²	49 de	38 d	41 ef	42 e
Média	99	94	88	
CV(%)	19			
Não Inoculado	13	15	17	15

Valores médios de 5 repetições. Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade. ¹-*Bradyrhizobium japonicum*; ²-*Bradyrhizobium elkanii*

4.2.4 Abundância natural de ¹⁵N na parte aérea, raiz, nódulo e planta inteira

Não houve diferenças significativas para os valores de abundância natural de ¹⁵N ($\delta^{15}\text{N}$) da parte aérea, nódulos e planta inteira entre as diferentes variedades da soja, mas houve diferenças entre as plantas noduladas pelas diferentes estirpes (Tabela 11). Excluindo as três estirpes de *B. elkanii*, onde a nodulação foi menos de 0,05 g nódulos por vaso. A parte aérea das plantas noduladas com estirpes de *B. elkanii*, foram mais negativos em $\delta^{15}\text{N}$, quando comparadas com os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas noduladas com *B. japonicum*. Este resultado é consistente com os estudos anteriores, conduzidos pela equipe de Embrapa Agrobiologia anteriormente (OKITO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2008; PAUFERRO et al., 2010).

Mais uma vez, excluindo as três estirpes de *B. elkanii* onde a nodulação foi menos de 0,05 g nódulos, o enriquecimento dos nódulos foi maior nos tratamentos inoculados com *B. japonicum*, do que com *B. elkanii*. Este resultado também está em consonância com os três trabalhos da equipe da Embrapa Agrobiologia (*op. cit.*).

Os valores 'B' da parte aérea (B_{pa}) reflete os da parte aérea, sendo mais negativo no caso de *B. elkanii* do que nos tratamentos inoculados com *B. japonicum*. Os valores de 'B' para a planta inteira (B_{pi}) de plantas noduladas com estirpes de *B. elkanii* foram muito semelhante os da *B. japonicum* e em todos os casos menos de 1 unidade de delta (‰) diferente de zero, a abundância natural de ¹⁵N do N₂ do ar. Estes resultados não apoiaram a hipótese que haja um fracionamento isotópico no processo da fixação de N₂ pela simbiose soja/*Bradyrhizobium*.

Tabela 11. Abundância natural de ^{15}N (‰) em diferentes variedades de soja inoculadas com estirpes de *B. japonicum* ou *B. elkanii* e colhidas aos 47 dias após o plantio.

Tratamentos	Parte Aérea				Raiz				Nódulo			
	$-\delta^{15}\text{N}(\text{‰})-$											
	BRS 133	BRS 184	Monsoy 9144	Média	BRS 133	BRS 184	Monsoy 9144	Média	BRS 133	BRS 184	Monsoy 9144	Média
CPAC 7 ¹	-1,24 c	-1,12 abc	-1,13 abc	-1,16 bc	0,83 c	1,15 d	1,22 d	1,07 d	6,56 a	6,60 a	6,36 ab	6,51 ab
USDA 6 ¹	-1,32 bc	-1,20 bc	-1,16 abcd	-1,23 cd	0,59 c	0,71 e	0,59 f	0,63 e	6,38 a	7,07 a	6,92 a	6,79 a
USDA 110 ¹	-1,15 c	-0,92 ab	-1,00 a	-1,02 ab	0,67 c	1,25 cd	1,32 cd	1,08 d	6,28 a	6,40 a	5,90 b	6,19 b
29 W ²	-1,69 d	-1,62 d	-1,44 cde	-1,58 ef	1,77 a	0,66 e	0,90 e	1,11 d	4,92 b	4,72 b	4,70 c	4,78 c
USDA 31 ²	-1,46 cd	-1,39 cd	-1,37 bcd	-1,41 de	1,47 d	1,55 ab	2,36 a	1,79 a	4,15 c	4,20 b	3,80 d	4,05 d
USDA 46 ²	-1,31 c	-1,41 cd	-1,49 de	-1,40 de	0,74 c	0,68 e	1,60 b	1,01 d	3,98 c	4,49 b	4,48 cd	4,32 d
USDA 76 ²	-0,85 ab	-0,78 a	-1,04 ab	-0,89 a	1,28 d	1,36 bcd	1,28 cd	1,31 c	2,24 d	1,46 d	1,73 ef	1,81 f
USDA 94 ²	-0,77 a	-0,80 a	-0,92 a	-0,83 a	1,36 d	1,45 bc	1,51 bc	1,44 bc	1,49 e	1,51 d	1,45 f	1,48 f
USDA 130 ²	-1,73 d	-1,65 d	-1,72 e	-1,70 f	1,51 d	1,76 a	1,51 bc	1,59 b	2,24 d	2,34 c	2,37 e	2,32 e
Média	-1,29	-1,25	-1,28		1,14	1,23	1,46		4,48	4,53	4,45	
DMS	0,34	0,34	0,34	0,20	0,28	0,28	0,28	0,16	0,70	0,70	0,70	0,41
Não Inoculado	0,62	0,98	1,56		0,38	0,86	1,04					

Valores médios de 5 repetições. Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade.

¹*Bradyrhizobium japonicum*; ²*Bradyrhizobium elkanii*.

Tabela 12. Valor 'B' em diferentes variedades de soja inoculadas com estirpes de *B. japonicum* ou *B. elkanii* e colhidas aos 47 dias após o plantio.

Tratamentos	Valor 'B' (‰)							
	Parte Aérea [†]				Planta Inteira [‡]			
	BRS 133	BRS 184	Monsoy9144	Média	BRS 133	BRS 184	Monsoy9144	Média
CPAC 7 ¹	-1,27 a	-1,16 abc	-1,17 ab	-1,20 a	-0,08 bc	-0,08 cd	-0,09 bc	-0,08 c
USDA 6 ¹	-1,37 ab	-1,24 abcd	-1,23 ab	-1,28 ab	-0,30 cd	-0,32 de	-0,33 cd	-0,32 d
USDA 110 ¹	-1,19 a	-0,95 a	-1,05 a	-1,06 a	-0,17 bcd	-0,18 cd	-0,18 bc	-0,18 cd
29 W ²	-1,75 bc	-1,69 Ef	-1,50 abc	-1,65 d	0,02 bc	0,03 bc	0,01 b	0,02 bc
USDA 31 ²	-1,60 abc	-1,48 bcd	-1,59 bcd	-1,55 cd	0,00 bc	0,03 bc	-0,02 bc	0,00 bc
USDA 46 ²	-1,39 ab	-1,49 def	-1,60 bcd	-1,49 bcd	-0,10 bc	-0,10 cd	-0,12 bc	-0,11 c
USDA 76 ²	-1,35 ab	-1,08 abc	-1,23 ab	-1,22 a	0,43 a	0,74 a	0,57 a	0,58 a
USDA 94 ²	-1,17 a	-1,02 Ab	-1,76 d	-1,32 abc	0,16 ab	0,31 b	0,13 b	0,20 b
USDA 130 ²	-1,97 c	-1,96 f	-2,02 cd	-1,99 e	-0,46 d	-0,58 e	-0,59 d	-0,54 e
Média	-1,45	-1,34	-1,46		-0,06	-0,02	-0,07	
DMS	0,47	0,47	0,47	0,27	0,34	0,34	0,34	0,19

Valores médios de 5 repetições. Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade. ¹*Bradyrhizobium japonicum*; ²*Bradyrhizobium elkanii*. †Corrigido para δ 15N(‰) e teor de N total de sementes. ‡Média ponderada corrigido para δ 15N(‰) e teor de N total de sementes.

4.3 Terceiro experimento em vasos no campo

4.3.1 Acúmulo de massa seca nas plantas

O acúmulo de MS pelas plantas não inoculadas, tanto na sombra, quanto no sol, foi muito baixa, mostrando pouca contaminação do substrato com *Bradyrhizobium* capazes de nodular a soja (Tabela 13).

Os resultados mostram que para os parâmetros de matéria seca (MS) da parte aérea, das raízes e da planta inteira, a variância foi extremamente baixa (CV <5,2 %). Na média a acumulação de MS foi maior para as plantas (e todos os componentes: parte aérea, raízes, nódulos) expostas ao pleno sol, em comparação com sombra (Tabela 13). Em média as plantas no pleno sol mostraram somente 25 % mais MS acumulada na parte aérea, mas a MS das raízes foi mais de três vezes maior do que na sombra, talvez a necessidade de facilitar a captação de água, como à transpiração das plantas foi muito maior no sol, onde na maior parte do tempo a temperatura passou de 40°C no período da tarde, quase todos os dias no período do experimento. A nodulação das plantas no pleno sol também foi muito maior (na média 2,5 vezes mais MS), mas não se sabe se isso foi devido à maior temperatura ou maior intensidade da luz.

Santos et al. (1996) avaliando eficiência simbiótica da cv Doko, em pleno sol e 30% de sombreamento, usando a estirpe 29 W (*B. elkanii*) e BR-33 (CB 1809, uma variante da estirpe CPAC 7 - *B. japonicum*) também encontraram uma inibição de crescimento das plantas sombreadas. Esses resultados confirmam que experimentos conduzidos em casa de vegetação não necessariamente mostram congruência com os experimentos conduzidos em condições de campo (NEVES et al., 1985). Santos et al. (1997) também relatou que a FBN em plantas de soja crescidas em condições de campo foi superior à condição de luminosidade reduzida, que normalmente ocorre em casa de vegetação.

Isto é um indício de que a estirpe é um drenó de carbono necessitando, portanto, de condições ambientais onde a fotossíntese seja mais ativa. De uma maneira geral, isto foi evidenciado pela maior massa seca da planta como um todo.

Plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 587 apresentaram um maior acúmulo de MS na parte aérea e na planta inteira, tanto no sol quanto na sombra, do que as demais estirpes. Quando as plantas foram inoculadas com a estirpe 29 W em pleno sol elas apresentaram maiores valores de MS de parte aérea, nódulos e planta inteira. A estirpe USDA 31 promoveu a formação de muito menos nódulos do que as outras estirpes no experimento e isso foi refletido no baixo acúmulo de MS nas plantas neste tratamento. Com exceção deste tratamento, as plantas inoculadas com *B. elkanii* apresentaram maiores MS de nódulos do que aquelas inoculadas com *B. japonicum* conforme observado em comparações entre estirpes destas espécies anteriormente (e.g. DOBERIENER et al., 1970; NEVES et al. 1985; PAUFERRO et al., 2010). Entretanto, em geral não houve maiores ou menores acúmulos de MS por plantas noduladas pelas estirpes de *B. elkanii* em comparação com *B. japonicum*.

Destacando as quatro estirpes recomendadas para a inoculação da soja no Brasil, CPAC 7, CPAC 15 (*B. japonicum*) e SEMIA 587, 29 W (*B. elkanii*), com relação a MS de nódulos, observa-se que as estirpes de *B. elkanii* apresentou maiores valores, quando comparadas a inoculas com as estirpes de (*B. japonicum*), confirmando dados da literatura (DOBEREINER et al., 1970; NEVES et al., 1985; OKITO et al., 2004, GUIMARÃES et al., 2008; PAUFERRO et al., 2010).

Tabela 13. Acúmulo de matéria seca em plantas de soja cv BRS 133 inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e colhidas aos 75 dias após o plantio. Valores são médias de 5 repetições.

Tratamento	Parte aérea		Raiz		Nódulos		Planta inteira	
	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol
	----- g vaso ⁻¹ -----							
CPAC 7 ¹	12,2 bc	15,1 b	0,60 bc	2,59 bc	0,58 e	2,27 e	13,4 cd	19,9 c
CPAC 15 ¹	12,9 bc	10,7 e	0,70 b	2,33 cd	0,71 d	2,16 e	14,3 bc	15,2 f
USDA 06 ¹	10,2 ef	10,9 e	0,64 bc	2,56 bcd	0,54 e	1,66 f	11,3 f	15,1 f
USDA 110 ¹	8,8 g	13,6 c	0,53 bc	2,68 b	0,41 f	1,69 f	9,80 g	17,9 e
USDA 76 ^{#2}	13,1 b	14,1 c	0,73 b	1,36 fg	1,14 c	2,80 c	15,0 b	18,2 de
29 W ²	9,5 fg	16,8 a	0,50 bc	1,57 ef	1,34 b	3,69 a	11,4 f	22,1 a
SEMIA 587 ²	15,3 a	16,6 a	1,07 a	1,83 e	1,50 a	3,02 b	17,8 a	21,4 ab
SM1b ²	10,1 ef	11,9 d	0,53 bc	1,27 g	1,44 ab	2,65 d	12,1 ef	15,8 f
DF 395 ²	10,7 e	15,1 b	0,67 b	2,96 a	1,48 a	2,94 b	12,8 de	21,0 b
USDA 31 ²	4,2 h	9,2 f	0,40 cd	1,46 fg	0,40 f	1,68 f	5,00 h	12,3 g
USDA 46 ²	11,6 d	13,8 c	0,66 bc	2,32 cd	1,12 c	2,90 bc	13,4 cd	19,0 cd
Não inoculado	1,2 i	1,6 g	0,23 d	0,34 h			1,50 i	1,9 h
Média	10,0 B	12,5 A	0,61 B	1,94 A	0,97 B	2,50 A	11,5 B	16,7 A
CV (%)	5,1		16,4		5,2		5,2	

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste DMS (Student) ao nível de 5% de probabilidade.

* O efeito do tratamento de sombra v pleno solo foi significativa neste parâmetro para este simbiose de estirpe de *Bradyrhizobium* com soja CV BRS 133. # Estirpe cedida pela Dr. Mariângela Hungria, Embrapa Soja. ¹ *Bradyrhizobium japonicum*. ² *Bradyrhizobium elkanii*.

4.3.2 Nitrogênio total acumulado nas plantas de soja

Devido à maior concentração do N na parte aérea das plantas sombreadas, em média a parte aérea acumulou mais N nas plantas sombreadas do que aquelas em pleno sol (Tabela 14). Nos tratamentos individuais houve algumas exceções, como as plantas inoculadas com as estirpes de *B. elkanii*, USDA 31 e 29 W. Entretanto, o N acumulado nas raízes e nódulos foi muito maior no pleno sol do que na sombra, e em consequência a média do N total acumulado nas plantas inteiras foi maior no sol, mas ainda com as exceções de uma estirpe de *B. japonicum* (CPAC 15) e duas estirpes de *B. elkanii* incluindo a estirpe padrão (“Type Strain”) USDA 76, e estirpe SEMIA 587. Santos et al. (1997) também encontrou que o N acumulado em plantas inteiras inoculadas com estirpe de *B. japonicum* BR 33 (CB 1809, uma variante da estirpe CPAC 7) foi maior no pleno sol do que na sombra, mas em contraste dos resultados apresentados nesta tese, também as plantas inoculadas com a estirpe 29 W acumulou mais N no tratamento de pleno sol.

O N total acumulado pelas plantas inteiras é essencialmente o N derivado da FBN, a única outra fonte sendo as sementes (~33 mg N vaso de duas plantas). As plantas em pleno sol, na média tiveram 2,5 vezes mais massa seca de nódulos do que as plantas sombreadas, mas o N derivado da FBN foi na média somente 12 % maior. Este resultado é surpreendente mostrando que a eficiência da fixação de N₂ era muito maior nas condições sombreadas. Dobereiner et al. (1970) foram os primeiros autores que mostraram que as estirpes de *Bradyrhizobium* que nodularam soja (na época todas chamadas *Rhizobium japonicum*) se dividem em dois grupos pela relação do N fixado, ao peso de MS dos nódulos (a chamada “eficiência nodular”). Os dados deste experimento mostram duas características marcantes quando este parâmetro é considerado (Tabela 15). Primeiramente, existe esta grande diferença em eficiência nodular entre as plantas sombreadas e aquelas em pleno sol. Na média as plantas sombreadas fixaram 2,5 vezes mais N por mg de MS nódulo na sombra do que no pleno sol. Santos et al. (1997) realizou experimento semelhante, porém não disponibilizou os dados de nódulos para que pudéssemos fazer essa comparação. Mas parece que na literatura não existe uma explicação deste fenômeno.

Ainda, estes resultados mostram um efeito muito marcante das estirpes na eficiência nodular, especialmente nas condições sombreadas (Tabela 15). Nestas condições a eficiência nodular das estirpes de *B. japonicum* foi na média 1064 mg N acumulado na planta inteira por g de MS nódulo. Excluindo o N derivado das sementes (~33 mg vaso⁻¹) a eficiência nodular foi em média 1041 mg N fixado por g de MS nódulo para as estirpes de *B. japonicum*, comparado com 455 mg N fixado por g de MS nódulo para as plantas noduladas com as estirpes de *B. elkanii*. Considerando que estas estirpes foram de origens muito diferentes (as estirpes do USDA isoladas na Ásia e as outras isoladas no Brasil), a diferença entre as espécies é muito consistente. Ainda as plantas em pleno sol mostraram a mesma tendência, mostrando valores média da eficiência nodular para *B. japonicum* e *B. elkanii* de 294 e 205 mg N fixado por g de MS nódulo, respectivamente. Esta diferença entre a eficiência nodular das estirpes, hoje classificadas como *B. japonicum* e *B. elkanii* já foi relatadas por os vários grupos trabalhando na Embrapa Agrobiologia, desde o trabalho pioneiro de Dra Johanna Dobereiner (DOBEREINER et al. (1970); NEVES et al. (1985), SANTOS et al. (1996), SANTOS et al. (1997), OKITO et al. (2004), GUIMARÃES et al. (2008) e PAUFERRO et al. (2010)), mas este estudo foi feito com muito mais estirpes de cada espécie.

Tabela 14. Nitrogênio acumulado em plantas de soja cv BRS 133 e inoculadas com as estirpes *Bradyrhizobium*, colhidas aos 75 dias após o plantio. Valores são médias de 5 repetições.

Bactéria	Parte aérea		Raiz		Nódulos		Planta inteira		
	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	
	----- mg vaso ⁻¹ -----								
CPAC 7 ¹	589 c	595 a	15* b	58 ab	33* e	115 e	637* c	769 ab	
CPAC 15 ¹	650* b	463 ef	17* b	53 bc	41* d	108 ef	708* b	625 ef	
USDA 06 ¹	485* d	401 g	16* b	58 ab	34* de	89 h	534 d	548 g	
USDA 110 ¹	436 d	429 fg	13* bc	64 a	26* ef	100 g	475* e	593 fg	
USDA76 ^{#2}	660* b	457 ef	18* b	30 d	59* c	146 c	737* b	633 ef	
29 W ²	376* f	554 b	10* bcd	34 d	68* b	185 a	454* e	772 a	
SEMIA 587 ²	733* a	476 de	26* a	46 c	78* a	144 c	838* a	667 de	
SM1b ²	427 d	414 g	12* bc	27 d	83* a	136 d	522* d	576 g	
DF 395 ²	546* cd	496 cd	16* b	65 a	79* a	148 c	641* c	710 cd	
USDA 31 ²	151* f	356 H	7* cd	27 d	24* g	103 fg	182* f	486 h	
USDA 46 ²	585* c	507 c	18* b	53 bc	59* c	163 b	662* c	723 bc	
Controle									
Média	513 A	468 B	15 B	47 A	53 B	131 A	581 B	646 A	
CV (%)	7,2		21,0		6,9		6,5		

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de DMS (Student) ao nível de 5% de probabilidade. * O efeito do tratamento de sombra v pleno foi significativa neste parâmetro para este simbiose de estipe de *Bradyrhizobium* com soja CV BRS 133. # Estirpe cedida pela Dr. Mariângela Hungria, Embrapa Soja. ¹ *Bradyrhizobium japonicum*. ² *Bradyrhizobium elkanii*.

Tabela 15. Eficiência nodular em plantas de soja cv BRS 133 e inoculadas com as estirpes *Bradyrhizobium*, colhidas aos 75 dias após o plantio.

Tratamento	Sombra	Sol
	Eficiência Nodular ----- (mg N fixado. g nódulo ⁻¹) -----	
Controle	-	-
CPAC 7 ¹	1063 b	328 ab
CPAC 15 ¹	957 c	278 bc
USDA 06 ¹	935 c	316 ab
USDA 110 ¹	1110 a	336 a
USDA76 ²	627 d	217 d
29 W ²	321 g	202 d
SEMIA 587 ²	542 e	212 d
SM1b ²	343 g	208 d
DF395	415 f	233 cd
USDA 31 ²	385 f	275 bc
USDA 46 ²	569 e	240 cd
Média	661 A	259 B
CV (%)	8,52	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna, ou da mesma letra maiúscula na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de DMS (Student) ao nível de 5% de probabilidade. * O efeito do tratamento de sombra v pleno sol foi significativa neste parâmetro para esta simbiose da estirpe de *Bradyrhizobium* com soja CV BRS 133. ¹ *Bradyrhizobium japonicum*. ² *Bradyrhizobium elkanii*.

4.3.3 Valores de $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$

Conforme explicado anteriormente o valor 'B' é o valor da abundância natural de ¹⁵N do N na leguminosa derivada da FBN. Em experimentos de campo normalmente é impossível de recuperar mais do que uma fração das raízes e nódulos e para os cálculos da contribuição da FBN utiliza-se somente a parte aérea. Por isso o valor 'B' relevante neste caso é o valor 'B' da parte aérea (B_{pa}). Para este cálculo somente precisa o valor da abundância natural de ¹⁵N da parte aérea menos a contribuição do N e $\delta^{15}\text{N}$ derivado das sementes.

Conforme observado em muitos trabalhos anteriores para muitas espécies de leguminosa (BODDEY et al., 2000), os nódulos foram enriquecidos em ¹⁵N (Tabela 16). Em média os nódulos em plantas sombreadas foram mais enriquecidos (na média por 2,4 ‰) em ¹⁵N do que as plantas nos tratamentos do pleno sol. Houve também uma tendência para os nódulos das plantas inoculadas com *B. japonicum* em condições de menor intensidade de luz de exibir um enriquecimento maior do que dos nódulos das plantas inoculadas com *B. elkanii* nas mesmas condições, mas em pleno sol esta tendência não foi evidenciada.

Durante o processo de FBN ocorreu o fracionamento isotópico, já que os valores do $\delta^{15}\text{N}$ na parte aérea das plantas, independente do tratamento de inoculação, apresentaram-se menores, quando comparados aos valores do $\delta^{15}\text{N}$ da planta inteira, isso mostra uma preferência na distribuição de ¹⁴N para a parte aérea da planta.

Todas as estirpes testadas nesse estudo, na parte aérea das plantas, apresentaram valores de $\delta^{15}\text{N}$ negativos, independente das condições de cultivo (sol ou sombra) e da estirpe inoculada, o que é confirmado por Okito et al. (2004); Guimarães et al. (2008); Pauferro et al.

(2010) que relatam que valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ são observados na parte aérea das plantas de soja. A parte aérea das plantas em pleno sol (e os valores de $\delta^{15}\text{N}$) apresentaram valores de abundância natural de ^{15}N significativamente mais negativos do que as plantas sombreadas. Também, houve uma tendência para a abundância de ^{15}N na parte aérea (e os valores de $\delta^{15}\text{N}$) das plantas dos tratamentos inoculados com estirpes de *B. japonicum* a serem menos negativo do que no caso de plantas inoculadas com *B. elkanii*. Nos trabalhos anteriores de Okito et al. (2004) e Guimarães et al. (2008) a estirpe 29 W de *B. elkanii* promoveu valores de $\delta^{15}\text{N}$ bem menor do que a estirpe CPAC 7, e o mesmo resultado foi registrado por Pauferro et al. (2010) para as outras estirpes recomendadas para a produção comercial de inoculantes no Brasil, as estirpes SEMIA 587 e 29 W (*B. elkanii*) promoveram valores de $\delta^{15}\text{N}$ em soja (cv. Celeste) bem mais negativo do que as estirpes de CPAC 7 e CPAC 15 da *B. japonicum*. Em geral as demais estirpes de *B. elkanii* neste trabalho mostraram valores mais negativos do que os das plantas inoculadas com *B. japonicum*, mas houve algumas exceções, a mais destacada sendo a estirpe padrão (“Type strain”) da *B. japonicum*, USDA 06.

Para calcular o valor $\delta^{15}\text{N}$ da planta inteira ($\delta^{15}\text{N}_{pi}$) é necessário calcular a média ponderada da abundância natural de ^{15}N em toda a planta incluindo parte aérea, raízes, e nódulos e subtrair todo N e $\delta^{15}\text{N}$ das sementes. Houve diferenças significativas, mas da pequena magnitude entre os tratamentos de sombreamento/pleno sol e as estirpes nestes valores de $\delta^{15}\text{N}_{pi}$.

Tabela 16. Valores de $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ e Valor 'B' em plantas de soja cv BRS 133 e inoculadas com as estirpes *Bradyrhizobium*, colhidas aos 75 dias após o plantio. Valores são médias de 5 repetições.

Bactéria	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$						Valor 'B' (%)				
	Parte aérea		Raiz		Nódulos		Parte aérea ¹		Planta inteira ²		
	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	
Controle											
CPAC 7 ³	-0,39 cd	-1,16 a	1,22 d	0,62 e	11,13 abc	8,19 bc	-0,40 cd	-1,18 a	0,25 ef	0,38 cd	
CPAC 15 ³	-0,20 ab	-1,40 b	1,63 abc	0,70 e	11,8 a	8,05 c	-0,20 ab	-1,42 b	0,55 cd	0,53 bc	
USDA 06 ³	-0,05 a	-2,00 cd	1,46 c	0,34 f	10,73 bcd	7,57 cd	-0,05 a	-2,04 cd	0,67 abcd	-0,21 g	
USDA 110 ³	-0,06 a	-1,15 a	1,61 abc	1,57 bc	11,41 ab	8,89 ab	-0,05 a	-1,05 a	0,63 bcd	0,92 a	
USDA76 ⁴	-0,27 bc	-1,45 b	1,13 de	0,65 e	8,29 f	6,18 f	-0,27 bc	-1,48 b	0,47 de	0,42 cd	
29 W ⁴	-1,01 e	-2,31 e	1,51 bc	0,25 f	10,1 de	7,28 de	-1,04 e	-2,34 e	0,73 abc	0,10 ef	
SEMIA 587 ⁴	-0,43 cd	-2,16 de	0,92 e	0,16 f	10,07 de	6,76 ef	-0,44 cd	-2,19 de	0,58 bcd	-0,06 fg	
SM1b ⁴	-1,04 e	-2,19 e	1,72 ab	0,98 d	10,26 de	7,80 cd	-1,06 e	-2,23 e	0,83 ab	0,26 de	
DF 395 ⁴	-0,53 d	-1,88 c	0,43 f	0,68 e	10,64 cd	9,39 a	-0,54 d	-1,91 c	0,89 a	0,72 ab	
USDA 31 ⁴	-1,52 f	-1,92 c	0,28 f	1,77 ab	9,61 e	9,27 a	-1,60 f	-1,97 c	0,01 f	0,69 ab	
USDA 46 ⁴	-0,41 cd	-1,56 b	1,01 de	1,39 c	6,85 g	5,09 g	-0,41 cd	-1,58 b	0,26 ef	0,12 ef	
Média	-0,20 A	-1,39 B	1,22 A	0,92 B	10,08 A	7,67 B	-0,06 A	-1,31 B	0,86 A	0,54 B	
DMS	0,16	0,16	0,22	0,22	0,72	0,72	0,18	0,06	0,25	0,25	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de DMS (Student) ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de DMS (Student) ao nível de 5% de probabilidade. ¹ Corrigido para $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ das sementes assumindo que 50% do N das sementes foi translocado para a parte aérea das plantas. ² Média ponderada corrigido para $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ assumindo que todo o N das sementes foi translocado para a parte aérea das plantas. ³ *Bradyrhizobium japonicum*. ⁴ *Bradyrhizobium elkanii*.

5. DISCUSSÃO GERAL

Hoje, para quantificação da contribuição da fixação biológica de N_2 (FBN) das leguminosas em condições de campo, a técnica de abundância natural de ^{15}N é a mais utilizada. Isso se deve principalmente, por que se precisa de uma única amostragem, durante a ontogenia da cultura, e hoje em dia as facilidades de analisar a abundância isotópica de N com precisão de 0,20 ‰, ou melhor, são relativamente comuns.

Na aplicação da técnica, é necessário avaliar a discriminação isotópica do ^{15}N (abundância natural de ^{15}N) do N na leguminosa derivada do ar (da FBN), o chamado valor 'B'. Isso se torna muito importante no caso de leguminosas que obtêm altas proporções do seu N desta fonte, como é o caso da soja, que tem o potencial de acumular grandes quantidades de N desta fonte (ex. > de 300 kg ha) em solos relativamente pobre em N. Frequentemente pesquisadores utilizaram esta técnica e só depois das análises das amostras do material vegetal retirados do campo, lembram da necessidade de conhecimento do valor 'B'. Neste caso é comum procurar na literatura um valor 'B' e utilizá-lo para os cálculos. Entretanto, este comportamento implica que o valor 'B' determinado em uma circunstância (ex. casa de vegetação) em uma parte do mundo pode ser universalmente aplicado.

Os trabalhos anteriores conduzidos na Embrapa Agrobiologia em parceria com a Universidade Federal do Rio de Janeiro, mostraram que o valor 'B' é bem diferente para plantas de soja noduladas com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, daquelas noduladas com *B. elkanii*. Entre as quatro estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a fabricação de inoculantes comerciais no Brasil, existem duas estirpes de *B. japonicum* (CPAC 7 e CPAC 15) e duas de *B. elkanii* (29 W e SEMIA 587) e os estudos feitos pela equipe mostrou grandes diferenças nos valores 'B' promovidos por estas estirpes diferentes.

Os objetivos principais do estudo desta dissertação foram de determinar esta diferença de valores 'B' entre as duas espécies de *Bradyrhizobium*, determinar o efeito da variedade da soja nestes valores do 'B' e como condições de intensidade da luz impactam neste fator.

O primeiro experimento foi feito para determinar o valor 'B' em casa de vegetação (intensidade de luz reduzida) com quatro estirpes de *B. japonicum* e oito estirpes de *B. elkanii* com uma cultivar de soja (BRS 133). Os resultados mostraram que duas das estirpes de *B. elkanii*, incluindo o estirpe padrão ("Type Strain") da espécie USDA 76, formaram poucos nódulos e foi levantada as hipóteses que este problema poderia ser uma consequência da incompatibilidade desta estirpe com a cultivar utilizada, ou a perda da efetividade da estirpe após muitos anos de estocagem na coleção da Embrapa Agrobiologia. O segundo experimento foi feito para determinar o efeito da variedade da planta nos valores 'B' promovidos por três estirpes de *B. japonicum* e seis estirpes de *B. elkanii* de novo em casa de vegetação com a intensidade de luz reduzida. Mais uma vez a estirpe padrão da *B. elkanii* (USDA 76) formou poucos nódulos indicando que o problema não era incompatibilidade com a variedade BRS 133 da soja. Um isolado da estirpe de USDA 76 foi fornecido da coleção de culturas da Embrapa Soja, e em seguida se mostrou bastante eficiente na simbiose com a soja. No experimento três as plantas foram crescidas em vasos de areia/perlita, metade no pleno sol e os outros numa área coberta com "sombrite" que reduziu a intensidade da luz por 50 %. Este tratamento foi introduzido para simular uma avaliação em condições semelhantes da casa de vegetação e averiguar se este ambiente diferente teria um impacto nos valores do 'B'.

Em todos os experimentos houve pelo menos uma tendência para as plantas inoculadas com as estirpes de *B. elkanii* de acumular mais MS de nódulos do que as plantas noduladas com estirpes de *B. japonicum*. Também houve uma tendência para as estirpes de *B. japonicum* de acumular mais N derivada da FBN e o resultado foi que a eficiência nodular (o N derivado

da FBN por g de MS de nódulo) foi maior em simbioses formadas com *B. japonicum* comparado com *B. elkanii*. No caso de plantas crescidas em vasos no campo e sombreados, esta diferença foi muito grande (mais de duas vezes mais MS de nódulos com plantas noduladas com *B. japonicum* do que com *B. elkanii*). O N acumulado da FBN foi em média somente 12 % maior em plantas crescidas em pleno sol do que na área sombreada, mais como a massa de nódulos foi muito maior a eficiência nodular foi muito maior nas condições de baixa intensidade de luz.

A descoberta deste efeito espetacular da redução de luz na eficiência nodular é inédito e levanta muitas questões sobre a interação de fotossíntese com a fisiologia da soja e a proporia fixação de N₂ por esta simbiose.

Referente à determinação do valor 'B', os resultados indicam que a avaliação do valor 'B' deve ser conduzida em plantas com o mesmo estágio de maturidade que está sendo utilizada para amostrar as plantas no campo. Também a avaliação do valor 'B' em condições de intensidade de luz reduzida (ex. casa de vegetação) pode levar ao resultado de um valor 'B' menos negativo que do que aquele determinado em pleno sol e assim provavelmente menos apropriado para a utilização de calcular a contribuição da FBN em leguminosa em condições de campo.

Se o valor de B_{pi} é significativamente menor do que zero, significa que o processo da fixação de N₂ pela simbiose soja/*Bradyrhizobium* promove um fracionamento isotópico na transformação de N₂ para o N fixado. Unkovich (2013) alegou que não existe evidência com os estudos feitos até agora de apoiar a existência de um fracionamento neste processo, principalmente porque a medição do valor absoluto da abundância de ¹⁵N é cercada com fontes de erro. Os resultados dos trabalhos anteriores de Okito et al., (2004), Guimarães et al., (2008) e Pauferro et al., (2010) mostraram valores negativos e de maior magnitude do que neste presente estudo. Como nos trabalhos anteriores os valores de B_{pi} para as simbioses formadas com soja pelas estirpes de *B. elkanii* foram significativamente mais negativos dos valores daqueles formadas pelas estirpes de *B. japonicum*, um dos valores tem para ser significativamente diferente do zero ‰ (o valor do N₂ do ar). Portanto a evidência apresentada nestes trabalhos anteriores confronta a alegação do Unkovich (2013) e sim, existe um fracionamento isotópico no processo da fixação biológica de N₂ pelas simbioses de soja com *Bradyrhizobium*. Entretanto, a pesar das diferenças estatisticamente significativas nos valores de B_{pi} registrados entre as simbioses formadas pelas diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* nos experimentos conduzidos nesta dissertação, o fato que as magnitudes deles são pequenas (menores de + ou - 1,0 ‰) não é possível de fazer-se uma conclusão firme sobre a possibilidade da existência de um fracionamento isotópico significativa durante o processo da FBN na simbiose de soja com estirpes de *Bradyrhizobium*.

6. CONCLUSÕES

Nos três experimentos, houve pelo menos uma tendência para as plantas noduladas com as estirpes de *B. elkanii* de acumular mais MS de nódulos do que as plantas noduladas com estirpes de *B. japonicum* e ainda uma tendência para as estirpes de *B. japonicum* de acumular mais N derivada da FBN, com isso a eficiência nodular foi maior em simbioses formadas com *B. japonicum* quando comparado com *B. elkanii*.

Para todos os parâmetros avaliados (massa seca, N total acumulado e Valor 'B') não houve influencia das cultivares de soja nos resultados, e sim das estirpes de *Bradyrhizobium spp.* utilizadas.

O valor 'B' deve ser determinado em plantas com o mesmo estágio de desenvolvimento que está sendo utilizada para amostras em plantas no campo. Ainda avaliação do valor 'B' em condições de intensidade de luz reduzida pode levar a resultados de um valor 'B' menos negativo do que aquele determinado em pleno sol e assim provavelmente menos apropriado para a utilização nos cálculos da contribuição da FBN em leguminosa em condições de campo.

Os valores de $\delta^{15}N$ apresentados entre as simbioses formadas pelas diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* nos experimentos conduzidos, as magnitudes deles são pequenas (menores de + ou - 1,0 ‰) com isso não é possível afirmar que houve um fracionamento isotópico significativo durante o processo da FBN na simbiose de soja com *Bradyrhizobium*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAREDA, M.; RODRÍGUES – NAVARO, D. N.; TEMPRANO, F. J. Soybean inoculation: Dose N fertilizer supplementation and rhizobia persistence in soil. **Field crops research**, 113: 352-356, 2009.
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of soybean in Brazil. **Plant and Soil**, 252:1-9, 2003.
- ALVES, B. J. R.; SANTOS, J. C. F.; BODDEY, R. M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, p. 449-470, 1994. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 46).
- ALVES, B.J.R., **Aplicação da técnica de análise de solutos nitrogenados da seiva para a quantificação da fixação biológica de nitrogênio em Desmodium ovalifolium CV**. Itabela. Seropédica, RJ. 1996. 150p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo)- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ.
- ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES F. M.; HECKLER, J.C.; MACEDO, R.A.T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.41, n.3, p.449-456, mar. 2006.
- ARAÚJO, A. S. F.; CARVALHO, E. M. S. **Fixação Biológica de Nitrogênio**. Centro de ciências agrárias, comunicado técnico, n. 11, p. 1-4, abril de 2006.
- ARNOLD, S.L., SCHEPERS, J.S. **A simple roller-mill grinding procedure for plant and soil samples**. Communications in Soil Science and Plant Analysis 35, 537e 545, 2004.
- BETHLENFALVAY, G. S. & PHILLIPS, D. A. Variation in nitrogenase and hydrogenase activity of Alaska pea root nodules. **Plant Physiology**, 63: 816-820, 1979.
- BIZARRO, M. J. **Simbiose e variabilidade de estirpes de Bradyrhizobium associadas a cultura da soja em diferentes manejos de solo**. 2008. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BODDEY R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, 6: 209-266, 1987.
- BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas utilizando o isótopo ¹⁵N. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos em estudo de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, 1994. p. 471-494.
- BODDEY, R.M. & VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with Brachiaria and Paspalum grasses using ¹⁵N-labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, Dordrecht, 90: 265-292. 1986.
- BODDEY, R.M.; PEOPLES, M.B.; PALMER, B.; DART, P. J. Use of the ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.57, p.235-270, 2000.

BREMNER, J.M. Total Nitrogen In: Black, C.A. et al. Ed. Methods of Soil Analysis, Parte 2, Chemical and Microbial Properties, **American Society of Agronomy**, 1144-1178, 1965.

BULEN, W. A.; BURNS, R. C.; LeCOMTE, J. R. The nitrogenase system from *Azotobacter* : two enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependente H₂ evolution and ATP hidrolysis. **Proceedings of the National Aacdemy of Sciences of the United States of America**, 56: 979-986, 1966.

BURRIS, R.H. **The acetylene reduction technique. In: STEWART, D.P. Nitrogen fixation by free-living microorganisms**, Cambridge: Cambridge University Press, 1975. p.249-258 (International Biological Program, 6).

CASTOLDI, R.; CHARLO,CH. C. O.; VARGAS, P. F.; BRAZ, L. T.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MENDONÇA, J. L. Influência do espaçamento entre plantas em características agrônômicas de dois genótipos de soja-hortaliça de ciclo tardio em Jaboticabal-SP. **Científica**, 37: 61-66, 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_06_09_10_01_boletim_portugu es_dezembro_2014.pdf

DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 127: 285-294, 1966.

DÖBEREINER, J.; FRANCO, A. A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 5: 55-161, 1970.

DREVON, J. J., KALIA, V. C., HECKMANN, M. O. & SALSAC, L. Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of Glycine and Vigna species. **Applied and Environmental Microbiology**, 53: 610-612, 1987.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Tecnologias de produção da soja – Região central do Brasil 2001**. Londrina, Embrapa Soja : Embrapa Cerrado : Embrapa Agropecuária Oeste : ESALQ, 2002. 199p.

EVANS, H. J., HANUS, F. J., HAUGLAND, R. A., CANTRELL, M. A., XU, L. S., RUSSEL, F. J., LAMBERT, G. R. & HARKER, A. R. Hydrogen recycling in nodules affects nitrogen fixation and growth of soybeans. In: SHIBLES, R.ed. **World Soybean Research Conference III Proceedings**, Boulder, Westview Press, 1985. p. 935-942.

EVANS, H. J., HARKER, A.R., PAPEN, H., RUSSELL, S.A., HANUS, F.J. & ZUBER, M. 1987 Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 335-361, 1987.

EVANS, H. J.; EISBRENNER, G.; CANTRELL, M. A.; RUSSELL, S. A.; HANUS, F. J. The present status of hydrogen recycling in legumes. **Israel Journal of Botany, Jerusalem**, v. 31, n. 1, p. 72-88, 1982.

FAGAN, E.B; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P.A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D. ; LIER, Q. J. V.; SANTOS, O. S.; MULLER, L. Fisiologia da fixação biológica de nitrogênio em soja. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.1, p. 89-106. 2007.

FERREIRA, D. F. **Sistema para análise de variância para dados balanceados (SISVAR)**. Versão 4.3. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2003.

FREIRE, J. R. J.; VERNETTI, F. J. A. A. A pesquisa com a soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculante no Brasil. **Pesquisa Agropécuaria Gaúcha**, Porto Alegre, V.5, p. 1-25, 1999.

FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous sobean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 224-229, 1990.

FUJIHARA, S; YAMAMOTO,K; YAMAGUCHI,M. A possible role of allantoin and the influence of nodulation on its production in soybean plants. **Plant and Soil**, v.48, n.1,p.233-242, 1977.

GERAHTY, N.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; JOSHI, P. A. & GRESSHOFF, P. M. Anatomical analysis of nodule development in soybean reveals an additional autoregulatory control point. **Plant Science**, v.85, p.1-7, 1992.

GUIMARÃES, A.P. **Determinação do coeficiente isotópico do ^{15}N relacionado ao processo de fixação biológica de nitrogênio em soja 2005**. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

GUIMARÃES, A.P.; DE MORAIS, R.F.; URQUIAGA S.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R. *Bradyrhizobium* strain and the ^{15}N natural abundance quantification of biological N_2 fixation in soybean. **Scientia Agricola**, v. 65, p.516-524, 2008.

HÖGBERG, P. ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. Tansley review nº 95. **New Phytologist**, v.137, p.179-203, 1997.

HOLSTEN, R. D.; BURNS, R. C.; HARD, R. W. F.; HERBERT, R. R. Establishment of Symbiosis between *Rhizobium* and plant cells in vitro. **Nature**, London, v. 323, p. 173-175, 1971.

HUNGRIA, M. & NEVES, M. C. P. Cultivar and strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, 103: 111-121, 1987.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; BALOTA, E. L.; COLOZZI FILHO, A. **A importância do sistema de semeadura direta na população microbiana do solo**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1997. 9 p. (EMBRAPA-CNPSO. Comunicado Técnico, 56).

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, Z. J.; SIBALDELLI, R. N. "R.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N_2 fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian journal of plant science**, P. 227-239, 2006.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; DÖBEREINER, J. Relative efficiency, ureide transport and harvest index in soybeans inoculated with isogenic Hup mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 7, p. 325-329, 1989.

JACOB NETO, J.; DUQUE, F. F. Análise de componentes morfológicos de produção e fixação biológica do nitrogênio em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., 1981, Londrina. **Anais...** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1982. v. 2. p. 16-21.

JUNK, G.; SVEC, H. J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Oxford, v. 14, p. 234-243, 1958.

KESSEL, C. VAN; HARTLEY, C. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation. **Field Crops Research**, V.65, P.165-181, 2000.

MACEDO, R. A. T. **Influência de fatores de manejo sobre a fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja em áreas experimentais e de produção no Noroeste do Paraná**. 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; CHAMPIGNY, M. L.; AMARGER, N.; MOYSE, A. Nitrogen isotope fractionation associated with nitrate reductase activity and uptake of NO_3^- by pearl millet. **Plant Physiology**, Rockville, v. 69, p. 880-887, 1982.

McCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W.; VOLK, R.J. Transport of nitrogen in xylem of soybean plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p. 720-725. 1979.

MEEKS, J. C.; WOLK, C. P.; SCHILLING, N.; SHAFFER, P. W.; AVISSAR, Y.; CHIEN, W. S. Initial organic products of fixation of (^{13}N) dinitrogen by root nodules of soybean (*Glycine max*). **Plant Physiology**, Rockville, v. 61, p. 980-987, 1978.

MENDES, I. C.; JÚNIOR, F. B. R.; HUNGRIA, M.; SOUZA, D. M. G.; CAMPO, R. J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em latossolos do cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, V. 43, n. 8 p. 10053-1060, 2008.

NELSON, L. M. Hydrogen recycling by *Rhizobium leguminosarum* isolates and growth and nitrogen contents of pea plants (*Pisum sativum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, 45: 856-861, 1983.

NEVES, M. C. P.; DIDONET, A. D.; DUQUE, F. F.; DÖBEREINER, J. *Rizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 36, p. 1179-1192, 1985.

NEVES, M. C. P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 6, n. 3, p. 267-321, 1987.

NISHI, C. Y. M. **Infecção, competitividade e eficiência da FBN em soja inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080**. 1995. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

NISHI, C. Y. M.; HUNGRIA, M. Efeito da reinoculação na soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes SEMIA 566, 587, 5019, 5079 e 5080. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 5, p. 359-368, 1996.

NORRIS D.O.; TMANNETJE L. The symbiotic specialization of *african trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **east afr. agric. For. J.**, 29: 214-235, 1964.

OKITO, A.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Isotopic fractionation during N_2 fixation by four tropical legumes. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.36, p.1179-1190, 2004.

PATE, J.S.; ATKINS, C. A.; WHITE, S.T.; RAINBIRD, R.M.; WOO, K.C. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide producing grain legume. **Plant Physiology**, v.65, p.961-965, 1980.

PAUFERRO, N.; GUIMARÃES, A. P.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J.

R.; BODDEY, R. M.; ¹⁵N natural abundance of biologically fixed N₂ in soybean is controlled more by the *Bradyrhizobium* strain than by the variety of the host plant. **Soil Biology & Biochemistry**, 42 : 1694-1700, 2010.

PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D. F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra: ACIAR, 1989.

PEOPLES, M. B.; TURNER, G. L.; SHAH, Z.; SHAH, S. H.; ASLAM, M.; ALI, S.; MASKEY, S. L.; BHATTARAI, S.; AFANDI, F.; SCHWENKE, G. D.; HERRIDGE, D. F. Evaluation of the ¹⁵N natural abundance technique for measuring N₂ fixation in experimental plots and farmer's fields. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON MANAGING LEGUME NITROGEN FIXATION IN CROPPING SYSTEMS OF ASIA, 1997, Hyderabad, Índia. **Proceedings...** Índia: ICRISAT, 1997. p. 57-75. Editores: O. P. Rupela, C. Johansen, D. F. Herridge.

PERRET, X; STAEHELIN, C. & BROUGHTON W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.180-201, 2000.

RAMOS, M. G.; VILLATORO, M. A. A.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using ¹⁵N-isotope techniques. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 105-115, 2001.

REIS, V. M; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação Biológica de Nitrogênio simbiótica e associativa: Muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S (ed). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 53 – 88.

RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R. C.; VAN BERKUN, P.; TRIPLETT, E. W. Common soybean inoculant strains in Brazil are member of *B. Elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 4371-4371, 1993.

RYLE, G.J. A. et al. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea, and white clover. II. Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.145-153, 1979.

SANTOS, O. S. dos (Coord.). **A cultura da soja-1**: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 299 p. (Coleção do Agricultor. Grãos).

SANTOS, V. A. F.; NEVES, M. C. P.; RUMJANECK, N. G. Differential symbiotic efficiency by shading of soybean nodulated by *B. Japonicum* and *B. Elkanii* strains. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 1015-1018, 1997.

SANTOS, V. A. F.; NEVES, M. C. P.; RUMJANECK, N. G. Efficiency of soybean nodules related to Rhizobia hydrogenase is influenced by light level. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, 8(1):15-21, 1996.

SHEAER G. E.; KOHL D.H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance, **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v,13, p,699-756, 1986.

SILVA, A. F.; ET AL. Efeito da inoculação da soja (Cultivar Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. **Acta Scientiarum**, V. 24, N. 5, P.1327-1333, 2002.

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

UNKOVICH, M J. Isotope discrimination provides new insight into biological nitrogen fixation. **New Phytologist**, v.198, n.3, p.643-646, 2013.

UNKOVICH, M. J.; PATE, J. S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 211-228, 2000.

VALLIS, I. HAYDOCK, K. P., ROSS, P. J., HENZELL, E. F. Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pastures. III. The uptake of small additions of ¹⁵N-labelled fertilizer by *Rhodes grass* and *Townsville Lucerne*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 18, p. 865-877, 1967.

VINCENT, G.M. **Manual of the practical study of root nodule bacteria**. (International Biology Program, 15), Oxford: Blackwell p.163, 1970.

WEISBURG, W.G. ; BARNS, S.M; PELLETIER, D.A. AND LANE, DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, 173: 697–703, 1991.