MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA

Editores:

RICARDO S. ARAUJO
MARIANGELA HUNGRIA

EMBRAPA

Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão - CNPAF
Centro Nacional de Pesquisa de Soja - CNPSo

MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA

Editores: Ricardo S. Araujo
Mariangela Hungria

EMBRAPA-SPI
Brasília, DF
1994

EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 44.

FIGURAS DA CAPA

À esquerda: esporocarpo de *Amanita* sp. (Basidiomycotina).

No centro: soja não-inoculada (frente) e inoculada (fundo), em área de primeiro ano de cultivo nos Cerrados.

À direita: corte de nódulos ativos de soja mostrando cor vermelha devida à leghemoglobina.

Comitê de Publicações

Pedro A. Arraes Pereira (CNPAF/Presidente)
Carlos Caio Machado (CNPSo/Presidente)

Editoração e Programação Visual

Danilo Estevão (CNPSo/Desenhos)
Hélvio B. Zemuner (CNPSo/Fotografias)
Lauro Pereira da Mota (CNPAF/Fotografias)
Lígia M. de O. Chueire (CNPSo/Revisão)
Reinaldo Paulino da Silva (CNPAF/Desenhos)
Sebastião Pereira de Araújo (CNPAF/Desenhos)
Sinábio de Sena Ferreira (CNPAF/Digitação)

Normatização Bibliográfica

Ademir Benedito A. de Lima (CNPSo/Coordenação)
Ana Lúcia D. de Faria (CNPAF/Catalogação na fonte)

Tiragem: 1000 exemplares.

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Microrganismos de importância agrícola / editores Ricardo S. Araújo, Mariangela Hungria ; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão : Centro Nacional de Pesquisa de Soja. — Brasília : EMBRAPA-SPI, 1994.
236p. — (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 44)

ISSN 0101-9716

Conteúdo: Introdução / Ricardo S. Araújo, Mariangela Hungria — Fixação biológica do nitrogênio em soja / Mariangela Hungria... [et al.] — Fixação biológica do nitrogênio em feijão / Ricardo S. Araújo — Fixação biológica do nitrogênio em espécies arbóreas / Fatima M.S. Moreira — Micorrizas arbusculares / José Oswaldo Siqueira — A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres / David A. Wardle, Mariangela Hungria — Biodegradação de xenobiontes : potencialidades e limites / Tomaz Langenbach.

1. Microbiologia. 2. Solo — Microrganismo. I. Araújo, Ricardo S. II. Hungria, Mariangela. III. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (Goiânia, GO). IV. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). V. Série.

CDD 631.46

© EMBRAPA 1994

APRESENTAÇÃO

Apesar do grande avanço científico na área de microbiologia do solo, poucos desses conhecimentos têm sido aplicados na tomada de decisões em relação às práticas agronômicas que visam o aumento da produtividade das culturas. Entretanto, a atividade biológica oriunda da grande massa de seres microscópicos que habitam o solo participa de vários eventos que o transformam em um ambiente propício ao crescimento das plantas.

Este livro traz os conhecimentos mais recentes sobre a atividade dos microrganismos do solo de importância agrícola. Os resultados nele apresentados e discutidos são frutos de muitos anos de pesquisa por dedicados cientistas e representam o estado-da-arte dos conhecimentos na área, qualificando este livro como bibliografia complementar de suma importância para estudantes de Agronomia, Biologia e Ciências afins. Sua publicação representa um esforço da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) no sentido de divulgar o trabalho de seus especialistas e difundir tecnologias desenvolvidas para melhorar a agricultura brasileira.

Homero Aidar
Chefe do CNPAF

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 7
Ricardo S. Araujo & Mariangela Hungria

2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM SOJA 9
Mariangela Hungria, Milton A. T. Vargas, Allert R. Suhet & José Roberto R. Peres

3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM FEIJÃO 91
Ricardo S. Araujo

4. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM ESPÉCIES ARBÓREAS 121
Fátima M. S. Moreira

5. MICORRIZAS ARBUSCULARES 151
José Oswaldo Siqueira

6. A BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO E SUA IMPORTÂNCIA NOS ECOSSISTEMAS TERRESTRES 195
David A. Wardle & Mariangela Hungria

7. BIODEGRADAÇÃO DE XENOBIONTES: POTENCIALIDADES E LIMITES 217
Tomaz Langenbach

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Ricardo S. Araujo[1]
Mariangela Hungria[2]

A fração biológica é um dos principais componentes do solo. Essa fração é composta por comunidades de pequenos animais (mesofauna) e microrganismos (microfauna e microflora). Muitas das propriedades dos solos são decorrentes da atividade biológica, sendo comum dizer-se que um solo sem atividade biológica é um solo sem vida. As relações e interações entre as diferentes comunidades de organismos do solo contribuem para a manutenção da vida do solo, e para diversos outros processos que, por sua vez, estão intimamente ligados à cadeia trófica.

Os componentes mais numerosos da fração biológica do solo são, sem dúvida, os microrganismos, representados por integrantes da microfauna (protozoários) e da microflora (fungos, bactérias, algas e vírus). Esses organismos participam ativamente da decomposição de resíduos orgânicos, dos ciclos de reciclagem do nitrogênio, do fósforo e do enxofre e da decomposição de poluentes. Muitos desses componentes, portanto, desempenham um papel vital na construção do solo como suporte físico para as culturas agrícolas.

A pesquisa nas últimas décadas rendeu muitos resultados que contribuíram para um melhor conhecimento das propriedades dos organismos do solo e aproveitamento dos processos biológicos que influenciam na produtividade agrícola. Como exemplos, temos os conhecimentos adquiridos sobre a capacidade de certos microrganismos de modificar ou destruir poluentes e defensivos agrícolas, a habilidade da microflora de produzir substâncias tóxicas às culturas agrícolas e aos animais, a utilização da inoculação de leguminosas em larga escala, a micorrização de mudas de café e árvores frutíferas para o transplante, a utilização de associações entre plantas e microrganismos do solo na recuperação de áreas degradadas pela mineração, remoção da cobertura vegetal e construção civil.

O advento das técnicas de biologia molecular permitiu o emprego de rigorosas análises genéticas nos estudos da composição e das propriedades das comunidades de microrganismos do solo. Com isso, foi possível, por exemplo, estudarem-se aspectos muito íntimos da relação entre as leguminosas e seus simbiontes fixadores de nitrogênio, da interação entre patógenos do solo e seus hospedeiros e até da manipulação genética de microrganismos para que atuem de acordo com o interesse do homem, quer seja como simbiontes de plantas, agentes de controle biológico de pragas e doenças, ou como condicionadores dos solos para o cultivo agrícola.

Este livro relata os avanços obtidos com a pesquisa sobre microrganismos do solo de importância agrícola. Ele está dividido em capítulos, de acordo com os assuntos abordados, contemplando aspectos relevantes da microbiologia dos solos agrícolas. Apesar de não ser uma revisão exaustiva sobre cada assunto, são apresentados os conhecimentos mais relevantes e recentes em cada área, e discutidas suas implicações para a produtividade agrícola e para a manutenção da vida do solo.

[1] Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF), Caixa Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.
[2] Pesquisadora, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

Agradece-se a colaboração de cada um dos autores, partilhando informações e, sobretudo, se prontificando a ajudar a editar estas informações tão valiosas. Para finalizar, segue uma pequena estória para reflexão. Um dia, um professor disse a um de seus alunos, nascido e criado em uma fazenda, que enchesse alguns vasos com terra para que pudesse plantar um experimento. O aluno, então, respondeu que aquilo não era terra, mas sim solo. O professor respondeu dizendo que tudo depende do referencial: aquilo que cai de nossos sapatos no chão limpo das cozinhas de nossas mães é terra, enquanto que o suporte para as plantas é, realmente, solo.

Terra ou solo, o importante é que se lembre que ali vivem imensas comunidades de seres vivos que sofrem os mais diversos impactos em decorrência da atividade humana. Somente através de um manejo de solo que considere a vida presente será possível alcançar a tão almejada sustentabilidade da agricultura. Os capítulos são exemplos claros da importância dos microrganismos do solo para esse fim.

CAPÍTULO 2

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM SOJA

Mariangela Hungria[1]
Milton A. T. Vargas[2]
Allert R. Suhet[3]
José Roberto R. Peres[3]

2.1. Introdução

A soja é uma cultura que apresenta grande demanda pelo nitrogênio (N) devido, particularmente, ao teor protéico elevado em seus grãos, de cerca de 40%. Mas justamente pelo seu teor protéico elevado, essa é uma cultura de grande importância econômica e o Brasil é o segundo maior produtor de soja, sendo responsável por 16,9 % da produção mundial (FAO, 1993).

As principais fontes fornecedoras do N necessário ao crescimento das plantas são: 1- nitrogênio do solo, proveniente da decomposição da matéria orgânica e das rochas; 2- nitrogênio fornecido por fertilizantes; e 3- nitrogênio fornecido pelo processo da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N_2). Existe, também, uma pequena contribuição pela reação das descargas elétricas com o N_2, resultando em nitrato, que é adicionado ao solo e representa cerca de 4% das entradas positivas no balanço de N na Terra. O fornecimento, utilização e perdas do N formam um ciclo complexo, denominado "ciclo do N". Para maiores detalhes, diversas revisões, particularmente da década de 70, quando houve um grande impulso nos estudos de fixação biológica do N_2, abordam esse assunto (Delwiche, 1970; Burns & Hardy, 1975; Brill, 1979; Postgate & Hill, 1979).

Os teores de N nos solos do Brasil, de um modo geral, não são elevados e geralmente se situam na faixa de 0,05% a 0,30 %. Com a intensificação da agricultura, as exigências nutricionais de N, bem como a sua remoção, são ampliadas; conseqüentemente, se o N do solo retirado pelas plantas não for reposto, o teor desse nutriente decrescerá rapidamente.

A síntese química de fertilizantes nitrogenados iniciou na primeira década deste século, quando Fritz Haber e Carl Bosch descobriram o processo que transforma o N_2 atmosférico em amônia. As necessidades para essa síntese química são: 1- hidrogênio (derivado de gás de petróleo); 2- catalisador contendo ferro; 3- altas temperaturas (300°C a 600°C); e 4- altas pressões (200 atm a 800 atm). Conseqüentemente, existe um custo elevado para a síntese de fertilizantes, resultante principalmente da necessidade de gastos com fontes de petróleo, que também não são renováveis. Calcula-se que, para a síntese de uma tonelada de amônia, sejam necessários seis barris de petróleo. Práticas agrícolas alternativas para diminuir esses custos precisam ser procuradas, principalmente para o Brasil, que importa fertilizantes nitrogenados para satisfazer a demanda interna.

O N_2 é abundante na natureza, constituindo quase 80% do gás atmosférico. Mas nenhum animal ou planta é capaz de utilizar o N_2 como uma fonte de proteína, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do N_2, que é uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza.

---

[1] Pesquisadora, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

[2] Pesquisador, Ph.D, EMBRAPA-Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado (CPAC), Caixa Postal 700023, CEP 73301-970, Planaltina, DF.

[3] Pesquisador, M.Sc., EMBRAPA-CPAC.

Bactérias da família *Rhizobiaceae* formam estruturas altamente específicas, os nódulos, onde ocorre a conversão do N_2 atmosférico a amônia, que é então incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização por algumas plantas da família *Leguminosae*, como a soja. Essas bactérias conseguem quebrar a tripla ligação pela ação de um complexo enzimático, denominado dinitrogenase e o processo é denominado de fixação biológica do N_2.

Para que o N proveniente da fixação biológica possa suprir todas as necessidades da planta, porém, o processo precisa ser eficiente, o que resulta, principalmente, da escolha adequada dos parceiros simbióticos, ou seja, estirpes de bactérias mais eficientes e competitivas e genótipos de plantas que respondam ao microssimbionte. Embora exista controvérsia, conforme será discutido ainda neste capítulo, os gastos energéticos relacionados à fixação biológica do N_2 parecem ser mais elevados do que os gastos para a assimilação do N dos fertilizantes, além do gasto inicial com a formação e manutenção dos nódulos. Por isso, caso essa simbiose não seja eficiente, a associação pode se tornar parasítica.

A fixação biológica do N_2 é um passo crucial no ciclo do N. Em áreas não perturbadas, com vegetação clímax, esse processo biológico não é limitante. Também em áreas áridas, frias ou fracamente ensolaradas, a água, temperatura ou luz limitam a produtividade biológica. Mas, em áreas perturbadas e ainda férteis, a introdução do N através da fixação biológica, geralmente, limita a produtividade. Esses locais incluem as áreas agrícolas, áreas onde as florestas clímax foram perturbadas e replantadas e aquelas perturbadas por desastres naturais, como o fogo (Postgate & Hill, 1979).

No caso da soja, muitos estudos foram conduzidos no Brasil desde a introdução dessa cultura, tornando a simbiose muito eficiente e resultando em uma grande economia para o país, pela não utilização de fertilizantes nitrogenados. Para alcançar produtividades de 2500 $kg.ha^{-1}$, a soja absorve cerca de 200 kg de $N.ha^{-1}$, dos quais 67% a 75% são alocados para as sementes. Devido à baixa eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados, normalmente inferior a 50%, pois há perdas por lixiviação, nitrificação e desnitrificação, seriam necessários 300 a 400 kg de $N.ha^{-1}$ para se obter essa produtividade, portanto um custo certamente proibitivo para os agricultores. Utilizando dados do setor de economia do Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), da EMBRAPA, com uma estimativa de área colhida de 11.350.000 ha, na safra de 1993/94, uma produtividade média de 2156 $kg.ha^{-1}$ e considerando que a recomendação atual para essa cultura é de utilização de inoculação sem a suplementação de qualquer fonte de fertilizante nitrogenado, calcula-se que o país economize, hoje, cerca de 1 bilhão de dólares, por safra, pela inoculação da soja (**Tabela 2.1**). Além disso, as vantagens ecológicas da fixação de N_2 incluem a economia de petróleo e gás natural, que são fontes energéticas não renováveis, e a menor poluição dos rios e lagos, causada pela lixiviação dos fertilizantes. As principais vantagens e desvantagens da utilização de fertilizantes nitrogenados e do processo de fixação biológica do N_2 estão listadas na **Tabela 2.2**.

Finalmente, não poderia deixar de ser mencionada a importância da cultura da soja no que se refere ao valor protéico para a população, particularmente nos países com carências nutricionais, como o Brasil. Um hectare de soja produzindo 2156 kg de grãos com um teor protéico de 40% tem-se um acúmulo de 862 kg de proteína. Considerando que o consumo diário de proteínas recomendado pela FAO é de 53 $g.pessoa^{-1}$, constata-se que a proteína produzida seria capaz de suprir as necessidades protéicas de um adulto por 16.264 dias e que a produção nacional pode fornecer, para cada um dos 150 milhões de brasileiros, 179 g de $proteína.dia^{-1}$.

Tabela 2.1. Comparação econômica entre a fixação biológica do N_2 em soja e a adubação mineral.

Forma de Fornecimento do N	Custo (U$)		Economia pelo processo de fixação biológica do N_2 (U$)	
	por ha	no país* (10^6)	por ha	no país (10^6)
Inoculante (2 doses.ha^{-1})	1	11	-	-
Uréia (290 kg.ha^{-1}) **	60	681	59	670
Uréia (435 kg.ha^{-1})	90	1.021	89	1.010

* Considerando a área colhida de 11.350.000 ha na safra de 1993/94.

** Considerando uma produtividade média de 2156 kg.ha^{+} (safra 1993/94), com teor médio de N dos grãos de 6,0 %; correspondendo, então, à exportação de 129 kg de N.ha^{+}. A adubação com 290 kg de uréia.ha^{+} (45% de N) seria capaz de repor essa exportação se a eficiência de utilização do fertilizante fosse de 100% mas, como a eficiência de utilização normalmente encontrada é de 50%, seriam necessários 435 kg.ha^{+}.

2.2. Taxonomia da Planta Hospedeira

A planta hospedeira destacada neste capítulo está classificada da seguinte maneira:

Subreino: *Cormobionta*
Divisão: *Spermatophyta*
Subdivisão: *Angiospermae*
Classe: *Dicotiledoneae*
Subclasse: *Archichlamydae*
Ordem: *Rosales*
Subordem: *Leguminosinae*
Família: *Leguminosae*
Subfamília: *Papilionaceae*, *Fabaceae*
Tribo: *Phaseoleae*
Subtribo: *Phaseolinae* (*Glyciniae*)
Gênero: *Glycine* L.
Subgênero: *Glycine* subg. Soja (Moench)
Espécie: *Glycine max* (L.) Merrill

Vários autores têm classificado a soja na família *Fabaceae*. Isso resultou de uma proposta feita por Delorit & Gunn (1986) para subdividir a família *Leguminosae*, criando a família *Fabaceae*, na qual a soja ficaria incluída. Existe ainda muita controvérsia taxonômica e, de um modo geral, ainda prevalece a classificação na família *Leguminosae*.

Tabela 2.2. Principais vantagens e desvantagens da utilização de fertilizantes nitrogenados e do processo de fixação biológica do N_2.

Vantagens	Desvantagens
FERTILIZANTES	
1- disponibilidade imediata para as plantas 2- geralmente o custo energético para a sua absorção pelas plantas é inferior ao custo do N obtido pelo processo biológico	1- gasto energético elevado para a sua síntese 2- gasto com tecnologia e mão-de-obra envolvidas na produção 3- gasto com transporte até o campo 4- raramente mais do que 1/3 do fertilizante nitrogenado aplicado é aproveitado pelas plantas, sendo perdido por desnitrificação, nitrificação e lixiviação 5- poluição de lagos e rios
FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N_2	
1- menor custo para o agricultor 2- diminuição dos problemas ambientais 3- manutenção da fertilidade do solo	1- plantas dependentes da fixação do N_2 podem crescer mais lentamente, pois fotossintatos são desviados para o metabolismo dos nódulos 2- estirpes de bactérias diferem em sua efetividade. Trabalhos científicos devem ser feitos continuamente para assegurar o uso de bactérias que permitam a maximização da produtividade das plantas. 3- genótipos de plantas diferem no potencial de resposta à inoculação. O melhoramento deve incluir sempre a avaliação da capacidade fixadora de N_2 com as estirpes recomendadas comercialmente.

A soja utilizada agronomicamente já foi denominada como *Glycine soja* e *Soja max*, mas desde 1948 é conhecida botanicamente por *Glycine max* (L.) Merrill. O tipo selvagem de soja, considerado o parental da soja cultivada hoje, já foi denominado de *G. ussuriensis* Regel and Maack., mas a designação como *G. soja* Sieb and Zucc. é aceita desde 1970 (Verdcourt, 1970). O local de origem de *G. soja* inclui o Vale do Rio Yangtze, as províncias do norte e nordeste da China, áreas adjacentes da Federação Russa, Coréia e Japão. Informações botânicas sobre a soja foram recentemente compiladas por Gazzoni (1994), e devem ser procuradas para maiores detalhes.

2.3. Taxonomia do Microssimbionte

2.3.1. Estirpes de crescimento lento

Espécies: *Bradyrhizobum japonicum* (Buchanan 1980) Jordan, 1982

Bradyrhizobium elkanii (Jordan 1982) Kuykendall et al., 1992

Há descrições do gênero *Rhizobium* por Kirchner, em 1886, e Frank, em 1889. Em 1932, as bactérias responsáveis pela nodulação da soja foram classificadas como *Rhizobium japonicum* (Fred et al., 1932), num critério baseado, principalmente, nos grupos de inoculação cruzada entre o microssimbionte e a planta hospedeira. Outras características fisiológicas, bioquímicas e genéticas, além da inoculação cruzada e do crescimento lento com produção de álcali *in vitro* passaram a ser consideradas nas décadas subseqüentes e permitiram a divisão de *Rhizobium* em dois grupos, de crescimento rápido e lento. Entretanto, as bactérias que nodulam a soja continuaram a ser classificadas como *R. japonicum* (Jordan & Allen, 1974) sendo confirmado por Buchanan, em 1980. É interessante observar, porém, que a divisão de rizóbio em duas classes, de acordo com a taxa de crescimento, já havia sido sugerida por Löhnis & Hansen (1921).

A partir de 1982, as bactérias da espécie *Rhizobium japonicum* foram reclassificadas em um novo gênero, *Bradyrhizobium*, dentro do qual está a espécie *Bradyrhizobium japonicum* , que inclui as principais estirpes que nodulam a soja (Jordan, 1982, 1984). O nome *Bradyrhizobium* é alusivo às taxas de crescimento dessa bactéria, pois "bradus" vem do grego, significando lento e *Rhizobium* é o nome genérico da bactéria.

Na década de 80, vários trabalhos começaram a demonstrar que existe grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum*, possibilitando a divisão em dois grupos com características diferentes, conforme será visto adiante com maiores detalhes. Esses estudos levaram Kuykendall et al. (1992) a sugerirem a subdivisão de *Bradyrhizobium* em duas espécies: *B. japonicum*, com as estirpes do grupo I, e *B. elkanii*, com as estirpes do grupo II.

Apesar das grandes diferenças que separam os dois grupos, essa nomenclatura ainda não é aceita por todos. A nova nomenclatura foi validada no International Journal of Systematic Bacteriology (Anônimo, 1993), mas não ganha suporte em algumas análises genéticas, como a comparação de seqüências 16S rRNA (Young et al., 1991; Young, 1992), e não foi recomendada no último relato do subcomitê de *Rhizobium* (Young et al., 1993). As estirpes-padrão estão listadas na **Tabela 2.3**.

O manual de taxonomia de Bergey (Jordan, 1984) classifica a espécie *Bradyrhizobum japonicum* no reino *Procaryotae* e família *Rhizobiaceae*. Os três gêneros dessa família, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (este último descrito por Dreyfus et al., 1988), foram agrupados devido à sua habilidade em fixar N_2, pois na verdade são muito distintos entre si, estando mais próximos de outros gêneros não-fixadores de N_2. *Bradyrhizobium japonicum*, por exemplo, apresenta semelhanças genéticas com *Rhodopseudomonas palustris*, bactéria fototrófica púrpura não -sulfurosa. Com base nos estudos empregando técnicas moleculares, tem-se utilizado cada vez mais a classificação filogenética, na qual *B. japonicum* fica posicionada como *Proteobacteria* na subdivisão alpha (Young, 1992; Young et al., 1993), conforme **Figura 2.1**.

Tabela 2.3. Lista das estirpes de crescimento lento (*Bradyrhizobium*) e rápido (*Rhizobium* ou *Sinorhizobium*) que nodulam a soja segundo nomenclatura utilizada por Jordan (1982), Scholla & Elkan (1984), Chen et al. (1988) e Kuykendall et al. (1992).

Estirpe	**Outras**	**Espécie** (Jordan, 1982)	**Espécie** (Kuykendall et al., 1992)	**Chemovar** (Scholla & Elkan,1984)	**Espécie** (Chen et al., 1988)
ATCC 10324	USDA 6	*B. japonicum**			
ATCC 49852	USDA 76		*B. elkanii* *		
ATCC 35423	USDA 205			*R. fredii* chemovar *fredii**	*S. fredii**
USDA 201				*R. fredii* chemovar *siensis**	*S. fredii*
CCBAU 110	RX 42				*S. xinjiangensis**

* Estirpe padrão da espécie ou chemovar.

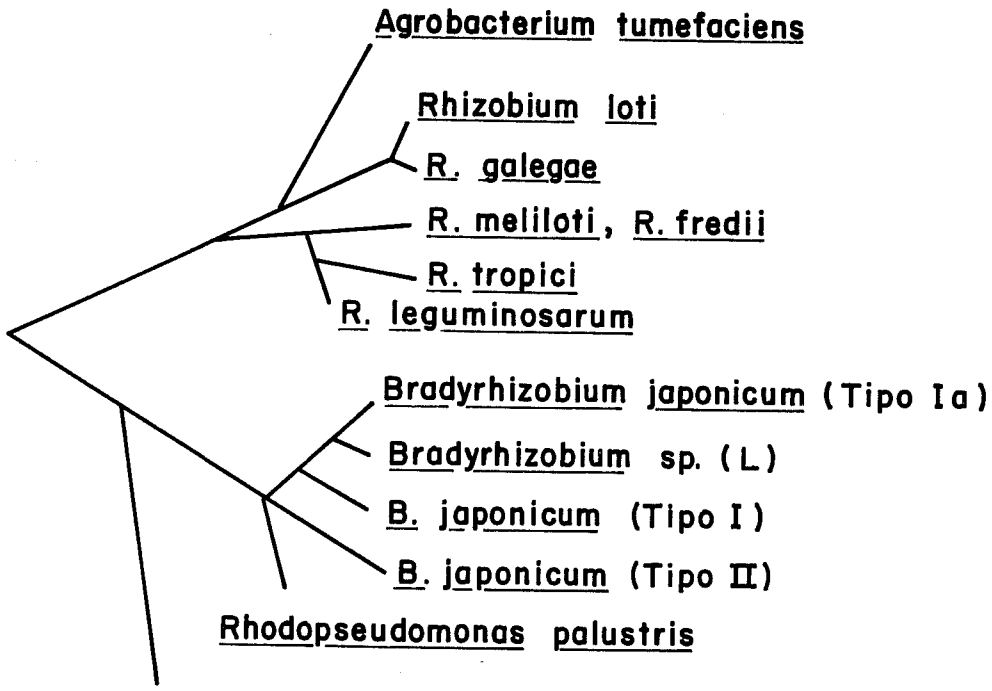


Figura 2.1. Árvore taxonômica mostrando as relações prováveis entre as espécies de rizóbio. Segundo Young et al. (1991, 1993) e Young (1992).

2.3.2. Estirpes de crescimento rápido

Espécie: *Rhizobium fredii* (Buchanan 1980) Scholla & Elkan, 1984

Em 1982 foram isoladas algumas estirpes de crescimento rápido de solos e nódulos de soja coletados na China (Keyser et al., 1982). Essas estirpes foram classificadas como *Rhizobium fredii* (Scholla & Elkan, 1984) e, posteriormente, foi proposto um novo gênero para as mesmas, *Sinorhizobium* gen. nov., com duas espécies, *S. fredii* e S. *xinjiangensis* (Chen et al., 1988). Através de estudos de seqüenciamento por PCR (polymerase chain reaction) de um segmento de 260 pares de bases, correspondente às posições 44 a 337 da seqüência 16S rRNA de *Escherichia coli* Jarvis et al. (1992) concluíram, porém, que as estirpes de crescimento rápido deveriam continuar a ser classificadas como *R. fredii*. Na **Figura 2.1** pode-se observar um fenograma simplificado das estirpes que nodulam a soja e na **Tabela 2.3** estão listadas as estirpes-padrão.

Aqui, convém definir alguns termos, muito usados neste capítulo e no capítulo seguinte: infectiva, efetiva e eficiente. Bactérias infectivas (infective) são aquelas capazes de infectar as raízes e formar nódulos; o termo efetiva, eficaz (effective) foi proposto para avaliar a simbiose como um todo, enquanto que eficiente (efficient) seria utilizado para indicar a quantidade de N_2 fixado por unidade de tecido nodular (Döbereiner et al., 1970). Os primeiros relatos indicavam que as estirpes de crescimento rápido só conseguiam nodular *Glycine soja* e *Glycine max* cultivar Peking, cultivares primitivas de soja, sendo ineficazes em linhagens comerciais (Keyser et al., 1982). Mas, desde o isolamento dessas bactérias, alguns estudos vêm sendo conduzidos procurando estudar a compatibi-

lidade com os genótipos de soja norte-americanos (Devine, 1984, 1985a, 1991; Balatti & Pueppke, 1992) e brasileiros (Chueire & Hungria, 1994), tendo-se comprovado que diversas cultivares comerciais de soja são capazes de nodular com *R. fredii*, conforme será discutido adiante.

Do mesmo modo que para as estirpes de crescimento lento, Jordan (1984) classifica essa espécie no reino *Procaryotae* e na família *Rhizobiaceae*. Nos estudos de evolução molecular, porém, *R. fredii* também é classificado como *Proteobacteria* na subdivisão alpha (Young, 1992).

2.4. O Processo da Nodulação

2.4.1. Histórico

Curiosamente, Antoine Laurent Lavoisier denominou o elemento N como "azoto", que significa "sem vida". O químico, nessa época, pensava que o N não participava do metabolismo dos organismos vivos, como ocorria com o oxigênio (O_2). O nome se tornou irônico, pois o N é componente essencial para os ácidos nucléicos e proteínas, sendo necessário para todas as formas de vida (Brill, 1979).

Existem relatos sobre o uso de leguminosas desde a idade do bronze, de recomendação de rotação de culturas por gregos e romanos, além de relatos de recomendação de leguminosas em pastagens, na Inglaterra, já em 1613. A elucidação do processo de fixação biológica do N_2, porém, teve impulso com os estudos de Jean-Baptiste Boussingault, em 1837, com trevo e ervilha e com aveia e trigo, que observou que as leguminosas, de alguma forma, conseguiam obter o N necessário para o seu metabolismo do ar. O botânico russo Woronin descobriu que os nódulos de leguminosas continham bactérias e os alemães Hellriegel e Wilfarth constataram que a fixação biológica do N_2 dependia de "fermentos no solo", responsáveis pela formação dos nódulos nas raízes. Finalmente, Beijerinck isolou as bactérias dos nódulos de ervilha (Wilson, 1940; Burris, 1974; Evans & Burris, 1992). Desde então, o processo de nodulação e fixação do N_2 tem sido estudado com afinco, mas muitos passos ainda esperam por elucidação.

2.4.2. Etapas do processo

A formação dos nódulos é um processo complexo, que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas tanto na célula hospedeira como na bactéria. As mudanças na bactéria visam, principalmente, o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e o poder redutor necessários para o processo de fixação biológica. As mudanças na planta hospedeira visam, principalmente, assimilar a amônia produzida pelas bactérias.

Existem diversos genes envolvidos no processo de nodulação, que estão localizados em plasmídeos e nos cromossomos, nas estirpes de crescimento rápido, como *Rhizobium fredii* e no DNA cromossomal, no caso de estirpes de crescimento lento, como *Bradyrhizobium japonicum*. Os genes rizobianos essenciais à infecção e formação do nódulo podem ser divididos em duas classes. A primeira inclui os genes que, quando mutados, resultam em alterações no processo de infecção; nessa categoria estão os genes da nodulação, *nod* (nodulation) e os genes *nol* (após a utilização de todas as letras do alfabeto para os genes *nod*, os demais genes estão sendo designados por *nol*). A segunda classe

inclui diversos outros genes que estão envolvidos com a caracterização da superfície das bactérias e alteração da nodulação, tais como os genes *exo* (exopolysaccharides), *lps* (lipopolysaccharides) e *ndv* (1,2-ß-glucans, nodule development).

Diversos eventos pré-infecção precedem a formação do nódulo. Podem ser incluídos aí, o estímulo ao rizóbio, ativação dos genes da nodulação, adesão da bactéria a determinados sítios na superfície das raízes e troca de sinais moleculares entre o hospedeiro e o microssimbionte, levando a alterações fenotípicas nas raízes.

Inicialmente, diversos compostos são exsudados pela planta hospedeira, como aminoácidos, açúcares, ácidos carboxílicos, homoserina e flavonóides, que agem como substâncias quimiotáticas, atraindo o rizóbio (Gaworzewska & Carlile, 1982; Aguilar et al., 1988; Kape et al., 1991; Dharmatilake & Bauer, 1992). A quimiotaxia pode auxiliar o processo da nodulação, embora não pareça ser um passo essencial, uma vez que mutantes imóveis de *R. meliloti* ainda foram capazes de formar nódulos (Ames & Bergman, 1981; Mellor & Glenn, 1987).

Outras substâncias, exsudadas, principalmente pelas raízes laterais, estimulam a multiplicação das bactérias na rizosfera. Um exemplo de estímulo específico é o da homoserina produzida por ervilha, que estimula *R. leguminosarum* bv. *viceae* (van Egeraat, 1975 a,b; Kijne, 1992). Como resultado desse estímulo, tem-se que, na rizosfera, normalmente ocorre um aumento na população de rizóbio da ordem de cem vezes (Dowling & Broughton, 1986). Mas o rizóbio também precisa competir pelos exsudatos das raízes com outros microrganismos do solo, incluindo estirpes ineficientes mas adaptadas, outras bactérias, fungos, actinomicetos e protozoários, que também podem apresentar ação antagônica pela produção de substâncias antibióticas (Holland, 1970). Essa competição pode prejudicar a colonização das raízes e a nodulação.

Se a quimiotaxia e o estabelecimento do rizóbio forem bem sucedidos, as bactérias então aderem à superfície dos pêlos radiculares. Considera-se que a adesão do rizóbio ocorre em dois passos: primeiro, células isoladas aderem à superfície radicular, normalmente a sítios específicos (Bhuvaneswari et al., 1980; Gulash et al., 1984) e, posteriormente, outras células aderem às bactérias que já estão presas aos pêlos radiculares (Smit et al., 1989). Há indicações de que algumas moléculas parecem estar envolvidas no processo de adesão e, recentemente, foi relatado que uma proteína da superfície da bactéria, a ricadesina, comum às diversas espécies de rizóbio, estaria envolvida com a ligação aos pêlos radiculares (Smit et al., 1989). Fibrilas de celulose, de origem bacteriana, também participam do processo de adesão do rizóbio aos pêlos radiculares (Smit et al., 1986, 1987), embora não sejam essenciais à nodulação. Nesse processo de adesão, que envolve também alguma especificidade, há algumas evidências de que o reconhecimento do rizóbio envolve lecitinas da planta hospedeira e a hipótese é de que elas interagem com os radicais de açúcar dos polissacarídeos da superfície celular do rizóbio (Bohlool & Schmidt, 1974; Dazzo & Gardiol, 1984; Halverson & Stacey, 1985; Kijne et al., 1988). Existem relatos, também, de que outros fatores, como a idade da cultura, pré-tratamento das células e composição do meio afetam a adesão das bactérias (Smit et al., 1986; Smith & Wollum II, 1991). Há indicações, ainda, de que interações físico-químicas entre as superfícies do pêlo radicular e do rizóbio também podem intermediar o processo de adesão (Morris et al., 1989). Proporcionalmente, porém, poucas bactérias aderem aos pêlos radiculares da leguminosa hospedeira, variando de 0,4% a 15% da população bacteriana total (Pueppke, 1984; Vesper & Bauer, 1985).

Provavelmente, em um processo simultâneo com a adesão das bactérias, tem início uma troca de sinais moleculares entre o microssimbionte e a planta hospedeira, ativando genes dos dois parceiros. Em uma primeira etapa, a planta hospedeira libera sinais que são responsáveis pela indução da transcrição de genes do rizóbio essenciais à nodulação, *nod* e *nol*. O primeiro indutor de plantas estudado foi isolado de extratos de sementes de alfafa e identificado como a flavona luteolina (5,7,3',4'-tetra-hidroxi-flavona) (Peters et al., 1986). Após a identificação da luteolina, os fatores de ativação presentes nas sementes e raízes de diversas outras leguminosas hospedeiras começaram a ser investigados e foram também identificados como flavonóides. A **Figura 2.2** mostra que, no caso da soja, os principais indutores dos genes *nod* de *B. japonicum* e *R. fredii*, presentes em extratos de sementes e de plântulas, foram inicialmente identificados como os isoflavonóides daidzeína (7,4'-di-hidroxi-isoflavona) e genisteína (4,5,7-tri-hidroxi-isoflavona) (Kosslak et al., 1987). Posteriormente, foi relatado que a isoliquiritigeninina (4,2',4'-tri-hidroxi-chalcona) também é um indutor presente em exsudatos de raízes de soja (Kape et al., 1992) e que os isoflavonóides liberados pela soja são liberados na forma glicosilada (Barbour et al., 1992). Os isoflavonóides, até então, eram conhecidos apenas por seu papel como fitoalexinas, ou seja, substâncias utilizadas pelas plantas na defesa contra patógenos e, geralmente, sintetizadas em resposta à infecção (Dixon et al., 1983; Lawton & Lamb, 1987; Dixon & Lamb, 1990). O papel desses isoflavonóides como indutores dos genes *nod* de *B. japonicum* reforça a hipótese de Vance (1983), de que o processo de infecção das leguminosas por rizóbio apresenta muitas semelhanças com a infecção por microrganismos patogênicos.

Na segunda etapa de troca de sinais moleculares, as bactérias, através dos genes da nodulação, produzem sinais específicos para o hospedeiro, induzindo as modificações radiculares que ocorrem no estádio de pré-infecção, como: a deformação dos pêlos radiculares (Had, hair deformation); o encurvamento dos pêlos (Hac, hair curling), podendo ser um encurvamento moderado, de 90° a 360°, ou acentuado, com 360° ou mais); a formação de raízes curtas e grossas (Tsr, thick and short root); e o aumento no número de pêlos radiculares (Hai, hair increase) (Canter Cremers et al., 1986; van Brussel et al., 1986; Zaat et al., 1987a,b; Faucher et al., 1988). Alguns desses fenótipos, em raízes de soja, podem ser vistos na **Figura 2.3**. Esses sinais moleculares também são capazes de induzir à divisão das células no córtex das raízes (Coi, cortical cell division induction), indução do meristema do nódulo (Noi, nodule induction), formando nódulos contendo meristemas apicais, feixes vasculares periféricos e endoderme, mesmo na ausência do rizóbio (Truchet et al., 1991). O primeiro sinal estudado foi o produzido por *R. meliloti* e identificado como um lipo-oligossacarídeo sulfatado, com a estrutura de um ß-1,4-tetra-sacarídeo de D-glucosamina, contendo três grupos amino acetilados e um acilado com um ácido graxo bis-não-saturado (Lerouge et al., 1990). Posteriormente, vários sinais, produzidos por outras espécies de rizóbio, foram identificados e, no caso de *B. japonicum*, algumas estruturas produzidas por três estirpes estão representadas na **Figura 2.2**. Na soja, já foi relatado que esses fatores Nod são capazes de induzir à divisão celular do córtex (Sanjuan et al., 1993) e à produção de novos flavonóides (Ini, increased *nod*-inducing activity) (Cho & Harper, 1991). Mais detalhes sobre essa sinalização molecular podem ser obtidos em uma revisão recente realizada por Hungria (1994).

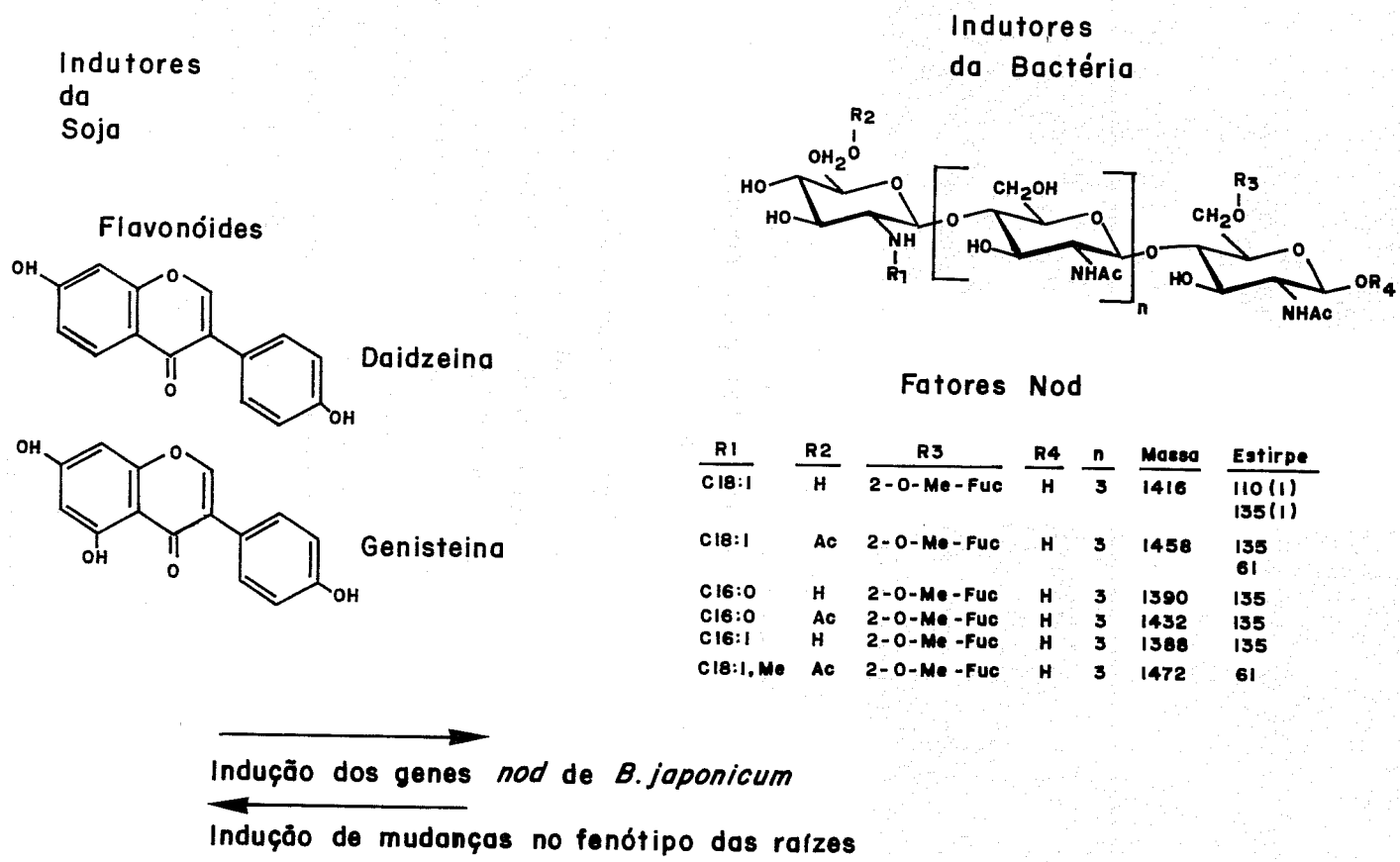


Figura 2.2. Sinalização molecular que ocorre entre a soja e *Bradyrhizobium japonicum*. Os metabólitos foram sintetizados pelas estirpes USDA 110, USDA 135 e USDA 61. Segundo Barbour et al. (1992) e SanJuan et al. (1993).

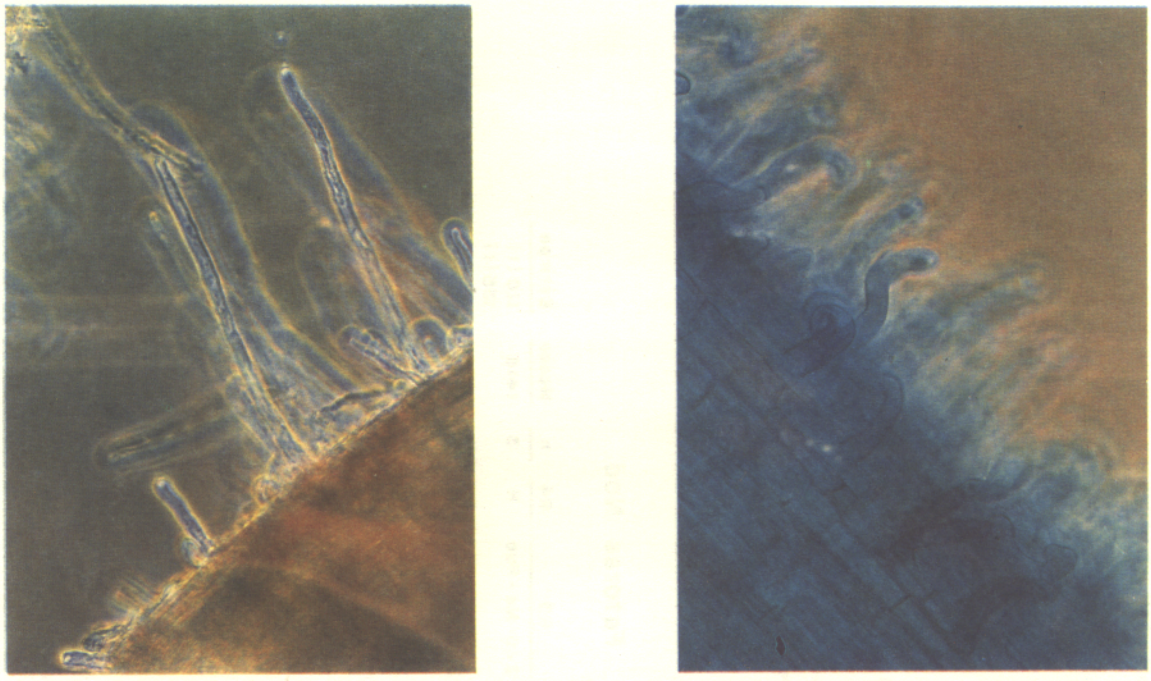


Figura 2.3. Fenótipos de raízes de soja, cultivar BR-16, provocados pela inoculação com a estirpe SEMIA 586 de *B. japonicum*. À esquerda, plantas não inoculadas e, à direita, tratamento inoculado. Avaliações realizadas 15 dias após a inoculação das plântulas. Aumento de 20 vezes. Segundo Nishi & Hungria (1993).

No estádio seguinte ocorre a dissolução das paredes celulares, permitindo a entrada das bactérias nas raízes. Um cordão de infecção é desenvolvido e cresce da extremidade do pêlo radicular encurvado em direção ao córtex, conduzindo o rizóbio para as células interiores. Com a divisão das células do córtex e a indução de um meristema nodular, forma-se o primórdio do nódulo. Os cordões de infecção penetram nas células individuais desses primórdios, em cujo citoplasma as bactérias são liberadas (Sprent, 1984; Sobral et al., 1991) e, então, envolvidas em uma membrana de origem vegetal, chamada "membrana peribacteroidal", cuja formação envolve vários sinais produzidos pelo rizóbio (Verma et al., 1993). Os primórdios diferenciam-se em um nódulo e a bactéria sofre um processo de diferenciação, transformando-se em bacteróide. O processo de diferenciação do bacteróide não é totalmente conhecido, mas há indicações de que alguns fatores relacionados com ele seriam a fosforilação protéica, a concentração do íon potássio e a baixa concentração de O_2 (Gober & Kashket, 1987, 1989; Karr & Emerich, 1989). Em seguida, inicia-se a expressão dos genes *nif* e *fix* (nitrogen fixation e fixation). Genes *nif* são os responsáveis pela síntese e funcionamento do complexo da dinitrogenase e apresentam homologia com os genes de bactérias associativas, como *K. pneumoniae*, e genes *fix* são os necessários à fixação mas que não são, estruturalmente, equivalentes aos genes de *K. pneumoniae*. Desenvolvem-se, então, as enzimas relacionadas com a quebra da tripla ligação do N_2 e com a assimilação do nitrogênio fixado. Já foram identificadas cerca de 40 proteínas que são sintetizadas durante o desenvolvimento e/ou funcionamento dos nódulos, as chamadas nodulinas (nodulinas precoces e tardias) e a expressão genética dessas proteínas vem sendo caracterizada.

Além desses estudos citados, existem linhas de evidência de que outros fatores, como lipopolissacarídeos, que estão presentes na superfície das bactérias, podem estar envolvidos nos primeiros estádios de reconhecimento da simbiose (Carlson et al., 1987; Priefer, 1989). Para maiores detalhes sobre o processo de infecção, consultar revisões recentes de Brewin (1991); Sobral et al. (1991); Franssen et al. (1992); Kijne (1992); Verma (1992). As principais etapas da nodulação estão resumidas na **Tabela 2.4**.

Tabela 2.4. Estádios para a formação dos nódulos e fenótipos causados nas raízes.

1-	Quimiotaxia
2-	Multiplicação do rizóbio na rizosfera, colonização (Roc, root colonization)
3-	Adesão do rizóbio às raízes da planta hospedeira (Roa, root attachment)
4-	Troca de sinais moleculares entre a planta hospedeira e as bactérias
5-	Alterações nos fenótipos radiculares, com a formação de raízes curtas e grossas (Tsr, thick and short root), encurvamento dos pêlos radiculares (Hac, hair curling), pêlos radiculares deformados (Had, hair deformation), aumento no número de pêlos radiculares (Hai, hair increase)
6-	Penetração da bactéria
7-	Crescimento do cordão de infecção (Inf, infection)
8-	Início de formação e desenvolvimento dos nódulos (Noi, nodule initiation)
9-	Liberação das bactérias (Bar, bacterial release)
10-	Diferenciação dos bacteróides (Bad, bacteroid differentiation)
11-	Desenvolvimento da nitrogenase, leghemoglobina e enzimas relacionadas com a fixação do N_2 (Nif, nitrogen fixation e Fix, fixation)
12-	Manutenção do tecido bacteroidal, função e persistência do nódulo (Nop, nodule persistence)

2.5. Dinitrogenase e Hidrogenase

O complexo enzimático presente nas bactérias e responsável pela redução do N_2 a amônia é chamado de nitrogenase ou dinitrogenase. Concomitantemente com o processo de fixação de N_2, o complexo enzimático da dinitrogenase também evolui hidrogênio (H_2), com o desperdício de elétrons e ATP que, de outro modo, seriam usados para a redução do N_2 (Evans et al., 1987). Um mínimo de 25% dos elétrons destinados à dinitrogenase é perdido pela evolução do H_2. A evolução de H_2 por nódulos de soja já havia sido observada por Hoch e colaboradores na década de 50 e ocorre mesmo em pressões extremamente elevadas de N_2 (Neves & Hungria, 1987). Conseqüentemente, a equação que representa o processo de fixação do N_2 pode ser representada por:

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2\,NH_3 + H_2$$

Sabe-se, hoje, que existem três tipos de dinitrogenase, denominadas dinitrogenase-molibdênio, dinitrogenase-vanádio e dinitrogenase-ferro. Para maiores detalhes, procurar revisão de Newton (1993). Em *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, porém, até o momento só foi detectada a dinitrogenase-molibdênio.

O processo de redução do N_2 começa pela doação de elétrons pela ferredoxina e flavodoxina para a redutase da dinitrogenase, ou componente I, que está associada com duas moléculas de MgATP.

Em seguida, a proteína reduzida se liga à dinitrogenase propriamente dita ou componente II, com a transferência dos elétrons e a hidrólise concomitante do ATP a ADP. Finalmente, os dois componentes da dinitrogenase se dissociam. Os elétrons são transferidos um a um e, como todo o processo requer oito elétrons, acredita-se que se formem vários componentes intermediários durante a reação.

O complexo enzimático da dinitrogenase é muito sensível ao O_2, podendo ser irreversivelmente inativado pela exposição aos níveis atmosféricos desse gás. As causas para essa sensibilidade ainda são discutidas, mas podem ter originado durante a evolução da enzima, quando o teor de O_2 na atmosfera era baixo. No caso de microrganismos aeróbicos, como *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, cria-se o paradoxo da necessidade de O_2 para gerar ATP e redutores para a dinitrogenase, mas ao mesmo tempo manter uma pO_2 suficientemente baixa para não inativar a enzima. Devem existir, portanto, mecanismos de proteção à dinitrogenase. Nos nódulos, um dos mecanismos é uma barreira à difusão do O_2 formada pelas células do córtex perto da superfície externa dos nódulos (Witty & Minchin, 1990), conforme pode ser visto na **Figura 2.4**. Em nódulos de soja, por exemplo, um minieletrodo de O_2 inserido no nódulo a uma profundidade de 0,5 mm conseguiu detectar uma queda drástica na pressão parcial de O_2 (Tjepkema & Yocum, 1974). Há, ainda, evidências de que diversas condições de estresse, como suprimento de seiva do floema, exposição a nitrato e acetileno, temperatura e água, resultam no aumento da resistência dos nódulos à difusão de O_2, podendo limitar a atividade da dinitrogenase. O segundo componente de proteção contra o O_2 nos nódulos é a leghemoglobina, uma molécula que se prende ao O_2 e serve para fornecer a quantidade adequada de O_2 para a respiração mas, ao mesmo tempo, manter a pO_2 baixa para a atividade da dinitrogenase (Layzell et al., 1993).

Algumas estirpes possuem uma segunda enzima, a hidrogenase, capaz de oxidar o H_2 evoluído, recuperando parte da energia perdida (Evans et al., 1987). A representação para a atividade dessa enzima seria, então:

$$H_2 + X \rightarrow H_2X,$$

sendo X um receptor de elétrons, normalmente o O_2.

A produção de H_2, pela dinitrogenase, indica um uso ineficiente de energia que, de outro modo, ficaria alocada no processo de fixação do N_2. Como parte dessa energia pode ser recuperada pela ação da hidrogenase, gerando ATP, considera-se que os sistemas que possuem essa enzima são mais eficientes. Comprovando essa hipótese, vários experimentos foram conduzidos, demonstrando que a adição de H_2 a suspensões de bacteróides ou nódulos formados por estirpes Hup^+ (que possuem a hidrogenase) promovia incrementos na atividade da dinitrogenase, efeito este ausente em estirpes Hup^-. Em certos casos, porém, a oxidação do H_2 não está acoplada com a formação de ATP e, conseqüentemente, não se observa economia de carbono (revisado em Neves & Hungria, 1987). O ciclo simplificado da ação da dinitrogenase e da hidrogenase pode ser visto na **Figura 2.5** .

A avaliação da energia perdida pela evolução do H_2 e a capacidade da hidrogenase reciclar parte da energia perdida tomou maior impulso após o estudo clássico de Schubert & Evans (1976), que assim definiram o termo eficiência relativa (ER):

$$ER = \frac{\text{elétrons utilizados para a redução do } N_2}{\text{fluxo total de elétrons para a dinitrogenase}}$$

Experimentalmente, essa eficiência pode ser calculada conforme a fórmula abaixo, que se baseia no princípio de que, na presença do acetileno (C_2H_2), todos os elétrons são alocados para a redução desse gás.

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ evoluído (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzido}}$$

ou, ainda, segundo a fórmula:

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ evoluído (ar)}}{H_2 \text{ evoluído em uma atmosfera sem } N_2}$$

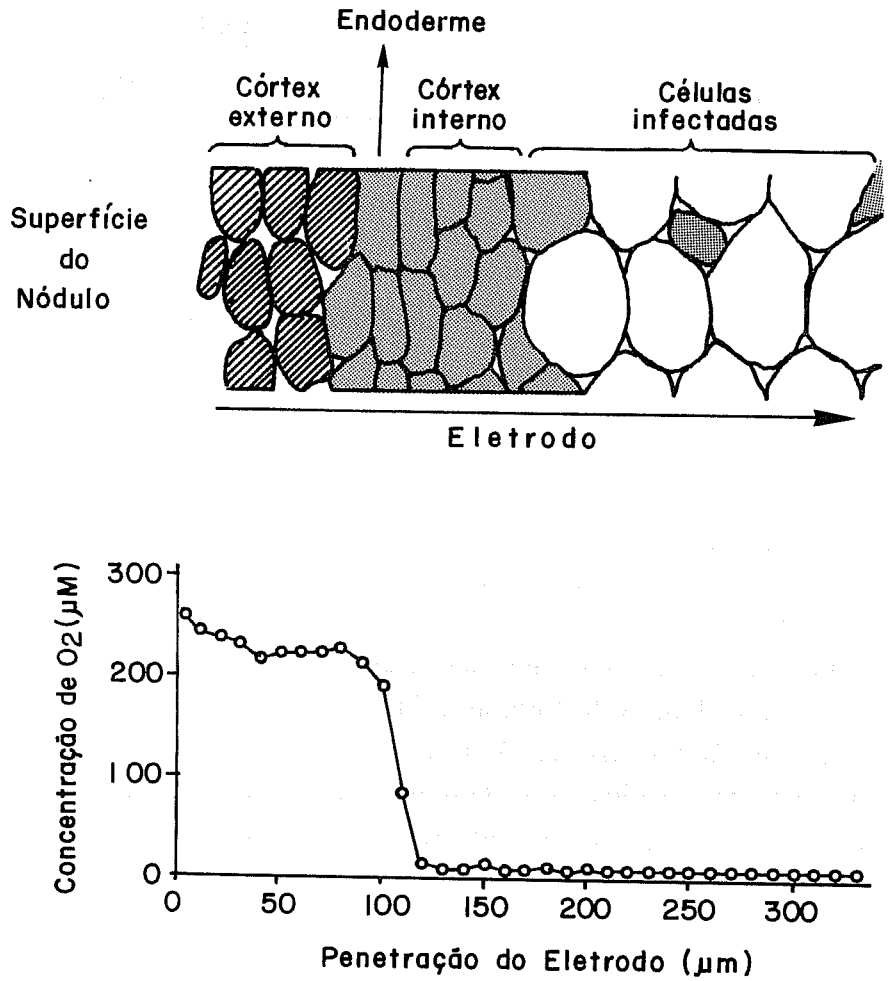


Figura 2.4 Barreira à difusão de O_2 no córtex do nódulo, formada pelas próprias células do córtex perto da superfície externa dos nódulos, e mudança na concentração de O_2 em um nódulo. Segundo Witty et al. (1986).

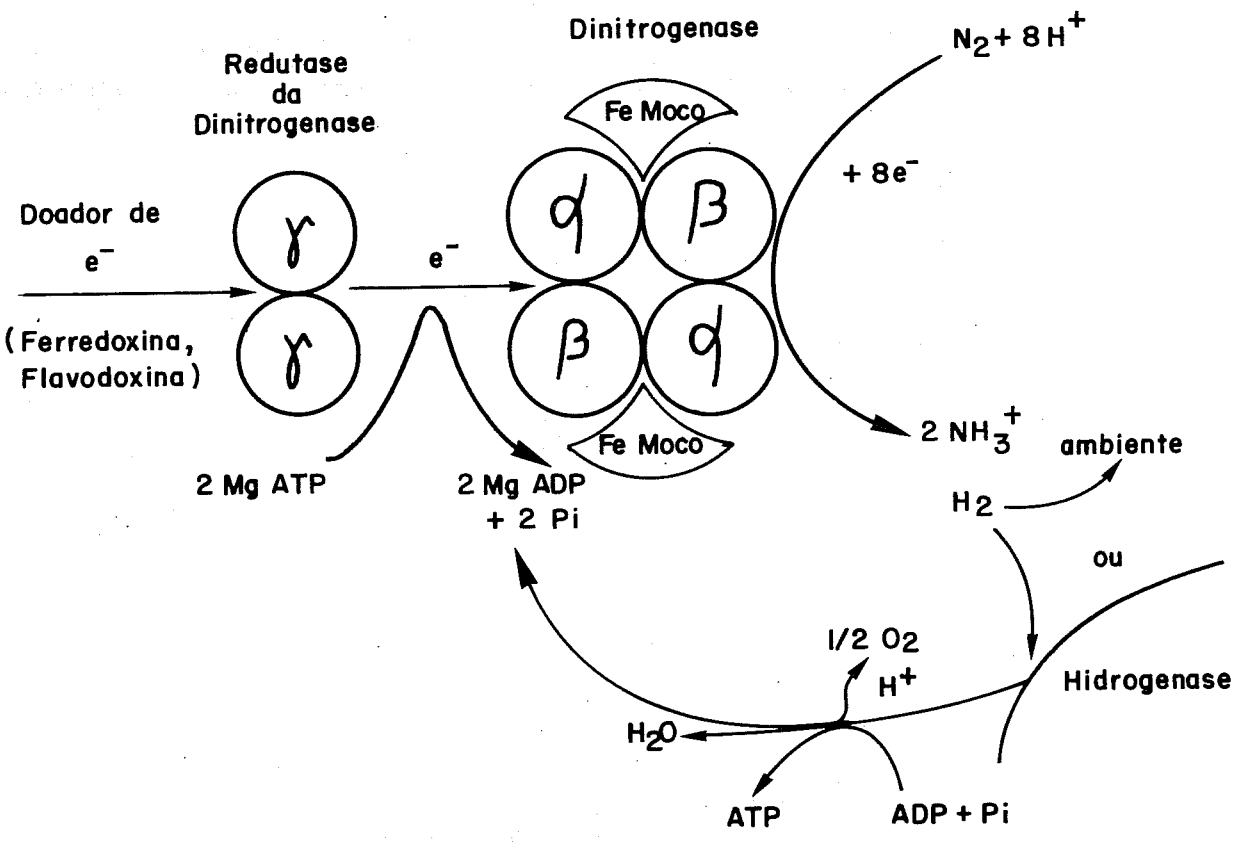


Figura 2.5. Ciclo simplificado da ação da dinitrogenase, reduzindo o nitrogênio atmosférico (N_2), e da hidrogenase, reciclando o hidrogênio (H_2) que é produzido obrigatoriamente durante o processo de redução do N_2.

Os autores constataram que diversos sistemas simbióticos estudados diferiam em sua eficiência relativa mas que, no caso de *Bradyrhizobium*, ao contrário de outras espécies de *Rhizobium*, a atividade da hidrogenase de algumas estirpes era capaz de reciclar todo o H_2 produzido pela dinitrogenase.

Estudos conduzidos com cultura contínua de *Azotobacter chroococcum* mostraram que, sob condições de limitação de carbono e fósforo, as culturas são fortemente dominadas pelo fenótipo Hup^+. Já nos casos de limitação por ferro ou O_2, há uma pequena vantagem do fenótipo Hup^- (Yates & Campbell, 1989). Além disso, vários outros fatores podem afetar a atividade da hidrogenase ou a alocação de elétrons para a dinitrogenase, resultando em maior ou menor eficiência na conversão de elétrons para a redução do N_2 (Neves & Hungria, 1987).

Os resultados obtidos em diversos experimentos que investigavam as vantagens do fenótipo Hup^+ em leguminosas, porém, são conflitantes. Em soja, há indicações de que as estirpes Hup^+ são mais eficientes energeticamente do que as Hup^-, podendo contribuir com maior acúmulo de N nos grãos (Schubert et al., 1978; Albrecht et al., 1979; Zablotowicz et al., 1980; Hanus et al., 1981). Nesses experimentos, porém, não foram utilizadas estirpes isogênicas para o fenótipo Hup. Comparando estirpes isogênicas Hup^+ e Hup^-, Devron et al. (1987) não detectaram, na fase inicial, diferenças

entre as estirpes e, aos 75 dias, as plantas inoculadas com as estirpes Hup^+ apresentaram menor matéria da parte aérea seca, o que foi atribuído à limitação de O_2 nos nódulos, pela oxidação pela hidrogenase. Em outros experimentos com estirpes isogênicas de *B. japonicum*, porém, observaram-se aumentos de 9% e 11%, respectivamente na matéria seca e teor de N total na parte aérea (Evans et al., 1985) e de 13% no N total acumulado pelas plantas (Hungria et al., 1989).

Além desse papel na economia energética, há sugestões para pelo menos mais duas funções para a hidrogenase: 1- mecanismo auxiliar de proteção respiratória, removendo o O_2 do ambiente da dinitrogenase e 2- prevenir a inibição da atividade da dinitrogenase pelo H_2 evoluído que, devido à compartimentalização da estrutura do nódulo, pode atingir concentrações inibitórias (revisado em Neves & Hungria, 1987).

Os estudos sobre a evolução do H_2 e hidrogenase continuam em diversos laboratórios do mundo. Muito já se conhece, também, sobre as propriedades físico-químicas, propriedades catalíticas, aspectos genéticos e regulação da expressão da hidrogenase (Maier, 1986; Evans et al., 1987; O'Brian & Maier, 1988; Arp, 1992). Embora a evolução do H_2 tenha sido freqüentemente indicada como um dos fatores que limitam a eficiência da fixação do N_2, restam muitas dúvidas, tanto a nível básico como a nível mais aplicado, que precisam ser melhor estudadas e entendidas. Uma das dúvidas surge na constatação de que as estirpes Hup^- parecem constituir a maioria dos isolados do solo representando, em alguns levantamentos realizados, de 75% a 81% da população rizobiana, o que poderia indicar alguma vantagem em termos de competitividade (Carter et al., 1978; Brewin, 1984; Arp, 1992).

2.6. Assimilação da Amônia Resultante da Fixação do N_2

O primeiro produto da fixação do N_2 é a amônia, que é transferida do bacteróide pela membrana peribacteroidal para o citossol da planta hospedeira (Bergersen, 1965; Bergersen & Turner, 1967). As reações de assimilação são então mediadas pela glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (**Figura 2.6**). O desenvolvimento dessas enzimas ocorre, principalmente, durante o estabelecimento da nodulação (Atkins et al., 1980, 1984; Miflin & Cullimore, 1984; Hungria et al., 1991), com mais de 95% da atividade localizada no citossol dos nódulos (Atkins et al., 1980; Miflin & Cullimore, 1984).

Existem duas formas de GOGAT nos nódulos, a dependente de ferredoxina e a NADH-GOGAT, cuja atividade geralmente é maior (Suzuki et al., 1986; Hungria et al., 1991) e que está localizada em plastídios (Shelp & Atkins, 1984). Inicialmente, a GS adiciona amônia ao ácido glutâmico, com a hidrólise concomitante de ATP. O N-amida da glutamina, que é o produto orgânico inicial do processo de fixação é, então, usado pela GOGAT, sendo adicionado a uma molécula de α-cetoglutarato (ácido 2-oxoglutárico), gerando duas moléculas de glutamato. Essas duas moléculas podem ser novamente usadas como receptoras da amônia ou podem ser usadas, posteriormente, como doadoras de amida. Devido ao baixo Km da GS para a amônia (200 nM), essa é considerada a principal via de assimilação da amônia nos nódulos (Boland et al., 1982; Shelp & Atkins, 1984; Atkins, 1991) .

Atividades elevadas da glutamato desidrogenase (GDH) também já foram detectadas nos nódulos (Shelp & Atkins, 1984; Hungria et al., 1991) e a assimilação, via GDH, seria pela adição da amônia ao ácido 2-oxoglutarato, gerando glutamato. Entretanto, devido às baixas concentrações de amônia encontradas nos nódulos e ao Km elevado dessa enzima, de 14 μM, é pouco provável que essa

via seja utilizada (Streeter, 1989; Atkins, 1991). A constatação de níveis elevados de atividade nos nódulos, porém, deixa dúvidas sobre a ação da GDH, que talvez possa ser importante sob condições de estresse (Atkins et al., 1984) ou durante a senescência dos nódulos (Sutton, 1983).

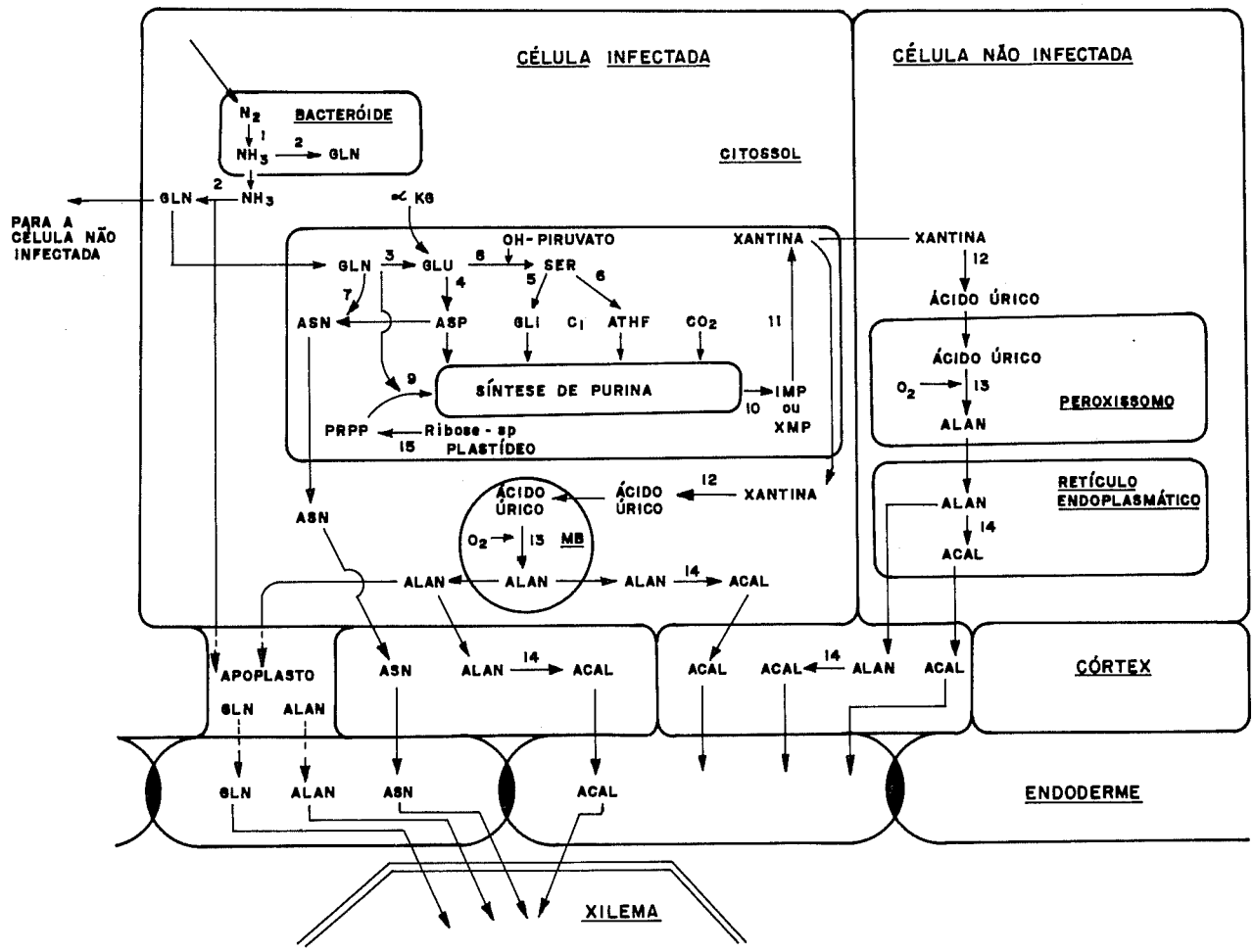


Figura 2.6. Vias de assimilação da amônia fixada nos nódulos de leguminosas. (1) Nitrogenase (E.C.1.18.6.1); (2) glutamina sintetase (E.C.6.3.1.2); (3) glutamato sintase (E.C.2.6.1.53); (4) aspartato aminotransferase (E.C.2.6.1.1); (5) serina hidroximetilase; (6) metileno tetrahidrofolato oxidoredutase (E.C.1.5.1.5); (7) asparagina sintetase (E.C.6.3.54); (8) fosfoglicerato oxidoredutase (E.C.1.1.1.95); (9) fosforibosil amido-transferase (E.C.2.4.2.14); (10) inosina monofosfato oxidoredutase (E.C.12.1.14); (11) vários passos; (12) xantina oxidoredutase (E.C.1.2.3.2); (13) urato oxidase (E.C.1.7.3.3); (14) alantoinase (E.C.3.5.2.5); (15) fosforibosilpirofosfato sintase (E.C.2.7.6.1). Abreviacões usadas: ALAN, alantoína; ACAL, ácido alantóico; ASN, asparagina; ASP, ácido aspártico; GLI, glicina; OH-piruvato, hidroxipiruvato; IMP-inosina monofosfato; PRPP, fosforibosil pirofosfato; SER, serina; THF, ácido tetrahidrofólico; XMP, xantina monofosfato. Segundo Neves & Hungria (1987).

Os principais produtos que são exportados dos nódulos para as plantas hospedeiras são as amidas (principalmente asparagina e, em menor porcentagem, a glutamina) e os ureídos (alantoína e ácido alantóico) (**Figura 2.6**). O maior transporte de N como amida ou ureídos varia com a espécie de leguminosa (Sprent, 1980; Atkins, 1991). No caso da soja, cerca de 90% do N total da seiva do xilema é transportado como ureídos, observando-se uma variação com a planta hospedeira e com a estirpe da bactéria (Neves et al., 1985; Hungria & Neves, 1987a,b; Neves & Hungria, 1987; Hungria et al., 1989); em menor porcentagem, tem-se a asparagina (Atkins, 1991). A alantoína e o ácido alantóico são formados nas plantas pela oxidação dos nucleotídeos de purina, derivados da síntese *de novo* ou da hidrólise de ácido nucléico. Os estudos sobre o metabolismo dos ureídos em soja foram realizados com $^{15}N_2$ e $^{13}N_2$ (Matsumoto et al., 1977; Minamisawa et al., 1986; Schubert & Coker, 1982). Maiores detalhes podem ser encontrados nas revisões de Neves & Hungria (1987) e Atkins (1991).

Em feijão e em soja nodulados, foi encontrada uma correlação positiva entre a porcentagem de N transportado na seiva do xilema como ureído e a produtividade, N total das vagens e índice de colheita para o N, tornando-se uma ferramenta importante nos programas de seleção de simbiontes mais eficientes (Neves et al., 1985; Hungria & Neves, 1987a,b; Neves & Hungria, 1987) (**Figura 2.7**).

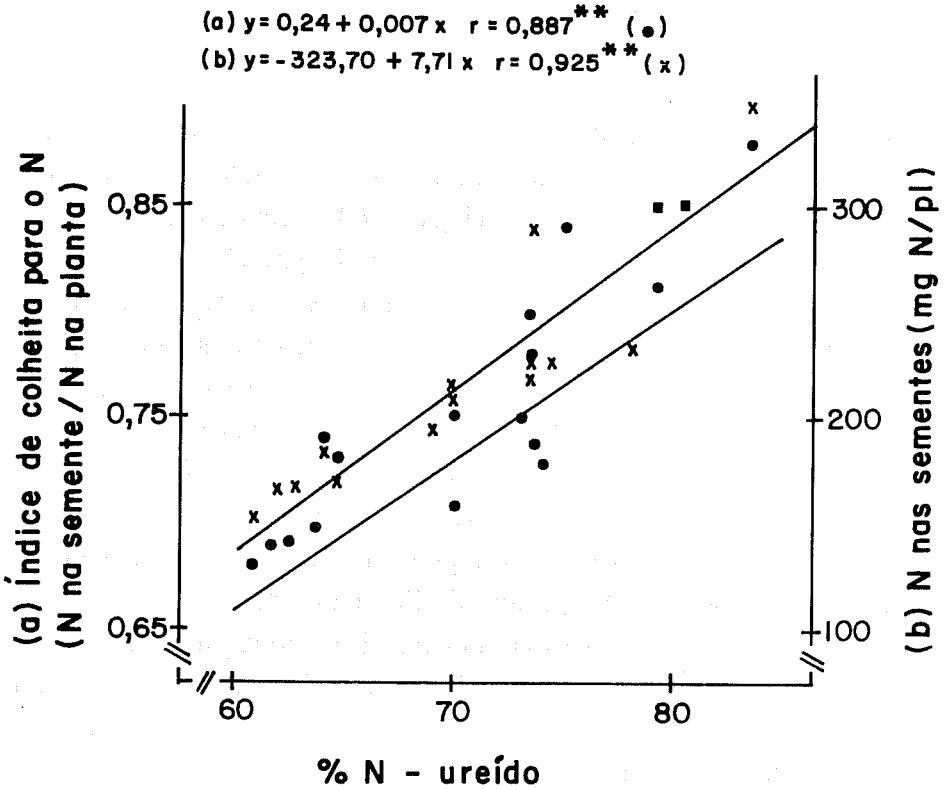


Figura 2.7. Correlação entre o teor de N-ureído na seiva do xilema, aos 35 dias após a emergência (DAE) e (a) índice de colheita para o N, (b) N total dos grãos aos 77 DAE. Experimento conduzido com cinco cultivares e seis estirpes de feijão. Segundo Hungria & Neves (1987 b).

Novos experimentos devem ser conduzidos para identificar e quantificar os benefícios do maior transporte de ureídos, pois tanto em soja como em feijão há resultados comprovando que o N-ureído é mais facilmente translocado para os grãos do que o N mineral (Neves et al., 1985; Hungria & Neves, 1987b; Yoneyhama, 1984a,b). Além disso, permanece a dúvida sobre as bases bioquímicas que explicariam a correlação positiva encontrada entre a maior eficiência relativa da nitrogenase (ER) e a maior porcentagem de N-ureído transportada na seiva do xilema (Neves et al., 1985; Hungria & Neves, 1987a,b).

2.7. Custos Energéticos do Processo de Fixação do N_2

Nas plantas dependentes exclusivamente do processo de fixação do N_2, a energia das reações fotossintéticas é armazenada nos nódulos, para ser oxidada e produzir redutores fortes (elétrons) e ATP, necessários à atividade da dinitrogenase. No caso das leguminosas dependentes de nitrato (NO_3^-), os gastos energéticos são similares aos da fixação biológica quando a assimilação ocorre nas raízes. Em algumas leguminosas, como a soja e o feijão, porém, o nitrato é reduzido principalmente nas folhas e o ATP necessário para o metabolismo posterior da amônia pode ser fornecido diretamente pela fotofosforilação nos cloroplastos, reduzindo os custos energéticos. Na **Figura 2.8** pode-se observar uma representação do fluxo de energia para os processos de redução do N_2 ou do nitrato nas leguminosas.

As diferenças no custo energético do nitrato, assimilado pelas raízes e pelas folhas e nas condições experimentais dos estudos conduzidos em vários laboratórios, levaram aos mais diversos resultados quando compararam a eficiência energética de leguminosas noduladas ou recebendo N mineral. Mais detalhes podem ser obtidos nas revisões de Phillips (1980); Schubert & Ryle (1980); Minchin et al. (1981); Mahon (1983); Saari & Ludden (1986); Neves & Hungria (1987).

O custo teórico de redução de 1 mol de N_2 para 2 mols de amônia é de 28 ATP. Dependendo da presença da hidrogenase, tipo de composto exportado e outros fatores, esse custo pode variar de 25,5 a 49 ATP.mol^{-1} N_2 fixado (Minchin et al., 1981; Saari & Ludden, 1986). Existem diversos métodos experimentais, conduzidos sob condições controladas de casa de vegetação ou a campo, para calcular os custos energéticos reais do processo de fixação do N_2 e compará-los com os valores teóricos (Mahon, 1983; Saari & Ludden, 1986; Neves & Hungria, 1987). Um dos métodos mais utilizados é o da avaliação dos custos energéticos pelo fluxo respiratório, cujos resultados podem ser expressos em número de mols de glicose.mol^{-1} de NH_4^+, mols de CO_2.mol^{-1} de NH_4^+, mg C respirado.mg^{-1} N fixado, etc. Segundo Mahon (1983), a estimativa termodinâmica teórica para a reação da dinitrogenase seria de, no mínimo, 0,11 mols de glicose.mol^{-1} de NH_4^+, mas, pela compilação dos valores encontrados em diversos experimentos, o autor considera como valor médio 0,50 mols de glicose.mol^{-1} de NH_4^+, portanto bem mais elevado do que o valor teórico.

No caso da soja, os gastos de carbono para a fixação do N_2 encontrados por alguns autores variaram de 2,4 g a 7,0 g C respirado.g^{-1} N fixado (Saari & Ludden, 1986). Além de diferenças nas condições experimentais e nos genótipos de soja e estirpes de bactérias, a discrepância dos resultados também pode estar relacionada com a presença da hidrogenase, que reduz os custos no consumo de carboidratos na ordem de 11% a 25%, com a fixação de CO_2 pela enzima NADP-málica e, principalmente, pela fosfoenol piruvato (PEP), que pode resultar em uma economia de 9% a 32% dos esquele-

tos de carbono, além de diferenças no tipo de composto nitrogenado sintetizado e transportado pela seiva do xilema (Minchin et al., 1981; Saari & Ludden, 1986; Neves & Hungria, 1987). De qualquer modo, procurar sistemas simbióticos mais eficientes é uma meta importante, pois cerca de 30% dos fotossintatos diários da planta hospedeira são desviados para os nódulos (Minchin & Pate, 1973; Mahon, 1983).

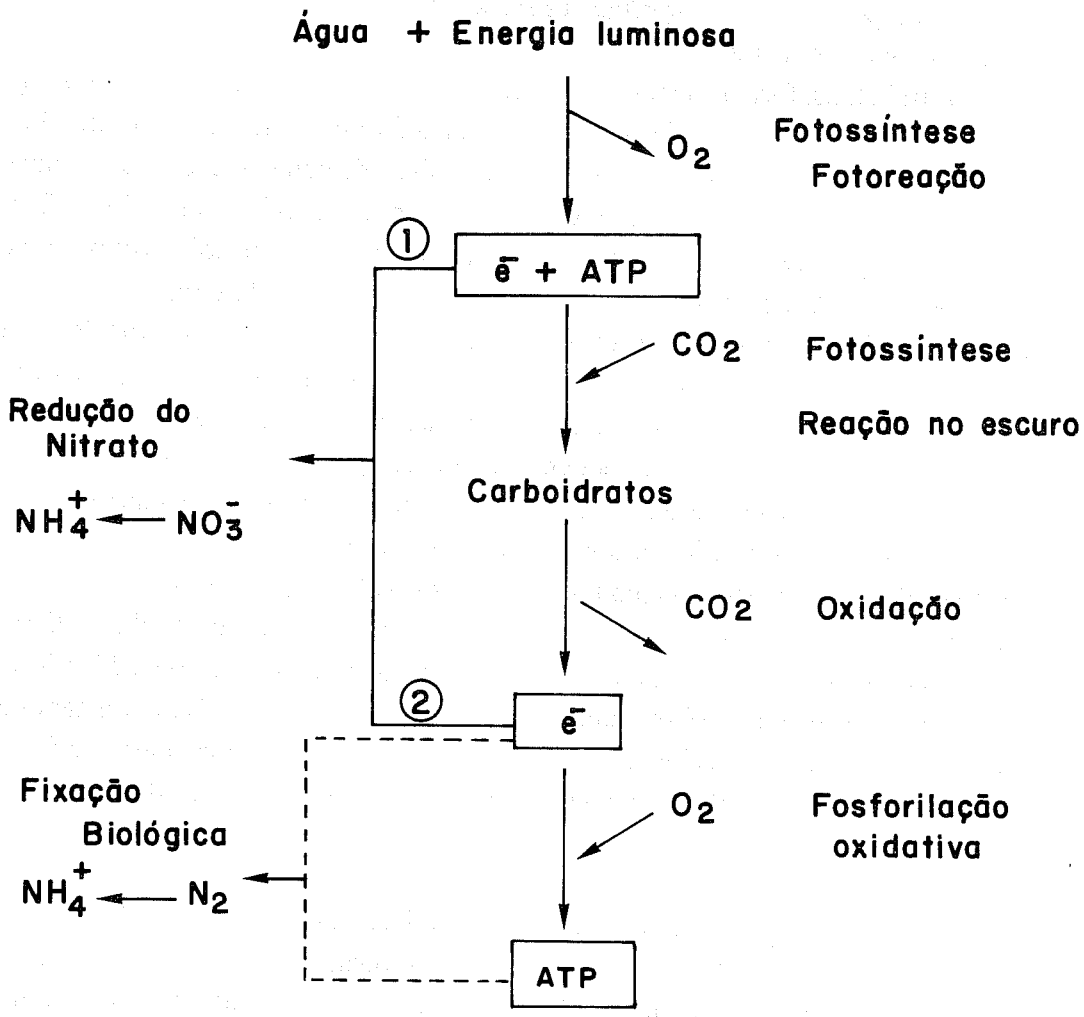


Figura 2.8. Representação do fluxo de energia envolvido na redução do nitrato do solo ou dos fertilizantes e na redução do N_2. Para a redução do nitrato podem ser utilizadas duas fontes de redutor: 1-excedentes de energia luminosa e 2-carboidratos produzidos pela fotossíntese. Segundo Mahon (1983).

No caso dos experimentos que encontraram maior eficiência nas plantas que assimilavam N mineral, os valores são, em média, 30% superiores aos das plantas fixando N_2 (revisado em Mahon, 1983; Neves & Hungria, 1987). Essa menor eficiência energética das plantas noduladas muitas vezes tem sido mencionada como um desestímulo à prática da inoculação. Combatendo esse pensamento, porém, tem-se que considerar, entre outros fatores, que o consumo energético para a fixação do N_2 é três vezes menor do que o do processo Haber e Bosch.. Conforme salientado por Mahon (1983), em

termos agronômicos, as vantagens da adaptação e melhoria dos sistemas simbióticos são muitas, particularmente em comunidades com grandes perdas de N por lixiviação ou desnitrificação, como ocorre em vários solos do Brasil.

2.8. Diferenças Morfológicas, Fisiológicas, Bioquímicas e Genéticas entre as Espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*

2.8.1. Diferenças entre as espécies

Em diversos trabalhos, foram encontradas diferenças marcantes entre estirpes de *B. japonicum*. Em relação às diferenças genômicas, inicialmente foi realizado um estudo de hibridização de DNA com espécies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium* e de comparação da estabilidade térmica da fita dupla de DNA das bactérias heterólogas e homólogas (Hollis et al., 1981). Esse estudo demonstrou que as estirpes de *B. japonicum* poderiam ser divididas em dois grupos principais de homologia do DNA e que o grupo I suportava ainda uma subdivisão em Ia e Ib.

Stanley et al. (1985) também observaram, utilizando hibridização com *nifDH* e seqüências homólogas dos genes *nod*, que as estirpes de *B. japonicum* caíam em dois genótipos marcantemente diferentes, sTI e sTII, que apresentavam linhas evolucionárias distintas. Diferenças entre os genótipos também foram confirmadas em estudos de seqüenciamento dos genes *nifDK* e *nifE*, que codificam a proteína Mo-Fe e o cofator Mo-Fe da dinitrogenase (Minamisawa, 1990; Minamisawa et al., 1992), por hibridizações com o gene *hup* (Minamisawa, 1990; van Berkum, 1990; Minamisawa et al., 1992), pelo padrão de restrição com os genes *nod* comuns (*nodYABC*) da estirpe USDA 110 (Rumjanek et al., 1993a) com as seqüências gênicas 16S rRNA (Young et al., 1991; Rumjanek et al., 1993b) e com as seqüências RS_s (Minamisawa et al., 1992), que estão agrupadas ao redor das regiões *nif* de *B. japonicum* (Kaluza et al., 1985). Informações sobre algumas estirpes citadas nesta revisão constam da **Tabela 2.5**. Hibridizações com 14 clones selecionados, ao acaso, de bibliotecas de cosmídeos de *B. japonicum* utilizadas por Kuykendall et al. (1992), também constataram a existência de dois grupos distintos dentro da espécie *B. japonicum*.

Diversas características fenotípicas (morfológicas, fisiológicas e bioquímicas) foram analisadas em bactérias dos diferentes genótipos, procurando relacioná-las com as diferenças genéticas. Fuhrmann (1990) encontrou diferenças na morfologia das colônias, constatando que bordas irregulares e planas ocorreriam exclusivamente no genótipo II (GTII) o que, contudo, não foi confirmado por Boddey & Hungria (1994a). Já Kuykendall et al. (1988) demonstraram que os genótipos diferiam quanto à composição dos ácidos graxos e que o grupo II apresentava resistência a níveis elevados dos antibióticos rifampicina, tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina, carbenicilina e ácido nalidíxico. As estirpes do GTII também diferiam quanto à composição dos polissacarídeos extracelulares (Huber et al., 1984), contendo ramnose e ácido 4-*O*-metil-glucurônico, com pequena quantidade de glicose e manose, ao passo que nas estirpes do GTI a composição incluía glicose, manose, galactose, 4-*O*-metil-galactose e ácido galacturônico (Minamisawa, 1989).

Outra diferença observada foi a de que as estirpes do grupo II produziam rizobiotoxina [ácido-2-amino-4-(2-amino-3-hidropropoxi)-*trans*-but-3-enóico, PM=190] e desidrorizobiotoxina (PM=192) (Minamisawa, 1989) que, quando sintetizadas nos nódulos de soja, induzem clorose em folhas novas das cultivares sensíveis, prejudicando o crescimento das plantas (Johnson et al., 1959; Owens & Wright, 1964a,b; La Favre & Eaglesham 1986a; Devine et al., 1988; Fuhrmann, 1990).

Tabela 2. 5. Características de algumas estirpes de *Bradyrhizobium* citadas neste capítulo.

Estirpes	Outras Nomenclaturas	Origem	Principais características
SEMIA 5032	USDA 110 TAL-102	EUA	Isolada pelo Niftal, Hawai. Grupo Ia (Hollis et al., 1981; Kuykendall et al., 1988, 1992); sTI (Stanley et al., 1985), genótipo I - A1 (Minamisawa, 1990).
USDA 122		EUA	Genótipo I - A2 (Minamisawa, 1990).
PJ 17-1	BR 103	EUA	Mutante revertante isogênica Hup^+ da estirpe PJ 17 (Lepo et al., 1981). Genótipo I - A2 (Minamisawa, 1990).
PJ 17	BR 102	EUA	Estirpe isogênica Hup^- da PJ 17. Genótipo I - A2 (Minamisawa, 1990).
SEMIA 5071	USDA 123	EUA	Grupo I (Hollis et al., 1981; Kuykendall et al., 1988). Sensível à alta temperatura e baixa umidade (Morote et al., 1990).
SEMIA 5051	USDA 73	EUA	Genótipo misto, entre I e II (Minamisawa, 1989).
USDA 31		EUA	Grupo II (Hollis et al., 1981; Kuykendall et al., 1988); sTII (Stanley et al., 1985); genótipo II - B1 (Minamisawa, 1990); *B. elkanii* II (Kuykendall et al., 1992).
USDA 94		EUA	Grupo II (Hollis et al., 1981; Kuykendall et al., 1988); genótipo II - B1 (Minamisawa, 1990); sTII (Stanley et al., 1985); *B. elkanii* IIa (Kuykendall et al., 1992).
USDA 76		EUA	Grupo II (Hollis et al., 1981; Kuykendall et al., 1988); sTII (Stanley et al., 1985); genótipo II - B2 (Minamisawa, 1990); *B. elkanii* II (Kuykendall et al., 1992).
SEMIA 5072	NC1005	EUA	Isolada na Universidade da Carolina do Norte.
SEMIA 5039	532c,G3	Brasil	Isolada pelo IPAGRO, RS, em 1966. Eficiente, mas pouco competitiva (Peres, 1979).
SEMIA 5019	29w, BR 29	Brasil	Isolada da linhagem IAC-70-559, pela EMBRAPA-CNPBS, RJ. Eficiência alta (Peres, 1979) a média (Neves et al., 1985). Competitiva (Peres, 1979), recomendada comercialmente desde 1979 até o presente momento.
R54-a	BR 54	Brasil	Isolada pela EMBRAPA-CNPBS, RJ, em 1963, de solos com alto teor de manganês e que haviam sido inoculados com inoculante misto da SARGS, RS. Eficiente (Döbereiner et al., 1970).
SEMIA 587	BR 96	Brasil	Isolada pelo IPAGRO,RS, em 1967. Eficiente e competitiva (Peres, 1979). Recomendada comercialmente de 1968 a 1975 e de 1979 até o presente momento.
SEMIA 5061	INPA 037	Brasil	Isolada pelo INPA, AM. Eficiente e competitiva.
DF395	BR 76	Brasil	Isolada de solos do DF. Forma muitos nódulos, mas de baixa eficiência (Neves et al., 1985).
SM_1b	BR 1	Brasil	Isolada pela EMBRAPA-CNPBS, RJ, em 1963, de solos que não haviam sido inoculados. Eficiência média (Döbereiner et al., 1970) a baixa (Neves et al., 1985).
965	BR 95	Japão	Eficiência baixa (Peres, 1979) a alta (Neves et al., 1985).
DF383	BR 77	Brasil	Isolada de solos do DF. Forma poucos nódulos, mas muito eficientes (Neves et al., 1985).
SEMIA 586	CB 1809, BR 33 USDA 136b	Austrália	Isolada pelo CSIRO, e enviada ao Brasil em 1966. Muito eficiente (Döbereiner et al., 1970), apesar da baixa massa nodular (Neves et al., 1985). Baixa capacidade competitiva e forma poucos nódulos com a cultivar IAC-2 (Peres, 1979).
SEMIA 527		Brasil	Isolado pelo IPAGRO, RS.
SEMIA 5070	CPAC 74K	Brasil	Isolada pela EMBRAPA-CPAC, DF.
SEMIA 5080	CPAC 7	Brasil	Isolada pela EMBRAPA-CPAC, DF. Subcultura da CB1809, mas competitiva (Vargas et al., 1992a). Nodula a cultivar IAC-2. Recomendada comercialmente desde 1992.
SEMIA 566	BR 40	Brasil	Isolada pelo IPAGRO, RS, de inoculante americano, em 1966 e recomendada comercialmente até 1978.
SEMIA 5079	CPAC 15	Brasil	Isolada pela EMBRAPA-CPAC, DF. Pertence ao serogrupo 566, mas é mais eficiente (Vargas et al., 1992a). Recomendada comercialmente desde 1992.
Isolados "S"		Brasil	Isoladas pela EMBRAPA-CPAC, DF.

As estirpes do grupo II também sintetizam ácido indol acético (AIA) *in vitro*, acumulando mais de 20 μM no meio, enquanto que nas estirpes do grupo I não se verificou síntese de AIA (Minamisawa & Fukai, 1991; Minamisawa et al., 1992). O triptofano é geralmente um intermediário chave na biossíntese de AIA em microrganismos (Morris, 1986). Minamisawa & Fukai (1991) observaram que a adição desse aminoácido aumentava a concentração de AIA nos sobrenadantes do GTII, ao passo que as estirpes do GTI não acumulavam AIA, mesmo na presença de triptofano.

Quanto à atividade enzimática, Huber et al. (1984) observaram que somente as estirpes do grupo II exprimiam a atividade da dinitrogenase *in vitro*, avaliada pelo método de redução do acetileno. Por outro lado, Minamisawa (1989) observou que o fenótipo Hup^+ está confinado ao genótipo I e que a expressão do fenótipo é consistente com a presença dos genes estruturais *hup* (Minamisawa, 1990; Minamisawa et al., 1992). Nem todas as estirpes do grupo I, porém, são Hup^+ (Minamisawa et al., 1992), o que sugere que a característica Hup implicaria em transferência genética horizontal entre estirpes do genótipo I (Minamisawa, 1990). Recentemente, porém, foi relatado que diversas estirpes apresentam atividade da hidrogenase denominada Hup-hr, isto é, Hup host regulated, caracterizada por não expressar atividade da hidrogenase em soja, mas sim em caupi (*Vigna unguiculata* L.) (van Berkum, 1990; van Berkum & Sloger, 1991). Algumas estirpes do genótipo II se enquadraram na categoria de Hup-hr (Keyser et al., 1982; van Berkum & Sloger, 1991), mas esse parâmetro ainda não foi considerado nos estudos de subdivisão em genótipos.

A síntese de rizobiotoxina e a presença de hidrogenase parecem ser incompatíveis, desde que a derrepressão da hidrogenase *in vitro* é inibida pela presença de rizobiotoxina (Minamisawa, 1988). Foi observado, então, que as estirpes do genótipo II não parecem carrregar os genes estruturais *hup* e que, portanto, a repressão pela rizobiotoxina provavelmente não ocorre em condições naturais (Minamisawa, 1990).

Em relação à assimilação do N_2 fixado pelas bactérias *in vitro*, foi relatado que as estirpes do grupo I assimilam amônia principalmente pela isoenzima GSII, enquanto que nas estirpes do grupo II a assimilação ocorre, preferencialmente, pela GSI (Rumjanek et al., 1993a).

Em simbiose, uma diferença observada foi a de que a principal oxidase terminal do citocromo aa_3 estava presente somente entre as etirpes do grupo II e que essas bactérias não possuíam a hemoproteína P-422 reativa com CO (Keister & Marsh, 1990).

Diferenças importantes foram encontradas na interação das bactérias com alguns genótipos de soja. Foi relatado que a restrição da nodulação (proliferação do córtex sem formação de nódulos) pelo gene dominante Rj_4, presente na cultivar Hill, ocorre pela inoculação com a grande maioria das estirpes do grupo II, mas não com as estirpes do grupo I (Devine et al., 1990; Kuykendall et al.,1992). Recentemente, porém, Sadowsky & Cregan (1992) observaram que essa restrição poderia ser estendida a algumas estirpes do grupo I. Também foi constatado por Devine et al. (1983) que as estirpes do grupo II nodulavam soja "não-nodulante", que possui o alelo rj_1rj_1 e também iniciavam a nodulação em amendoim (*Arachis hypogaea* L.), além de induzirem clorose pela produção de rizobiotoxina. A nodulação da soja com o alelo rj_1rj_1 também ocorreu com algumas estirpes do genótipo II utilizadas nos estudos de Rumjanek et al. (1993a), mas não foi confirmada plenamente por La Favre & Eaglesham (1986a).

Todas essas diferenças encontradas entre os dois genótipos, resumidas na **Tabela 2.6**, levaram Kuykendall et al. (1992) a sugerirem, recentemente, a subdivisão em duas espécies: *B. japonicum*, com as estirpes do genótipo I, e *B. elkanii*, que incluiria as estirpes do genótipo II (**Tabela 2.3**).

Para os estudos brasileiros, resta a decisão de quais parâmetros poderiam ser mais facilmente empregados para o enquadramento das estirpes nas duas espécies. Através de uma análise dos parâmetros obtidos em diversos trabalhos, da repetibilidade e consistência dos resultados entre autores e das condições de muitos laboratórios brasileiros, podem ser recomendadas, hoje, as análises de composição dos polissacarídeos extra-celulares, resistência intrínseca a níveis elevados de antibióticos, síntese de rizobiotoxina e ácido indol acético *in vivo* ou *in vitro*, presença da hidrogenase pela hibridização com os genes *hup* ou pelo fenótipo Hup, além da hibridização específica com algumas seqüências genéticas, como o *nifDK*, *nifE*, RS_s e 16S rRNA (Stanley et al., 1985; Kuykendall et al., 1988; Minamisawa, 1989, 1990; Minamisawa & Fukai, 1991; Minamisawa et al., 1992; Rumjanek et al., 1993b; Boddey & Hungria, 1994a). Para a identificação inicial de diversos isolados, porém, deve-se considerar a sugestão de Minamisawa et al. (1992), da análise de ácido indol acético *in vitro*, por ser uma análise fácil, envolvendo custos baixos e que apresenta alta correlação com a divisão em genótipos ou espécies.

2.8.2. Divisão das estirpes "brasileiras" em *B. japonicum* e *B. elkanii*

Embora os estudos mostrando diferenças entre estirpes de *B. japonicum* tenham iniciado nos Estados Unidos na década de 80, análises semelhantes não foram realizadas com as estirpes "brasileiras", isto é, estirpes que foram ou são utilizadas em estudos e inoculantes no Brasil.

Recentemente, o uso de apenas dez oligonucleotídeos curtos pela análise de RAPD (random amplified polymorphic DNA) foi capaz de diferenciar algumas estirpes brasileiras (Lunge, 1993), embora nenhuma correlação com a divisão em genótipos ou espécies tenha sido feita.

A análise de alguns parâmetros, como assimilação da amônia pela GS *in vitro* e hibridização com a seqüência 16S rRNA nas estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587, recomendadas comercialmente, mostrou que ambas apresentam características de *B. elkanii* (Rumjanek et al., 1993a,b)

Em outro estudo, 32 estirpes "brasileiras" de *Bradyrhizobium* e oito estirpes-padrão americanas dos genótipos I, II e misto foram analisadas para diversos parâmetros *in vitro*, como morfologia das colônias, reações sorológicas, resistência intrínseca a antibióticos, síntese de ácido indol acético, expressão da hidrogenase e parâmetros *in vivo*, como produção de rizobiotoxina e restrição à nodulação pelos genes Rj_4 e rj_1rj_1 da soja. Um fenograma obtido com esses parâmetros mostrou que a SEMIA 586 e a SEMIA 5080 são as únicas estirpes "brasileiras" que pertencem ao genótipo I (*B. japonicum*) e que a maioria das estirpes utilizadas em inoculantes, ou em estudos conduzidos no Brasil, pertence ao genótipo II (*B. elkanii*) (Boddey & Hungria, 1994a) (**Figura 2.9**).

Diversos isolados das regiões do Cerrado pertencentes ao sorogrupo SEMIA 566, porém, ficaram em uma posição intermediária entre as duas espécies. As principais diferenças detectadas nesse grupo misto foram a síntese de níveis intermediários de ácido indol acético e a ausência de sintomas graves de clorose provocados pela rizobiotoxina (Boddey & Hungria, 1994a). Essas estirpes estão sendo analisadas, agora, com diversos oligonucleotídeos pela técnica de PCR e os resultados preliminares confirmam o fenograma obtido.

Tabela 2.6. Algumas diferenças encontradas entre as espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*.

Característica	*B. japonicum*	*B. elkanii*	Referência
Morfologia das colônias	sem colônias com bordas irregulares e planas	aparecem colônias com bordas irregulares e planas	Fuhrmann (1990)
Composição dos ácidos graxos	1,3% 16:1 cis 9, 3,6% 16:1 C, 8,8%, 16:0, 1,2% 19:1 ciclopropano e 81,2% 18:1	0,5% 16:1C, 11,1% 16:0, 0,8% 17:0 ciclopropano, 24,7% 19:0 ciclopropano e 62,3% 18:1	Kuykendall et al. (1988)
Resistência a níveis elevados de antibióticos (µg/ml)	não	rifampicina (500), tetraciclina (100), estreptomicina (250), cloranfenicol (500), eritromicina (250), carbenicilina (500), ácido nalidíxico (50)	Kuykendall et al. (1988)
Composição dos polissacarídeos extra-celulares	glucose, manose, galactose, 4-*O*-metil-galactose, ácido galacturônico`	predomínio de ramnose, ácido 4-*O*-metil-glucurônico	Huber et al. (1984)
Síntese de rizobiotoxina	não	sim	Minamisawa (1989)
Síntese de ácido indol acético *in vitro* em meio, com ou sem triptofano	não	sim	Minamisawa & Fukai (1991), Minamisawa et al. (1992)
Atividade da dinitrogenase *in vitro*	não	sim	Huber et al. (1984)
Assimilação do N *in vitro*	isoenzima GSII	isoenzima GSI	Rumjanek et al. (1993a)
Genótipo *hup*	sim	não	Minamisawa (1990)
Fenótipo Hup	sim	não	Minamisawa (1989)
Presença, em simbiose, do citotromo *aa3*	não	sim	Keister & Marsh (1990)
Nodula soja com o alelo Rj_4	sim	não	Devine et al. (1990)
Nodula soja com o par de alelos rj_1rj_1	não	sim	Devine et al. (1983)
Nodula amendoim	não	sim	Devine et al. (1983)
Eficiência de fixação do N_2	maior	menor	Fuhrmann (1990), Teaney & Fuhrmann (1992), Vasilas & Fuhrmann (1993), Boddey & Hungria (1994b)
Competitividade com *G. max*	maior	menor	Minamisawa et al. (1993), Boddey & Hungria (1994b)
Competitividade com *G. soja* e *Macroptilium atropurpureum*	menor	maior	Minamisawa et al. (1993)

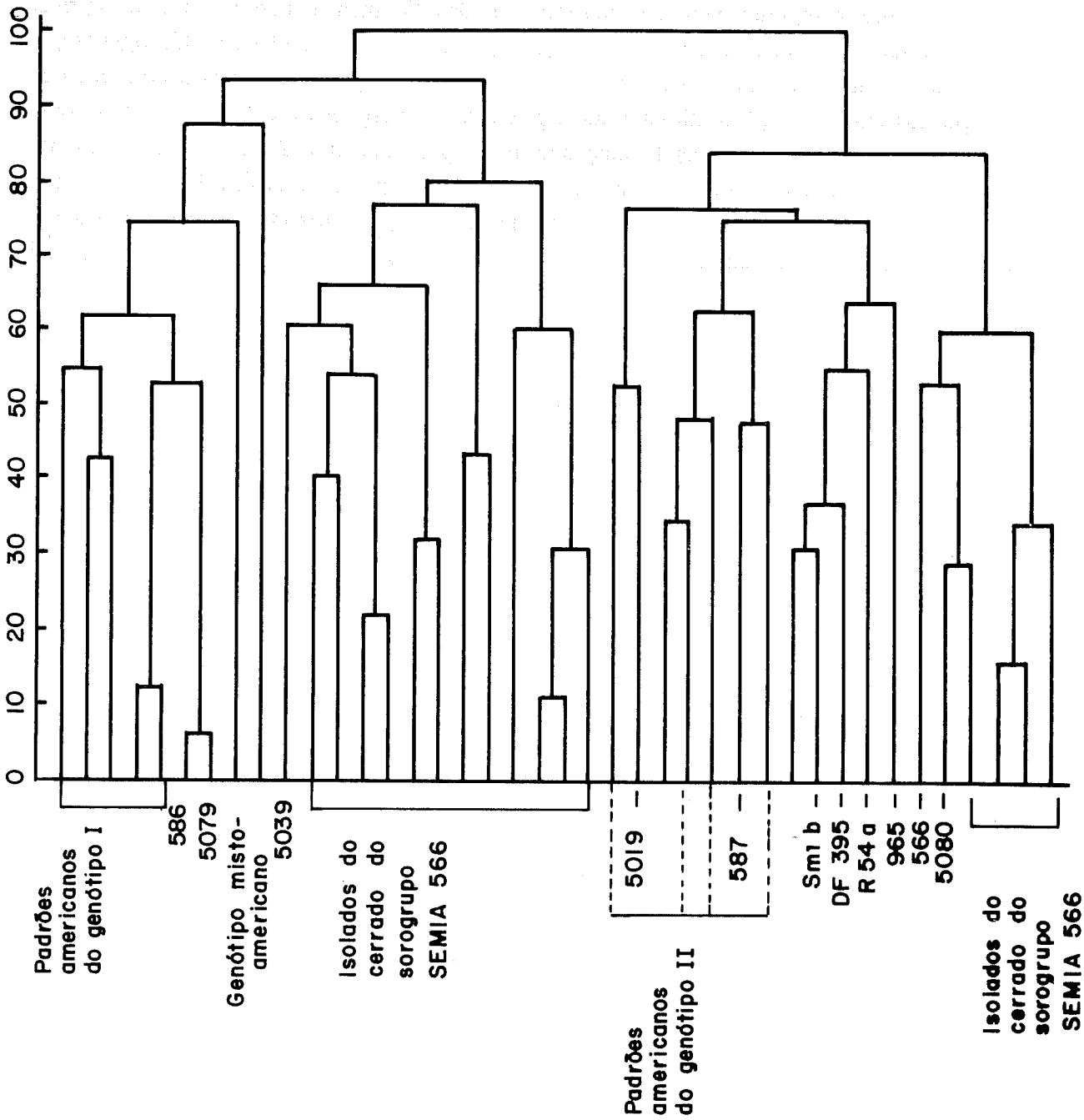


Figura 2.9. Fenograma de 40 estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam a soja, obtido pelas matrizes de similaridade pelo método UPGMA (unweight pair-group with arithmetic mean), considerando diversos parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Segundo Boddey & Hungria (1994a).

2.9. Eficiência e Capacidade Competitiva das Estirpes

2.9.1. Parâmetros que afetam a eficiência e competitividade

Conforme já mencionado, devido ao custo energético elevado do processo de fixação do N_2, estirpes mais eficientes energeticamente devem ser procuradas. Foi mencionado, ainda, que os principais parâmetros que vêm sendo procurados são as estirpes com maior atividade da hidrogenase, da PEP carboxilase e com maior síntese de ureídos. Na **Tabela 2.7**, alguns resultados encontrados em estirpes isogênicas Hup^+ e Hup^- confirmam que a presença da hidrogenase e o maior transporte de ureídos permitiram taxas mais elevadas de fixação do N_2 e aproveitamento desse N, com teores mais elevados de N total, maior índice de colheita para o N e menor perda de N nas folhas senescidas. Sistemas simbióticos com maior atividade da glutamina sintetase (Hungria et al., 1991; Pacovsky & Hungria, 1990) e da PEP carboxilase (Hungria, 1993) nos nódulos também apresentaram maior eficiência de fixação do N_2.

Tabela 2.7. Efeito de mutantes isogênicas Hup (PJ 17-1 e PJ 17) de *B. japonicum* em diversos parâmetros relacionados com a eficiência da fixação do N_2 em plantas de soja cv. Santa Rosa*.

Dias Após a Emergência	Parâmetros Analisados	Hup^-	Hup+
48 (florescimento)	nódulos secos ($mg.pl^{-1}$)	795 a	841 a
	atividade de redução do acetileno ($\mu mol\ C_2H_4.pl^{-1}h^{-1}$)	103,7 a	117,5 a
	eficiência relativa da dinitrogenase	0,78 b	1,00 a
	eficiência dos nódulos (mg N fixado.g^{-1}de nódulo)	205 b	238 a
	N total transportado no xilema ($\mu g\ N.pl^{-1}min^{-1}$)	1,91 b	2,34 a
	%N-ureído na seiva do xilema	79,36 b	88,80 a
	N total das plantas (folha+caule +raiz) ($mg\ N.pl^{-1}$)	181,2 b	218,5 a
70 (enchimento dos grãos)	N total (folha+caule+raiz) ($mg\ N.pl^{-1}$)	161,1 a	168,3 a
	N total das vagens ($mg\ N.pl^{-1}$)	113,5 b	144,4 a
	N total nas folhas senescidas ($mg\ N.pl^{-1}$)	11,6 a	9,5b
	Índice de colheita para o N [N nas vagens.(N total nas plantas)$^{-1}$]	0,40 b	0,45 a

* Experimento conduzido em vasos de Leonard, esterilizados, contendo areia e vermiculita. Os dados representam médias de cinco repetições. Para cada parâmetro, valores seguidos pela mesma letra não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Segundo Hungria et al. (1989).

Em relação aos estudos de ecologia microbiana é interessante salientar que, embora vários métodos tenham sido usados para caracterizar estirpes do solo, como sorologia (Fuhrmann, 1990; Sawada et al., 1990), mobilidade eletroforética de proteínas celulares (Noel & Brill, 1980; Kamicker & Brill, 1986), resistência intrínseca a antibióticos (Scotti et al., 1982; Sawada et al., 1990), resposta a bacteriofagos (Kowalski et al., 1974), entre outros, raramente há menções sobre a relação entre esses parâmetros e a eficiência das estirpes que foram caracterizadas.

Recentemente, alguns trabalhos procuraram relacionar a eficiência das estirpes com as espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*. Minamisawa (1989) classificou as estirpes do genótipo I como eficientes e as do genótipo II como ineficientes, baseado principalmente na produção de rizobiotoxina e ausência da hidrogenase. Há, ainda, indicações de que as estirpes do genótipo II apresentariam inferioridade simbiótica (Fuhrmann, 1990), com menor matéria de nódulos e da parte aérea secas, menor fixação de N_2 e menores concentrações de clorofila e proteína nas folhas (Teaney & Fuhrmann, 1992; Vasilas & Fuhrmann, 1993). Recentemente, Boddey & Hungria (1994b) também observaram que, sob condições axênicas (isto é, na ausência de microrganismos estranhos), as estirpes classificadas na espécie *B. japonicum* (genótipo I) apresentaram maior precocidade de fixação do N_2 e taxas mais elevadas de fixação de N_2 no pré-florescimento do que as estirpes da espécie *B. elkanii* (**Tabela 2.8**).

Em relação à competitividade, embora muitas vezes seja possível obter estirpes mais eficientes, através de seleção ou de modificações genéticas (Maier & Brill, 1978; Albrecht et al., 1979; Zablotowitz et al., 1980; Hanus et al., 1981; Williams & Phillips, 1983; Peres et al., 1984; Kaneshiro & Kwolek, 1985; Maier & Graham, 1990), o estabelecimento dessas bactérias no campo é extremamente difícil, devido à elevada capacidade competitiva das estirpes nativas ou naturalizadas do solo (Ham et al., 1971; Boonkerd et al., 1978; Ham, 1980; Triplett, 1990a).

Há trabalhos, já da década de 20, mostrando que as estirpes nativas do solo nem sempre eram efetivas, tornando necessário um processo de seleção para aumentar a produtividade pela inoculação (Baldwin & Fred, 1929). Também são antigos os relatos de que o sucesso da inoculação dependia da capacidade das estirpes inoculadas de competir com as estirpes infectivas mas ineficazes do solo (Nicol & Thornton, 1941). A competitividade pode ser definida como a relação entre a proporção do número de bactérias de uma determinada estirpe no inóculo e a proporção de nódulos que essa estirpe consegue ocupar nas raízes da planta hospedeira. Para competir com as estirpes naturalizadas ou nativas do solo, a bactéria introduzida deve apresentar características genéticas ou fisiológicas que permitam o seu favorecimento ou, então, uma vantagem numérica.

Diversos laboratórios têm concentrado seus esforços na identificação dos fatores que influenciam a capacidade competitiva das bactérias. Alguns desses fatores incluem a mobilidade e quimiotaxia (Mellor et al., 1987; Caetano-Anollés et al., 1988a,b; Liu et al., 1989; Wadisirisuk et al., 1989; Catlow et al., 1990a,b; Thies et al., 1991; Zdor & Pueppke, 1991), polissacarídeos da superfície celular (Bhagwat et al., 1991; Zdor & Pueppke, 1991), produção de bacteriocina (Triplett, 1990b), taxa de infecção (Hahn & Hennecke, 1988; McDermott & Graham, 1990), capacidade de responder a diversos substratos (Bottomley et al., 1990), taxa de crescimento em substratos de solos (Viteri & Schmidt, 1987), eficiência da estirpe em formar nódulos (McDermott & Graham, 1990) e possibilidade de realizar manipulações genéticas (Triplett, 1990a). As respostas, porém, são variadas e pouco se sabe sobre as características genéticas que determinam a capacidade competitiva das estirpes (Bhagwat & Keister, 1992).

Enquanto diversos laboratórios do mundo procuram descobrir as bases genéticas responsáveis pela maior competitividade, uma estratégia simples pode ser a da seleção para maior atividade de fixação do N_2 e para nodulação precoce. Isso porque foram obtidos diversos resultados mostrando que a seleção para maior atividade de fixação (Oliveira & Graham, 1990) e para nodulação precoce (Handelsman et al., 1984; Stephens & Cooper, 1988; Oliveira and Graham, 1990) podem conduzir, simultaneamente, à seleção para maior habilidade competitiva.

Para entender melhor os mecanismos de sobrevivência e competitividade, também é necessário um bom entendimento da ecologia dessas bactérias no solo e, no Brasil, poucos estudos têm sido conduzidos nesse sentido. Alguns aspectos importantes da ecologia microbiana foram recentemente revisados (Barnet, 1991; Giller & Wilson, 1991; Bottomley, 1992) e devem ser considerados em estudos futuros.

Em relação às duas espécies de *Bradyrhizobium*, em estudos conduzidos em substrato estéril por Minamisawa et al. (1993) as estirpes pertencentes ao genótipo I foram mais competitivas do que as estirpes do genótipo II em diversas cultivares de *G. max*, exceto a cultivar Peking, enquanto que as estirpes do genótipo II apresentaram maior competitividade em *Glycine soja* e *Macroptilium atropurpureum*. Também em substrato estéril, Boddey & Hungria (1994b) observaram que as estirpes de *B. japonicum* foram mais competitivas do que as de *B. elkanii*, mas que as estirpes classificadas em um genótipo misto foram mais competitivas do que as duas espécies (**Tabela 2.8**).

Já em condições não estéreis, foi sugerido que, embora a síntese de rizobiotoxina contribua para a menor eficiência das estirpes, talvez essa toxina auxilie na sobrevivência das estirpes no solo, ajudando-as na competição com outros microrganismos (Minamisawa, 1990). Do mesmo modo, as estirpes Hup^-, embora menos eficientes, parecem constituir a maioria dos isolados e, nos levantamentos realizados, representaram de 75% a 81% dos isolados do solo (Carter et al., 1978; Brewin, 1984), o que também poderia indicar alguma vantagem em termos de competitividade.

Todos esses estudos sugerem que ainda não há nenhum parâmetro conclusivo que permita a agilização do processo de seleção de estirpes mais eficientes e competitivas para a soja e que os métodos tradicionais, de avaliação da quantidade de N_2 fixado e ocupação dos nódulos, ainda são os mais confiáveis.

2.9.2. Seleção de estirpes mais eficientes e competitivas no Brasil

Embora a seleção de estirpes mais eficientes e competitivas para a soja venha sendo feita desde a introdução dessa cultura no Brasil (Freire, 1982), trabalhos atuais mostram que ainda existe um grande potencial para incrementar os níveis de produtividade via fixação biológica do N_2 (Scotti et al., 1981; Peres et al., 1984; Neves et al., 1985; Vargas et al., 1992a).

Com a introdução da soja no Brasil, inicialmente foram utilizados inoculantes americanos, que muitas vezes não se mostraram eficientes. Foi então realizado o isolamento da estirpe "adaptada" SEMIA 566, em 1966, de uma área que havia recebido inoculante americano fabricado pela firma Dixie Inoc. Essa estirpe passou, então, a ser recomendada comercialmente no Brasil até 1978 com grande sucesso (J. R. J. Freire, comunicação pessoal).

Tabela 2. 8. Valores médios de três repetições do número (NN, número.planta^{-1}) e matéria (MNS, mg.planta^{-1}) dos nódulos secos e N total (NTPA, mg N.planta^{-1}) acumulado na parte aérea, aos 28 dias após o plantio (DAP), MNS, NTPA e eficiência dos nódulos (EN, mg N.mg de nódulo^{-1}), no pré-florescimento (38 DAP), e capacidade competitiva (Compet., porcentagem de ocupação dos nódulos quando inoculadas na proporção de 1:1 contra a SEMIA 5019) para as estirpes-padrão de *Bradyrhizobium* pertencentes ao genótipo I (SEMIA 5032, USDA 122, PJ 17-1, SEMIA 5071), genótipo misto (SEMIA 5051) e genótipo II (USDA 31, USDA 94 e USDA 76), quando inoculadas em soja, cultivar BR-16 (Boddey & Hungria, 1994b).

Genótipo	Início da Nodulação*			Pré-Florescimento*			
	NN	MNS	NTPA	MNS	NTPA	EN	Compet.
GTI	100,75 b	218,50 a	63,73 a	299,34 a	89,38 a	0,290 a	80,56 b
GT misto	99,00 b	141,00 c	36,00 b	294,00 a	74,15 a	0,252 a	88,89 a
GTII	128,00 a	181,00 b	44,10 b	331,78 a	52,26 b	0,174 b	71,43 c

* Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Na década de 70 foram conduzidos alguns estudos procurando selecionar estirpes mais eficientes para a soja e relacionar parâmetros que permitissem a seleção *in vitro*. Um dos trabalhos pioneiros foi conduzido por Döbereiner et al. (1970), que observaram que as estirpes "excepcionais" tinham seu crescimento inibido em meio enriquecido com asparagina. Isso, porém, não foi confirmado posteriormente (Boddey & Hungria, 1994a; M.C.P. Neves, comunicação pessoal). Dentre as estirpes testadas por Döbereiner et al. (1970), estava a SEMIA 586 (=CB 1809), que em 1968 era recomendada para a Austrália pelo Commonwelth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) e classificada como excepcional, tendo sido enviada para o Brasil pelo Dr. D. O. Norris em 1966 (Döbereiner et al., 1970). Nessa mesma época, o teor de leghemoglobina nos nódulos também foi sugerido como um parâmetro diferencial entre as estirpes de eficiência "normal" e "excepcional" em soja (Pedrosa et al., 1970). Outros estudos dessa época procuraram rizóbios adaptados às condições e solos brasileiros (Lopes et al., 1976a,b).

Ainda na década de 70, os rizobiólogos também tiveram de solucionar o desafio de estabelecer estirpes em solos de Cerrado recém abertos para a cultura da soja. O insucesso da inoculação nesses solos levou a estudos que determinaram que a adubação e a calagem resultavam em um ambiente favorável à multiplicação de actinomicetos produtores de antibióticos (Coelho & Drozdowicz, 1978). Foi então selecionada a "super estirpe" SEMIA 5019 (=29w) (Peres & Vidor, 1980), que conseguia se estabelecer nesses solos, constatando-se que a sobrevivência dos rizóbios inoculados dependia da resistência a antibióticos, particularmente a estreptomicina (Scotti et al., 1981, 1982). Hoje, porém, acredita-se que as principais causas para aquele insucesso seriam a especificidade hospedeira da variedade IAC-2, que foi recomendada na época de desbravamento dessas áreas (Peres & Vidor, 1980; Vargas & Suhet, 1980a), e o uso de baixas doses de inoculante, que não era de boa qualidade (Vargas & Suhet, 1980a; Peres et al., 1989; Vargas et al., 1992b).

Trabalhos conduzidos em casa de vegetação e no campo, no final da década de 70 (Peres & Vidor, 1980; Vargas & Suhet, 1980a), levaram à recomendação nacional das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587 para a produção de inoculantes. Uma das principais vantagens dessas estirpes era a capacidade de formar uma simbiose efetiva com a cultivar IAC-2, que apresentava elevada especificidade hospedeira.

Os trabalhos de seleção de estirpes continuaram e, no Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado (CPAC), da EMBRAPA, os estudos tomaram maior impulso pela utilização do método de avaliação da atividade de nódulos individuais, pela técnica de cromatografia gasosa (Peres et al., 1984), para a seleção de estirpes mais eficientes a partir de populações estabelecidas em solos sob cultivo de soja. Os estudos se concentraram em populações de dois sorogrupos, o da SEMIA 566, que é uma estirpe muito competitiva e foi recomendada comercialmente de 1966 a 1978, se estabelecendo em grande parte dos solos cultivados e o da SEMIA 586, que é muito eficiente (Döbereiner et al., 1970; Neves et al., 1985), mas apresenta baixa capacidade competitiva, além de formar poucos nódulos com a cultivar IAC-2 (Peres, 1979).

Após vários anos de pesquisa, foram obtidas duas variantes das estirpes SEMIA 566 e SEMIA 586 que, além de permitirem ganhos de produção, representam uma fonte de material genético promissora para entender os mecanismos ligados à eficiência e competitividade de *B. japonicum*. A estirpe SEMIA 5080 (=CPAC 7) foi obtida através de uma subcultura da SEMIA 586, mas é caracterizada

por apresentar boa capacidade competitiva, além de maior nodulação da cultivar IAC-2 (Vargas et al., 1992a; Nishi & Hungria, 1993). A estirpe SEMIA 5079 (=CPAC 15) foi selecionada pelo método de Peres et al. (1984) de um solo na região do Distrito Federal e pertence ao mesmo sorogrupo da SEMIA 566, embora se caracterize por uma maior eficiência de fixação do N_2 (Vargas et al. 1992a,b).

Em relação ao par de estirpes SEMIA 566 e SEMIA 5079, foi observado que esta última diferia da parental no fenótipo Hai, ou seja, maior número de pêlos radiculares (Nishi & Hungria, 1993, 1994), o que poderia estar ligado à maior capacidade competitiva da estirpe (**Tabela 2.9**). Através de estudos com diversos isolados do sorogrupo SEMIA 566 adaptados ao Cerrado, foi sugerido, também, que a competitividade das estirpes dependeria da sua habilidade de alterar as proteínas da membrana em resposta ao estímulo das raízes (Scotti et al., 1993).

Tabela 2.9. Efeito da inoculação da cultivar de soja BR-16 com a estirpe SEMIA 566 e a mutante natural SEMIA 5079 na deformação dos pêlos radiculares (Had, hair deformation) e aumento no número dos pêlos radiculares (Hai, hair induction), aos 15 dias após a inoculação. Em condições estéreis foram também avaliados, aos 30 dias após a emergência, o número e eficiência (por grama de nódulos frescos, gNF) dos nódulos e a porcentagem de nódulos ocupados por essas estirpes, quando inoculadas na proporção 1:1 com a SEMIA 5019*.

Estirpe	Had		Hai	Nº nódulos	Eficiência dos nódulos	Ocupação dos nódulos
	Comprimento (μ)	Espessura (μ)	(nº.campo^{-1})	(nº.planta^{-1})	(mgN.g^{-1}NF)	(%)
566	62,50 b	23,75 a	50,25 b	49,38 a	28,76 b	52,10 b
5079	50,00 b	18,75 a	> 100,00 a	34,75 a	52,17 a	87,50 a
Controle	205,00 a	10,00 b	23,75 c	0,00	0,00	0,00
CV (%)	17,18	26,08	12,77	45,08	20,55	19,55

* Médias de quatro repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Na análise estatística dos três últimos parâmetros não foram considerados os valores das plantas não inoculadas. Segundo Nishi & Hungria (1993, 1994).

As estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 têm sido testadas há mais de sete anos nos solos do cerrado, onde promoveram ganhos de rendimento de até 12,5 sacas de soja.ha^{-1} (750 kg.ha^{-1}), em solos de primeiro cultivo, em relação ao tratamento sem inoculação, enquanto que as estirpes recomendadas comercialmente, SEMIA 587 e SEMIA 5019, promoveram aumentos médios de 7 sacas.ha^{-1} (420 kg.ha^{-1}) (Vargas et al., 1992a). A partir de 1992, essas duas estirpes passaram a ser recomendadas para utilização nos inoculantes comerciais brasileiros, mas investigações mais detalhadas sobre essas bactérias precisam ser conduzidas.

Outras "sub-estirpes" mais competitivas do que a parental SEMIA 586 têm sido obtidas após a adaptação em solos de Cerrado corrigido com calagem e inoculação, repetida por vários ciclos de soja, e promoveram um pequeno incremento na nodulação no primeiro ano de cultivo (Neves et al., 1992), o mesmo ocorrendo com sub-estirpes do sorogrupo SEMIA 566 (Scotti et al., 1993). Algumas sub-estirpes do sorogrupo SEMIA 566, isoladas pela EMBRAPA-CPAC, apresentaram alta eficiência e capacidade competitiva (**Figura 2.10**), indicando que a seleção de estirpes "adaptadas" pode resultar em material genético promissor para a soja.

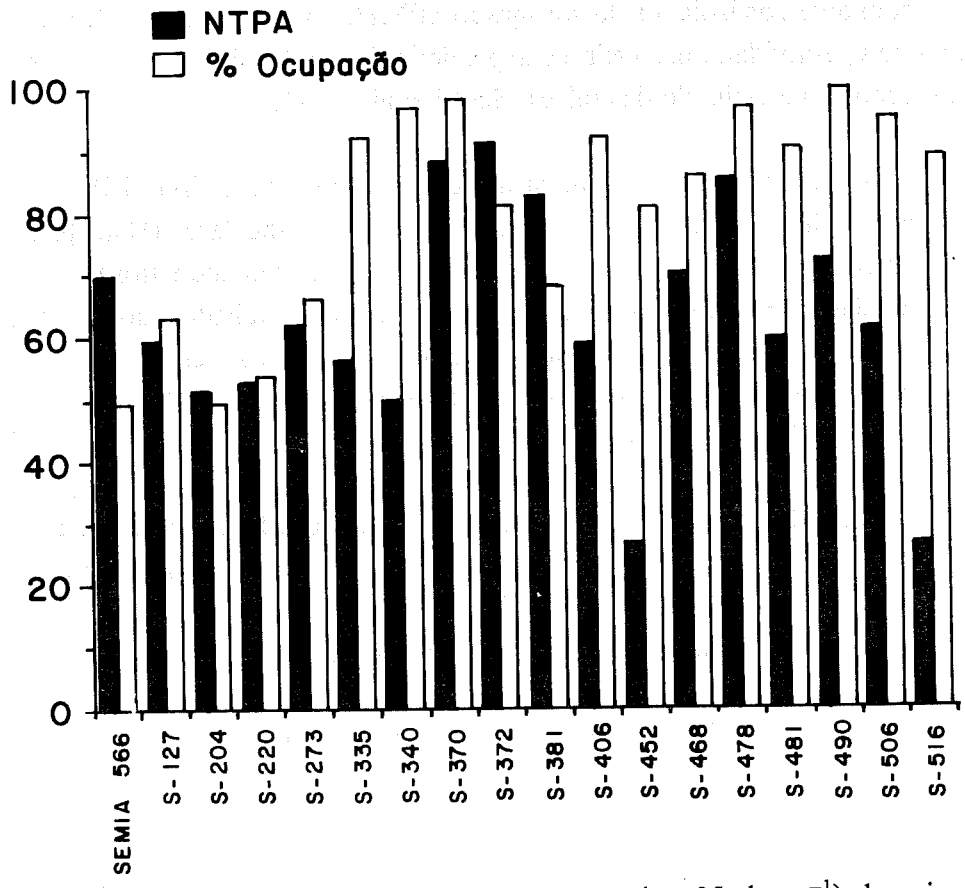


Figura 2.10. N total acumulado na parte aérea (mg N.planta^{-1}) de soja, cultivar BR-16, inoculada com a estirpe SEMIA 566 e vários isolados da região do Cerrado (obtidos na EMBRAPA-CPAC) pertencentes ao mesmo sorogrupo. Os dados representam médias de três repetições. Segundo Boddey & Hungria (1994b).

Hoje, a recomendação das melhores estirpes para a cultura da soja é feita a cada dois anos, durante a "Reunião de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*" (RELARE), que ocorre por iniciativa de pesquisadores da área de microbiologia do solo e integrantes das indústrias produtoras de inoculantes. São apresentados, nessa reunião, os resultados de pesquisa relativos às estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, em diversas leguminosas e diversas localidades

do Brasil, geralmente com os mesmos tratamentos e delineamento experimental para cada espécie. Com base nesses resultados, procede-se à recomendação nacional das estirpes e a ata da reunião segue para o Ministério da Agricultura. As indústrias de inoculantes passam a receber essas estirpes e se comprometem a trabalhar somente com elas. A VI RELARE foi realizada em 1994, tendo sido decidido que as estirpes de *Bradyrhizobium,* recomendadas comercialmente para a cultura da soja, são a SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Na **Tabela 2.10** estão listadas as principais características desejáveis em estirpes de *Bradyrhizobium* que devem ser consideradas nos programas de seleção.

Tabela 2.10. Características das estirpes de rizóbio que devem ser consideradas durante os processos de seleção para a recomendação em inoculantes comerciais.

1- Capacidade de formar nódulos eficientes, com resultados comprovando o desempenho a campo.
2- Habilidade competitiva contra as estirpes naturalizadas do solo.
3- Tolerância aos defensivos agrícolas recomendados, temperaturas elevadas, deficiências hídricas, etc
4- Amplo espectro de nodulação frente às cultivares recomendadas.
5- Capacidade de sobreviver no solo durante o ciclo da cultura, para permitir a formação de novos nódulos.
6- Baixa capacidade de sobrevivência no solo após o término da cultura, pois se a pesquisa posteriormente encontrar estirpes mais eficientes, essas poderão ser introduzidas nesses solos.
7- Boas condições de crescimento a nível industrial, apresentando baixas exigências nutricionais e ausência de características que possam dificultar a produção de inoculantes.
8- Boa sobrevivência durante a distribuição e uso pelos agricultores.

2.10. Genótipos de Soja

2.10.1. Genótipos mais eficientes

Durante muitos anos, grande atenção foi dada ao estudo do microssimbionte, pela maior facilidade e rapidez de manipulação e porque as bactérias carregam os genes responsáveis pela dinitrogenase. No caso de simbioses mais problemáticas, como a do feijão, há programas de melhoramento para obtenção dos genótipos para a fixação do N_2 e teste dos mesmos em rede nacional. No caso da soja, porém, embora os programas brasileiros de melhoramento tenham sido tradicionalmente conduzidos na ausência de adubos nitrogenados, poucas avaliações do potencial de fixação do N_2 estão sendo realizadas.

As características do genoma da soja, com 1 bilhão de pares de base por genoma haplóide, 10 cromossomos, regiões genômicas duplicadas, 35% de DNA altamente repetitivo, centenas de marcadores genéticos, morfológicos e enzimáticos (Gresshoff, 1993) dão uma indicação do potencial de melhoramento dessa espécie para diversos fatores, incluindo a simbiose. Com a manipulação desse

genoma, já foram conseguidos diversos mutantes, como os não-nodulantes (Nod^-), mutantes com menor nodulação, supernodulantes, hipernodulantes e os que nodulam mas não fixam nitrogênio (Nod^+Fix^-).

Entretanto, já em 1946, Nutman salientava a importância da planta hospedeira no sucesso da fixação biológica do N_2 (Döbereiner & Arruda, 1967) e algumas revisões recentes salientam essa importância (Phillips, 1991; Phillips & Teuber, 1992; Gresshoff, 1993). No Brasil, diferenças entre variedades de soja, na eficiência da simbiose, foram relatadas desde os primeiros estudos conduzidos (Döbereiner & Arruda, 1967).

Mais recentemente, variações entre genótipos brasileiros de soja em resposta à simbiose foram relatadas por Galli (1987) (**Figura 2.11**). Uma análise de 153 genótipos recomendados comercialmente e inoculados com a SEMIA 5019 constatou que a média do grupo mais eficiente superou em mais de 100% a média do grupo menos eficiente (Bohrer et al., 1994) (**Tabela 2.11**). Entre os genótipos mais eficientes, estão algumas das parentais das novas cultivares, como a Davis e a Santa Rosa e, no grupo das menos eficientes, estão algumas cultivares recentemente lançadas, como a BR-28, cujos pais são a Santa Rosa e a BR-7811202. Isso mostra que, embora o melhoramento esteja sendo conduzindo na ausência de adubação nitrogenada, muitas vezes está ocorrendo um declínio na eficiência da simbiose, provavelmente porque vários desses ensaios estão sendo conduzidos em solos ricos em N, o que seria uma pressão contra a fixação biológica.

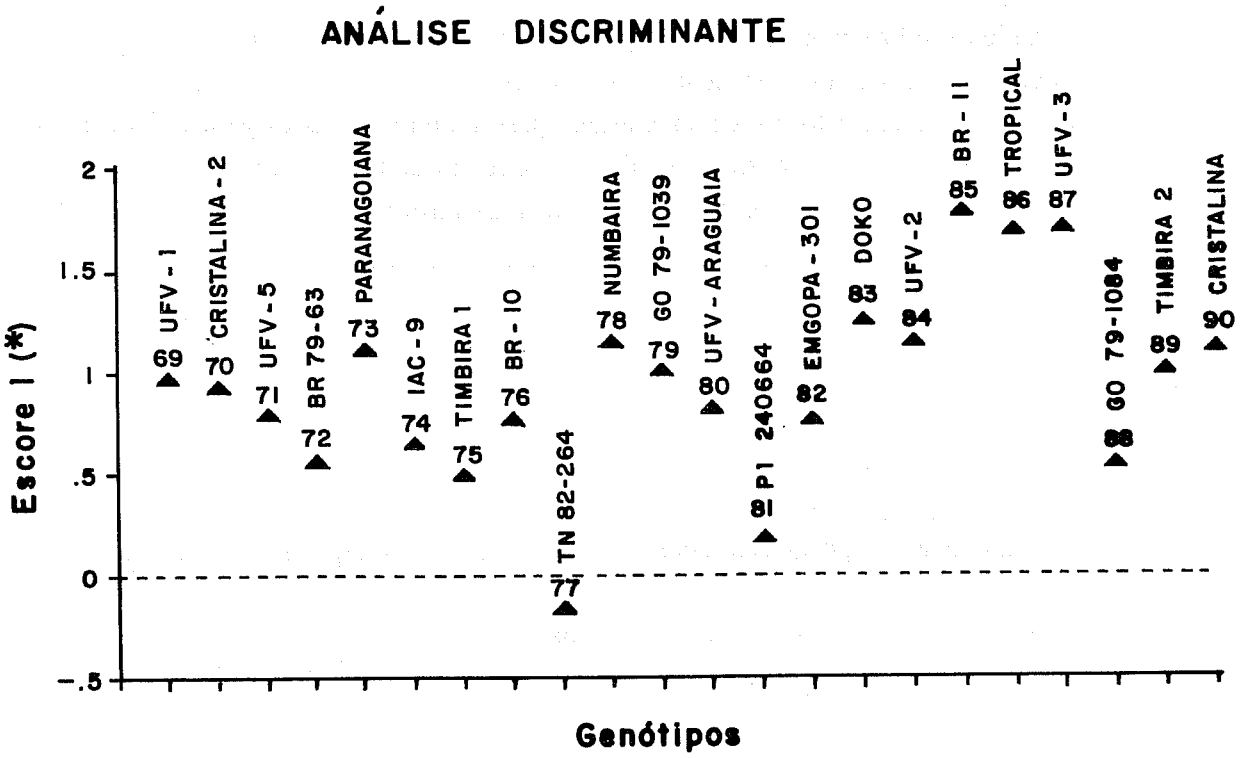


Figura 2.11. Discriminação gráfica dos 22 tratamentos correspondentes aos genótipos tardios de soja submetidos à análise multidimensional (variáveis dependentes: número e massa de nódulos, atividade da nitrogenase e produtividade). Segundo Galli (1987).

Tabela 2.11. Matéria dos nódulos secos (MNS) e N total da parte aérea (NTPA) das 20 cultivares de soja com melhor e pior desempenho quando inoculadas com a estirpe SEMIA 5019 (=29w). Coleta realizada cinco semanas após o plantio, os dados representam médias de três repetições. Segundo Bohrer & Hungria (1994).

Cultivar	**NTPA** (mg N.pl^{-1})	**MNS** (mg.pl^{-1})	**Cultivar**	**NTPA** (mgN.pl^{-1})	**MNS** (mg/pl)
——— Melhores Desempenhos* ———			——— Piores Desempenhos* ———		
IAC-9	76,13 a-d	281,6 abc	BR-7	17,65 d-g	93,4 abc
IAC-8	66,58 a-f	283,4 abc	Doko	31,88 a-g	148,4 abc
IAC-Foscarin	69,07 a-f	288,4 abc	EMBRAPA 9	13,94 fg	70,0 c
FT-14	77,06 a-c	278,4 abc	CAC-1	24,80 a-g	138,4 abc
Davis	68,45 a-g	243,4 abc	OCEPAR 10	25,04 a-g	95,0 abc
Tiaraju	65,77 a-g	230,0 abc	OCEPAR 5	26,79 a-g	166,6 abc
Stuart	71,83 a-f	295,0 abc	EMGOPA-309	17,00 e-g	100,0 abc
Santa Rosa	68,04 a-g	310,0 a	BR-15	29,07 a-g	156,6 abc
GO-BR-25	66,34 a-g	195,0 abc	UFV-9	23,44 a-g	206,6 abc
FT-Bahia	66,21 a-g	276.6 abc	Planalta	20,31 d-g	118,4 abc
FT-20	72,07 a-f	221,6 abc	BR-28	14,48 fg	155,0 abc
BA BR-31	67,71 a-g	283,4 abc	CEP-20	23.66 a-g	146,6 abc
Andrews	71,14 a-f	280,0 abc	BR-35	18,34 c-g	95,0 abc
Bossier	68,87 a-f	273,4 abc	FT-Canarana	23,25 a-g	166,6 abc
FT-Guaíra	66,06 a-g	243,4 abc	UFV-10	22,05 b-g	101,6 abc
Ivaí	79,55 ab	315,0 a	Paranaíba	31,64 a-g	195,0 abc
J-200	81,32 a	298,4 ab	EMGOPA 313	23,63 a-g	151,6 abc
FT-6	74,24 a-d	280,0 abc	Paranagoiana	9,76 g	80,0 bc
MS BR-18	67,23 a-g	275,0 abc	BR-32	17,99 d-g	158,4 abc
EMBRAPA 1	68,04 a-g	255,0 abc	Tropical	28,77 a-g	133,4 abc
Média do Grupo	70,58	270,35		22,17	133,83
CV (%)	32,89	28,52		32,89	28,52

* Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Análise estatística considerando um total de 153 cultivares que foram estudadas.

2.10.2. Solucionando o problema da competitividade através dos genes da planta hospedeira

A maior parte dos estudos de manipulação genética da planta visando a fixação biológica foi conduzida nos Estados Unidos, onde o problema de competitividade com as estirpes nativas do solo é grande nas principais regiões produtoras de soja. Os pesquisadores americanos observaram, então, que algumas plantas hospedeiras podem excluir ou conduzir à nodulação ineficaz pelos sorogrupos dominantes no solo.

Já foram relatados quatro genes responsáveis pela restrição à nodulação na soja americana. O gene recessivo rj_1, que resulta no fenótipo de "não-nodulação" com todas as estirpes de *B. japonicum*, foi inicialmente descrito como "não-alelo" (Williams & Lynch, 1954) e, posteriormente, denominado alelo rj_1 (Caldwell, 1966). No campo, os genótipos que carregam rj_1rj_1 formam um nódulo a cada 1000 ou 1500 plantas e, em casa de vegetação sob condições estéreis, formam nódulos ocasionais com algumas estirpes (Clark, 1957; Devine & Weber, 1977; Devine, 1985b). Foi sugerido, então, que manipulações de genótipos contendo rj_1 poderiam permitir a exclusão das estirpes indígenas de *B. japonicum* menos eficientes, mas aceitando estirpes selecionadas ou desenvolvidas especialmente para nodular com esses genótipos (Devine & Weber,1977; Devine, 1985a, b).

O gene Rj_2, encontrado nas cultivares Hardee e CNSS, provoca uma resposta ineficaz com *B. japonicum* USDA 7, USDA 14 e USDA 122. Caldwell (1966) também relatou que Hardee produzia uma nodulação ineficaz com 22 estirpes testadas do sorogrupo 3-23-44, que mais tarde foi designado de sorogrupo c1 (Vest et al., 1973) e, posteriormente, como sorogrupo 6. Nas plantas com esses nódulos, há o desenvolvimento de proliferações corticais ou nódulos rudimentares, em vez de nódulos normais (Caldwell, 1966). Essas plantas, entretanto, nodulam normalmente com outras estirpes, tais como a USDA 110 e USDA 142.

Quanto ao alelo dominante Rj_3, presente na cultivar Hardee, foi relatado que causa nodulação ineficaz com a estirpe USDA 33, pertencente ao sorogrupo 31, embora isso não tenha sido confirmado posteriormente. Ocorrem, também, proliferações do córtex nas raízes sem a formação de nódulos (Vest, 1970; Vest et al., 1973)

Em 1972, Vest & Caldwell (1972) identificaram um gene dominante na cultivar Hill, Rj_4, cujas condições restrigem a nodulação pela estirpe USDA 61 (serogrupo 61). O gene Rj_4 está presente nas cultivares Hill, Dunfield, Dare, Amsoy 71 e Tracy, que também apresentam nodulação ineficaz com as estirpes USDA 61, USDA 62, USDA 83, USDA 94, USDA 238, USDA 259, USDA 260 e USDA 340 (Vest & Caldwell, 1972; Vest et al., 1973; Devine, 1976; Devine et al., 1990). As plantas carregando esse alelo Rj_4 nodulam normalmente com outras estirpes, como a USDA 110.

O uso de respostas de incompatibilidade pode permitir aos melhoristas de soja controlar a especificidade hospedeira da simbiose com estirpes de *B. japonicum* geneticamente melhoradas (Devine & Weber, 1977; Devine & Breithaupt, 1980). Isso é muito importante, visto que é difícil introduzir estirpes melhoradas geneticamente em solos com população já estabelecida. Geneticamente, o melhoramento parece ser facilitado pelo fato de que os genes rj_1, Rj_2 e Rj_4 são distintos em sua segregação devendo, portanto, estar localizados em três locus genéticos diferentes. Conseqüentemente, os melhoristas podem construir genótipos de soja contendo uma ou todas as combinações desse alelos (Devine & O'Neill, 1989).

Outro trabalho foi conduzido por Weiser et al. (1990), que avaliaram 382 genótipos de soja, selecionando 12 que excluíam, em diferentes graus, os sorogrupos relativamente ineficientes encontrados nos solos do região sul dos Estados Unidos. Segundo esses autores, dois tipos de genótipos poderiam ser conseguidos: cultivares com alta produtividade em simbiose com as estirpes nativas, ou cultivares com altas produtividades que conseguiam excluir as estirpes ineficientes do solo.

No caso do Brasil, não foram descritos genes de restrição à nodulação, embora tenha sido relatado que um dos problemas de nodulação no Cerrado fosse a alta especificidade hospedeira da IAC-2, restringindo parcialmente a nodulação a estirpes como a SEMIA 586 e a SEMIA 5039 (**Tabela 2.12**, segundo Peres & Vidor, 1980). Restrição total à nodulação pelos sorogrupos dominantes nos solos brasileiros, SEMIA 566, SEMIA 587 e SEMIA 5019, não foi encontrada em nenhuma das 153 cultivares testadas por Bohrer & Hungria (dados não publicados).

Tabela 2.12. Matéria de nódulos secos (mg.planta^{-1}) de três cultivares de soja em Latossolo Vermelho Escuro do Cerrado inoculadas com quatro estirpes de *B. japonicum*. Segundo Peres & Vidor (1980).

Estirpe	**Cultivar de Soja**		
	Bragg	Santa Rosa	IAC-2
Testemunha s/inoc.	43	5	18
SEMIA 5039	168	154	28
SEMIA 586	151	167	24
965	152	117	112
SEMIA 5019 *	285	314	172

* A estirpe SEMIA 5019 (=29w) foi denominada de "super estirpe", por conseguir se estabelecer nesses solos já no primeiro ano de cultivo.

Pouca atenção tem sido dada atualmente, no Brasil, à especificidade hospedeira, embora estudos conduzidos, já em 1975, tenham mostrado que genótipos de soja poderiam ter preferência por determinados sorogrupos de estirpes (**Tabela 2.13**).

2.10.3. Mutantes tolerantes a teores elevados de N do solo

A fixação biológica do N_2 pode ser retardada se o N residual do solo estiver disponível em níveis elevados (Harper, 1974), situação que se agrava se adubações pesadas forem realizadas na cultura que precede a soja. Alguns estudos foram realizados em culturas hidropônicas tentando selecionar genótipos de soja e estirpes de *B. japonicum* que permitissem um aumento da fixação do N_2 na presença de NO_3^- (Harper & Gibson, 1984; Gibson & Harper, 1985). Esses estudos concluíram que a manipulação do genótipo da planta seria mais fácil do que a manipulação do microssimbionte.

Tabela 2.13. Porcentagem de recuperação de quatro estirpes de *B. japonicum* de nódulos de 12 cultivares de soja após a aplicação de inoculante misto.* Segundo Freire (1977).

Cultivar de Soja	Ocupação dos Nódulos (%)			
	527	532c	566	587
Planalto	25	30	-	45
Bragg	37	33	-	30
Bossier	15	12	-	73
IAS-1	12	15	-	73
IAS-5	38	12	-	50
Santa Rosa	27	25	-	47
Prata	13	38	-	49
Davis	55	10	-	35
IAS-4	34	45	-	21
Hardee	37	9	-	54
Pérola	39	26	3	66
Pampeira	29	5	-	66
Média	30	21	0,25	48

* Ensaio conduzido em Guaíba, RS, 1975.

Alguns grupos de pesquisa iniciaram, então, duas linhas de investigações, visando tentar: 1- obter genótipos que pudessem nodular e fixar N_2 na presença de NO_3^- (Betts & Herridge, 1987; Herridge & Betts, 1988); e 2- obter mutantes que tolerassem a presença de NO_3^- (Carroll et al., 1985a,b; Gremaud & Harper, 1989; Akao & Kouchi, 1992). Carroll et al. (1985a,b) selecionaram mutantes da cultivar Bragg e passaram a denominar essas mutantes de *nts* (nitrate tolerant symbiont), determinando também que o controle ocorria pela parte aérea. Gremaud & Happer (1989) obtiveram mutantes da cultivar Williams e Akao & Kouchi (1992) e conseguiram mutantes da cultivar Enrei.

Embora essas mutantes sejam parcialmente tolerantes ao nitrato e apresentem, além de maior nodulação, maior atividade da redução do C_2H_2 na presença de nitrato (Carroll et al., 1985a; Gremaud & Harper, 1989), tem sido questionado se as mutantes realmente toleram o nitrato (Eskew et al. 1989). Muitas vezes, essas mutantes apresentam número de nódulos duas a quatro vezes superior ao da parental, tanto na ausência como na presença de NO_3^-, mas a biomassa produzida em condições de casa de vegetação ou a campo pode ser menor (Carroll et al., 1985a,b; Gremaud & Harper, 1989; Wu & Harper, 1991). Mais detalhes de estudos recentes sobre o locus *nts* podem ser obtidos na revisão de Gresshoff (1993).

2.10.4. Nodulação com estirpes de crescimento rápido

Desde 1982, quando foram isoladas algumas estirpes de crescimento rápido de solos e nódulos de soja coletados na China (Keyser et al., 1982), diversos estudos vêm sendo conduzidos procurando estudar a compatibilidade dessas estirpes com os genótipos de soja americanos (Devine 1984, 1985a). De um modo geral, as linhagens norte americanas não nodulam com essas estirpes, enquanto que nas linhagens de origem asiática (como as da Rússia, Coréia, China, Japão, Tailândia, Vietnã, Malásia, Indonésia) a freqüência de nodulação efetiva varia de 38% a 85% (Devine, 1985a).

A nodulação da soja com estirpes de crescimento rápido pode auxiliar, no futuro, a solucionar o problema de competitividade, visto que essas estirpes podem se estabelecer rapidamente nos solos. Além disso, as manipulações genéticas dessas estirpes são mais fáceis, pois a informação genética está localizada em plasmídeos, mais acessíveis do que os genes do cromossomo.

Três estratégias têm sido sugeridas para habilitar a nodulação dessas cultivares com estirpes de crescimento rápido. A primeira linha sugere manipulações genéticas do *Rhizobium* que permitam a nodulação a todas as cultivares melhoradas de soja (Chatterjee et al., 1990). Uma segunda linha sugere manipular as cultivares modernas, desde que a nodulação com estirpes de crescimento rápido é controlada por um único alelo dominante (Devine, 1984). Finalmente, é possível selecionar estirpes, como a USDA 191, capazes de nodular e fixar N_2 com cultivares melhoradas e não melhoradas (Scholla & Elkan, 1984; Lin et al., 1987).

Em trabalhos conduzidos recentemente, porém, foi observado que um grande número de genótipos de soja norte-americanos é capaz de nodular com *R. fredii* (Balatti & Pueppke, 1992) e, em uma avaliação de 80 cultivares brasileiras com três estirpes de crescimento rápido, Chueire & Hungria (1994) constataram nódulos eficientes em 66% dos genótipos. O potencial de fixação da soja com essas estirpes merece atenção.

2.10.5. Cultivares "promíscuas"

Quando a soja é cultivada pela primeira vez nas Américas, Europa ou partes da África, não ocorre nodulação, pois as cultivares modernas, que vieram da China e foram melhoradas, principalmente, na América do Norte, derivaram de uma base genética estreita e são restritas em sua nodulação. O mesmo aconteceu com as estirpes de *Bradyrhizobium*, que foram introduzidas nos Estados Unidos vindas do Japão e também tiveram uma base genética estreita.

Entretanto, em alguns países em desenvolvimento, como na Nigéria e outros países da África, a disponibilidade e conservação dos inoculantes é um fator limitante à simbiose. Foram então desenvolvidos programas que identificaram linhagens de soja capazes de nodular com rizóbio nativo. No Brasil, porém, é pensamento dos rizobiologistas que inoculantes de boa qualidade devam estar disponíveis em qualquer local do país. Para maiores detalhes sobre essas linhagens promíscuas, consultar revisão de Cattelan & Hungria (1994).

2.11. Ontogenia e Taxas de Fixação Biológica do N_2 em Soja

Na soja nodulada, observa-se normalmente um período inicial de deficiência de N, que ocorre devido à falta de sincronização entre o esgotamento das reservas de N dos cotilédones e o início da fixação e exportação do N_2 fixado pelos nódulos (Hildebrand et al., 1981; Jones et al., 1981; Sprent &

Thomas, 1984). Por isso, muitas vezes se observa um amarelecimento das plantas no início do ciclo vegetativo, por volta de sete a nove dias após a emergência, mas que logo é superado se a simbiose for eficiente. No caso do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), estudos conduzidos com diversas estirpes mostraram que algumas delas conseguem estabelecer nódulos funcionais mais precocemente do que outras, contribuindo para o aumento do período ativo de fixação do N_2 (Hungria & Thomas, 1987; Barradas & Hungria, 1989; Barradas et al., 1989); é possível que essa seleção também seja viável para a soja.

Em condições de campo, a fixação biológica do N_2 pode iniciar já na segunda semana após o plantio. Vargas et al. (1982a,b) observaram que os primeiros nódulos podem ser detectados aos cinco dias após a emergência das plantas, aumentando em número ao redor dos 12 dias após a emergência. Após esse período inicial, a nodulação e a fixação do N_2 intensificam até o florescimento, havendo então a manutenção da atividade ou mesmo um incremento até a formação das vagens, quando inicia a senescência dos nódulos (Franco et al., 1978; Carmen C. et al., 1984). Na época do florescimento, uma planta de soja bem nodulada deve mostrar, no campo, entre 15 e 30 nódulos ou 100 mg a 200 mg de matéria de nódulos secos por planta (Vargas & Suhet, 1980a,b; Vargas et al., 1982a; Cattelan & Hungria, 1994). Muitas vezes, pode ocorrer uma população secundária de nódulos após o florescimento, que contribuirá para o fornecimento de N para as vagens (Franco et al., 1978). A ontogenia da nodulação e acúmulo de N total em soja, cultivar IAC-2, pode ser observada na **Figura 2.12**.

Durante vários anos, essa queda na atividade da dinitrogenase, após o florescimento, era atribuída à competição entre nódulos e vagens pelos fotossintatos da planta (revisado em Neves & Hungria, 1987). Hoje, outras hipóteses, como o controle hormonal (Hungria & Neves, 1986; Neves & Hungria, 1987) ou fatores que controlam o suprimento de O_2 na zona bacteroidal, afetando a disponibilidade de ATP (Hartwig et al., 1987; Vessey et al., 1988; Layzell & Hunt, 1990; Layzell et al., 1990) são considerados mais importantes. Ainda há discussões sobre os fatores fisiológicos e genéticos que seriam responsáveis pelo início da senescência dos nódulos, que também inicia logo após o florescimento, justamente no período de maior demanda de N pelas plantas (Sutton, 1983; Neves & Hungria, 1987). No caso do feijão, algumas estirpes de rizóbio e algumas cultivares permitiram um prolongamento na atividade dos nódulos (Hungria & Franco, 1988; Barradas et al., 1989; Boddey & Hungria, 1990), sendo provável que também exista variabilidade entre estirpes de *B. japonicum* e cultivares de soja em relação à senescência dos nódulos, o que ainda não foi investigado.

2.12. Avaliação da Fixação do Nitrogênio

Segundo estimativas da FAO (1985), as taxas de fixação do N_2 na cultura da soja se situam entre 60 kg a 168 kg de $N.ha^{-1}$. Há levantamentos com valores de 57 kg a 94 kg de $N.ha^{-1}$ (Burns & Hardy, 1975), 40 kg a 206 kg de $N.ha^{-1}$ (Franco, 1978) e 26 kg a 188 kg de $N.ha^{-1}$ (Giller & Wilson, 1991). Há relatos, também, de que o N proveniente da fixação biológica contribuiria com 57% a 67% do N total acumulado pela soja (Carmen C. et al., 1984; Bergersen et al., 1985). No Brasil, em estudos realizados por Boddey et al. (1984, 1990), as taxas de fixação encontradas para a soja foram de 109 kg a 250 kg de $N.ha^{-1}$, representando de 70% a 85% do N total acumulado pelas plantas.

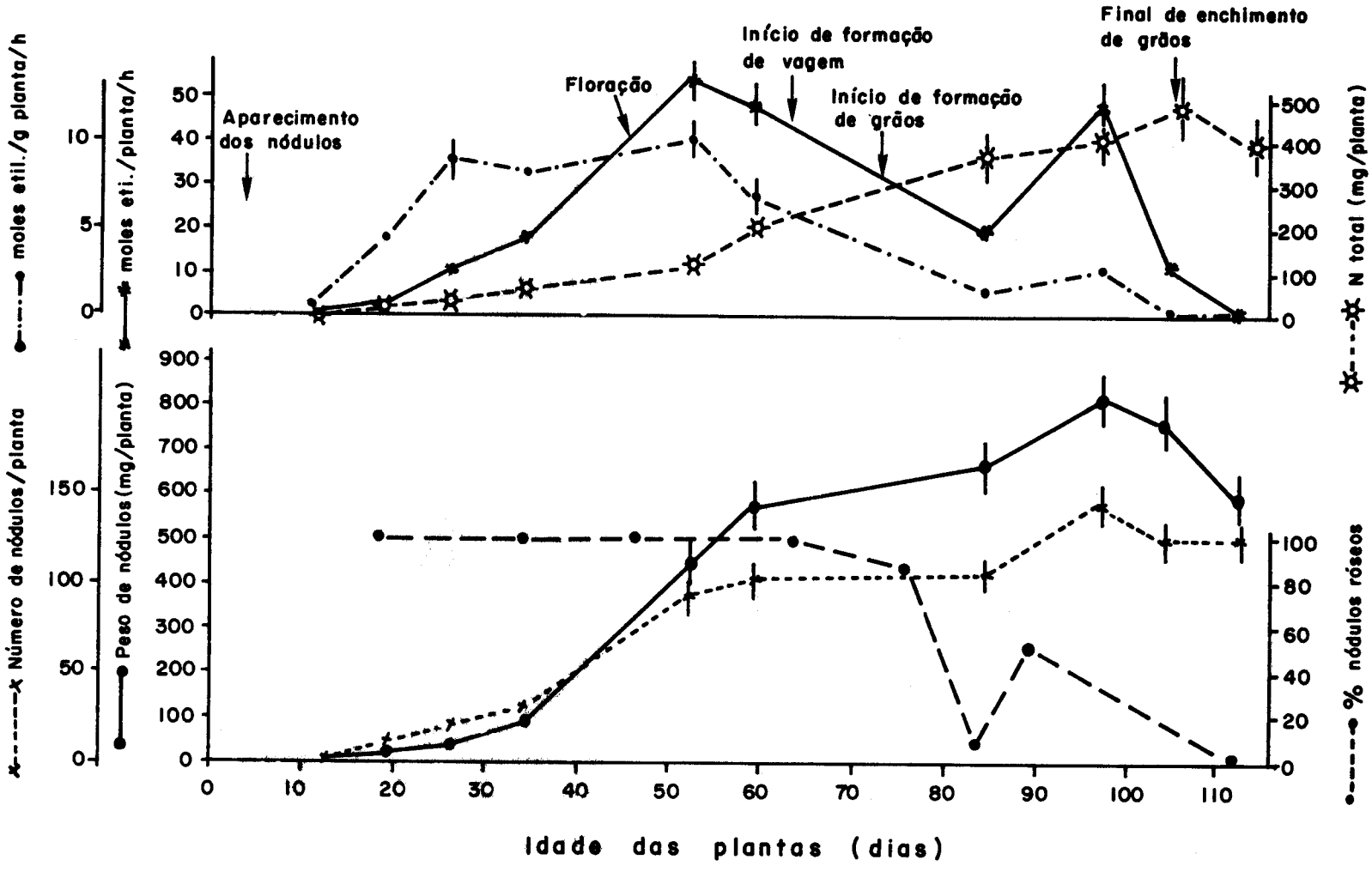


Figura 2.12. Nodulação e fixação de N_2 em diferentes estádios de desenvolvimento da soja IAC-2 em solo de primeiro cultivo; onde cada ponto representa a média de quatro tratamentos com três repetições, e as barras verticais representam o erro da média calculado em cada ponto. Segundo Vargas et al.(1982a).

Diversos métodos podem ser utilizados na avaliação da eficiência do processo de fixação biológica do N_2, e a escolha dependerá do tipo de estudo ou interesse considerado. Para o agricultor ou extensionista, uma avaliação da nodulação a campo aos 10 a 15 dias após a emergência é geralmente recomendada. Nesse estádio, em solos com baixos teores de N, a soja bem nodulada deve apresentar de quatro a oito nódulos. Caso contrário, um acompanhamento deve ser feito e, se após uma semana novos nódulos não tiverem sido observados e se as plantas apresentarem sintomas visuais de deficiência de N, pode-se recomendar a aplicação de fertilizantes nitrogenados.

Estudos com 153 cultivares de soja mostraram que 90% da nodulação ocorre na região da coroa ou colo da raiz principal (Bohrer et al., 1994). A ausência de nódulos na coroa e o aparecimento de nódulos nas raízes secundárias, particularmente na parte inferior do sistema radicular, indica que a nodulação ocorreu tardiamente. As causas da inibição da nodulação primária incluem solos com teores de N elevados, temperaturas elevadas, estresse hídrico, má qualidade do inoculante e falhas durante a inoculação, como a exposição do inoculante a temperaturas elevadas.

A nodulação com estirpes eficientes pode ser facilmente visualizada pela distribuição na coroa, tamanho de 2-3 mm e coloração interna rósea dos nódulos, relacionada à presença de leghemoglobina ativa (**Figura 2.13**). A coloração verde das plantas, no florescimento, também pode ser um indicativo de boa eficiência da simbiose. Um parâmetro importante, em termos econômicos, é o da produção de grãos. O início da senescência dos nódulos pode ser detectado pela mudança da coloração interna dos nódulos, que muda de rósea para verde, pela degeneração da leghemoglobina. Normalmente a senescência inicia entre o florescimento e o período de enchimento das vagens; se ocorrer antes disso, provavelmente, algum fator ambiental ou nutricional acelerou o processo.

Figura 2.13. Nódulos de soja mostrando coloração interna rósea, devido à leghemoglobina.

Nos trabalhoss de pesquisa, outros métodos são utilizados. Para maiores detalhes, procurar Sprent (1984), Boddey (1987), Giller & Wilson (1991).

Em trabalhos pioneiros, conduzidos no Brasil, foi sugerida a avaliação da simbiose pela regressão entre o peso dos nódulos e o N total das plantas, em uma equação representada por NF=bx,

onde o coeficiente de regressão b representava a eficiência do tecido nodular e x o peso dos nódulos (Döbereiner, 1966; Döbereiner et al., 1966, 1970). Na avaliação de estirpes, por exemplo, as combinações das bactérias classificadas como "normais" apresentaram "b" variando de 0,165 a 0,240, enquanto que os valores de "b" para as "excepcionais" ficavam entre 0,279 a 0,439 (Döbereiner et al., 1970).

Durante muitos anos, o método de redução do acetileno foi usado intensivamente, por ser simples, sensível e rápido (Hardy et al., 1968, 1973). Esse método é baseado no princípio de que muitos compostos contêm a tripla ligação que pode ser reduzida pela dinitrogenase, e que o acetileno, um gás de fácil manipulação e baixo custo, é reduzido pela dinitrogenase, em uma reação teórica de 3:1. Posteriormente, conforme já foi discutido, essa técnica foi corrigida para a porcentagem de elétrons perdida pela evolução do H_2, sendo necessário corrigir a proporção para 4:1 (Schubert & Evans, 1976).

Hoje, porém, o uso da técnica de redução do acetileno não é mais recomendado em estudos envolvendo a simbiose com a soja ou outros sistemas simbióticos. Isso ocorreu após a constatação por Minchin et al. (1983) de que a atividade da dinitrogenase em raízes noduladas e nódulos destacados, caía rapidamente na presença do acetileno, com a redução simultânea na respiração. O declínio é causado pelo aumento da resistência da barreira de difusão de O_2 (**Figura 2.4**) devido ao acetileno. As manipulações da planta, necessárias à técnica de redução do acetileno, como remoção da parte aérea e retirada das raízes e nódulos, também causam uma queda drástica na redução do acetileno, que varia com a estirpe de rizóbio e com o genótipo da planta (Minchin et al., 1986). O método de redução do acetileno, porém, pode ser utilizado para demonstrar que os nódulos estão ativos e para análises rápidas e numerosas. Na EMBRAPA-CPAC, por exemplo, tem sido conduzido um programa de seleção de sub-estirpes mais eficientes pela avaliação da atividade de redução do acetileno em nódulos individuais (**Figura 2.14**). Quando os isolados dos nódulos com atividade mais elevada foram inoculados em plantas, eles permitiram maior acúmulo de N total (Peres et al., 1984). Em estudos fisiológicos, têm-se utilizado câmaras de incubação com fluxo contínuo em sistemas não perturbados (Layzell, 1993).

Em casa de vegetação, em substrato livre de N-mineral, a análise do N total nos dá a quantidade de N_2 que foi fixada, tendo-se que excluir o N adicionado pelo inóculo e pelas sementes. Mas, quando outras fontes de N estão disponíveis, como fertilizantes ou N da matéria orgânica, o balanço de N total e as técnicas com ^{15}N, incluindo abundância natural, valor "A" e diluição isotópica e o uso de $^{15}N_2$ são muito utilizadas. Algumas restrições, porém, precisam ser consideradas, como o custo elevado das análises, a escolha correta da planta controle, estabilidade no enriquecimento com ^{15}N do solo, etc. (Ruschel et al., 1979; Hardarson et al., 1984; Boddey, 1987; Boddey et al., 1984, 1990; Giller & Wilson, 1991).

O uso da porcentagem de N como ureídos, como um método indireto de quantificação, também tem sido empregado (Herridge, 1982; van Berkum et al., 1985) e o teor de clorofila nas folhas pareceu ser um método promissor (Mirza et al., 1990), embora testes com cultivares e estirpes brasileiras não tenham mostrado correlação significativa (Nishi & Hungria, 1993; Boddey & Hungria, 1994b; Bohrer et al., 1994).

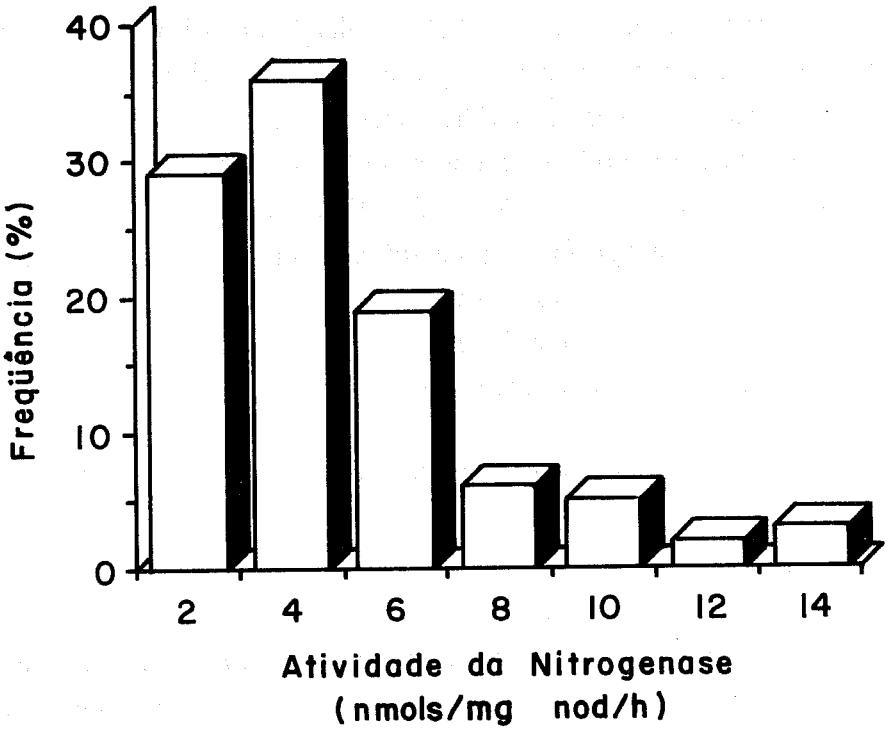


Figura 2.14. Variabilidade nas taxas de fixação do N_2 entre isolados de uma mesma estirpe de *B. japonicum*. Segundo Peres et al.(1984).

2.13. Inoculantes

2.13.1. Métodos de inoculação

Pode-se dizer que a inoculação já ocorria no início do século passado, quando o transporte de terra de alfafais já estabelecidos, na Inglaterra, era realizado para as novas áreas onde se desejava introduzir essa leguminosa. Na primeira metade deste século, teve início a produção de inoculantes em agar, mas devido à fragilidade da embalagem, à necessidade de manutenção em baixa temperatura e à pouca durabilidade do produto, sua difusão ficou limitada. Somente no final da década de 20, com o uso da turfa como veículo para o inoculante, houve um incremento na utilização desse insumo.

Hoje, os inoculantes para a soja são normalmente preparados em turfa, que é previamente corrigida para pH 6,5 a 7,0. O prazo de validade dos inoculantes no Brasil é de seis meses, pois como a turfa utilizada não é desinfestada, o número de células de rizóbio viáveis decresce drasticamente. Na VI RELARE foi decidido que, a partir de julho de 1996, os inoculantes brasileiros terão que ser comercializados em turfa desinfestada. Com isso, o número de células viáveis poderá ser maior, bem como o tempo de comercialização.

Outros veículos de inoculação têm sido testados, como óleo diesel, óleo mineral e querosene, mas não se mostraram eficientes (Faria et al., 1985; Peres et al., 1986; Kolling et al., 1990). Diversos

inoculantes líquidos, baseados em um meio mínimo de crescimento, ou com células liofilizadas, estão entrando no mercado brasileiro, mas ainda não há resultados conclusivos de pesquisa sobre o seu desempenho (**Tabela 2.14**).

Tabela 2.14. Nodulação durante o estádio vegetativo e rendimento de grãos em resposta a adesivos e tipos de inoculantes para a cultura da soja, em um solo sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*, em Viamão, RS. Segundo Kolling et al. (1990).

Tratamento	**Nodulação*** (mg.planta^{-1})	**Rendimento*** (kg.ha^{-1})
Sem inoculação	9 e	505 e
——— Adesivos para Inoculante Turfoso ———		
Inoc. com água	147 de	2164 bc
Inoc. com água no dia anterior à semeadura	438 bc	3164 a
Inoc. com solução açucarada a 20%	555 ab	3267 a
Inoc. com solução açucarada a 20% no dia anterior	691 a	3533 a
Inoc. com óleo mineral	105 e	2064 c
Inoc. com óleo queimado	358 bcd	2902 ab
——— Outros Tipos de Inoculante ———		
Oleoso inoculado no dia anterior	18 e	924 e
Líquido	246 cde	2976 ab
Líquido no dia anterior	238 cde	2879 ab

* Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

A inoculação a seco não apresenta bons resultados, devido à aderência fraca do inoculante às sementes, sendo recomendado o uso de alguns produtos misturados à água para aumentar a adesão da turfa às sementes. Boa adesividade tem sido conseguida com solução açucarada, que hoje é recomendada na concentração de 25% (Vargas & Suhet, 1990b), mas a goma arábica, produtos industriais como metil-etilcelulose e metil-hidroxipropil-celulose e gomas preparadas à base de polvilho de mandioca, polvilho de araruta ou farinha de trigo podem ser empregadas com sucesso (Faria et al., 1985). Com os adesivos, outros produtos, como calcáreo, fosfato de rocha e micronutrientes podem ser aplicados e formam um pelete, colocando esses materiais perto das sementes e aumentando a nodulação nos casos em que esses nutrientes se fazem necessários (De-Polli & Döbereiner, 1974; De-Polli et al., 1979; Vargas & Suhet, 1980b).

2.13.2. Efeito dos defensivos agrícolas

O tratamento das sementes com fungicidas e pesticidas pode matar as células do rizóbio. De-Polli et al. (1986) fizeram uma revisão extensiva sobre os efeitos de diversos defensivos agrícolas na fixação biológica do N_2. De um modo geral, fungicidas à base de metais pesados, como o zinco, cobre

e chumbo, não deveriam ser usados devido à sua toxicidade. Como o tratamento de sementes é essencial em muitos locais tradicionalmente plantados com a soja, os produtos são anualmente testados e aqueles listados, na recomendação anual para a cultura na Região Central e na Região Sul, causam pouca ou nenhuma toxicidade ao rizóbio.

De um modo geral, os herbicidas são menos tóxicos do que os fungicidas, mas a maioria dos inseticidas organoclorados e alguns organofosfatados prejudicam a nodulação, embora os defensivos contra nematóides, geralmente, não prejudiquem a nodulação (De-Poli et al., 1986; Cattelan & Hungria, 1994).

2.13.3. Métodos de inoculação recomendados no Brasil

O método de inoculação recomendado hoje compreende as seguintes etapas: 1- dissolver 250 g de açúcar cristal (13 colheres de sopa) em um litro de água (em lugar do açúcar pode-se utilizar goma arábica a 20% ou uma celulose substituída a 5%, de qualquer marca comercial); 2- misturar 500 ml dessa solução com 500 g de turfa; 3- misturar com 50 kg de sementes ou 400 g por saco de 40 kg (alternativamente, pode-se misturar a solução açucarada às sementes e imediatamente, para que as sementes não absorvam água, o inoculante; neste caso, deve-se decrescer a proporção a 250 ml de solução açucarada para 500 g de inoculante); 4- utilizar tambor rotatório; 5- espalhar as sementes com o inoculante em camadas de 10 cm a 30 cm sobre uma superfície seca, à sombra; 6- deixar secar por algumas horas; 7- regular a plantadeira para as sementes inoculadas; e 8- semear no mesmo dia ou no máximo após quatro dias, desde que as sementes fiquem em ambiente fresco e protegidas do sol.

A proporção de 500 g de inoculante: 50 kg de semente (ou 400 g: 40 kg de semente) é recomendada para a Região Sul, pois os resultados encontrados com essa dose são adequados. Acima de uma dosagem de 750 g, ocorre um decréscimo acentuado na porcentagem de inoculante aderido às sementes, e a nodulação e rendimento de grãos não são beneficiados. A campo, embora os resultados não tenham sido estatisticamente diferentes, a aplicação de 500 g de inoculante, mesmo em um solo com população estabelecida elevada, permitiu um aumento no rendimento de 519 $kg.ha^{-1}$ (**Tabela 2.15**).

No caso da região do Cerrado, particularmente em área de primeiro cultivo da soja, a produção de grãos responde a uma maior dose de inoculante, 1000 g de inoculante/40 kg de semente (Vargas & Suhet, 1980a; Vargas et al., 1992b). Teoricamente, se houver um aumento de 200 g para 1000 g de um inoculante com concentração de 10^8 $células.g^{-1}$, o número de células disponíveis quintuplicará mas, se a concentração de células desse inoculante for aumentada para 10^9, o número de células aumentará dez vezes. Dessa forma, é possível que a dose de inoculante possa ser reduzida pelo uso de maior concentração de células.. Entretanto, mais experimentos precisam ser conduzidos pois, conforme pode ser observado na **Tabela 2.16**, embora o inoculante com maior concentração de células tenha permitido um incremento na ocupação dos nódulos pelas estirpes, o aumento no rendimento dos grãos só foi observado na dose de 1000 g. É necessário investigar se essa dose mais elevada de turfa confere outras vantagens à inoculação, como manutenção da efetividade do rizóbio em condições de temperaturas elevadas ou baixo teor de umidade no solo.

Tabela 2.15. Efeito da dose de inoculante (em g de inoculante:50 kg de semente) na aderência às sementes (% do inoculante que ficou aderido) e na matéria dos nódulos e da parte aérea secas acumulada aos 40 dias após a inoculação de soja, cultivar BR-16*. Segundo Brandão Jr. & Hungria (1994).

Dose do Inoculante	Aderência às Sementes	Vasos Estéreis		Vasos c/Solo		Rendimento de grãos ($kg.ha^{-1}$)
		MNS ($mg.pl^{-1}$)	MPAS ($g.pl^{-1}$)	MNS ($mg.pl^{-1}$)	MPAS ($g.pl^{-1}$)	
0	-	-	-	-	-	3089
250	92,18 a	47,60 a	0,51 a	57,70 a	0,87 a	3410
500	88,56 a	34,52 a	0,48 a	75,55 a	1,05 a	3608
750	80,00 b	47,12 a	0,54 a	75,62 a	1,07 a	3024
1000	66,21 c	42,16 a	0,48 a	61,08 a	0,85 a	2911

* Médias de cinco repetições. Valores seguidos pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Tabela 2.16. Efeito de doses do inoculante [g de inoculante.$(40\ kg)^{-1}$ de sementes] contendo as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 na ocorrência dos sorogrupos das estirpes introduzidas e na produtividade da soja em solos do Cerrado com população estabelecida.* Segundo Vargas et al. (1992b).

Dose	Ocorrência dos Sorogrupos nos nódulos (%)		Produtividade de grãos ($kg\ .\ ha^{-1}$)
	5079	5080	
——— inoculante com 10^8 células/g de inoculante ———			
0	15	1	3575
200	15	4	3532
1000	25	11	3943
——— inoculante com 10^9 células/g de inoculante ———			
200	24	12	3528

* Médias de quatro repetições.

Em relação aos adesivos, sem dúvida eles são importantes para garantir a aderência do inoculante às sementes (**Tabela 2.14**). A recomendação da solução açucarada se deve principalmente a essa adesão, permitindo o aumento da nodulação (**Tabelas 2.14** e **2.17**). Alguns resultados de pesquisa mostraram que, até oito dias após a inoculação das sementes, a viabilidade do inoculante foi mantida (**Figura 2.15**, Peres et al., 1986) mas, por segurança, recomenda-se que esse prazo não ultrapasse quatro dias.

Tabela 2.17. Efeito da adição de água e solução açucarada a 25% na aderência do inoculante às sementes (% do inoculante que ficou aderido) e na matéria dos nódulos e da parte aérea seca acumulada aos 40 dias após a inoculação de soja, cultivar BR-16*.

Dose do Açúcar	Aderência às Sementes	Vasos Estéreis		Vasos c/Solo		Rendimento de grãos	
		MNS ($mg.pl^{-1}$)	MPAS ($g.pl^{-1}$)	MNS ($mg.pl^{-1}$)	MPAS ($g.pl^{-1}$)	Virgem ($kg.ha^{-1}$)	Cultivado ($kg.ha^{-1}$)
Testemunha s/inoculação	-	-	-	-	-	2621	4262
Inoc.+água	41,00 b	28,11 b	0,28 a	37,60 b	0,97 a	3648	4424
Inoc.+sol. a 25%	80,87 a	41,36 a	0,42 a	52,15 a	1,07 a	3477	3922

* Experimentos conduzidos em vasos com solução nutritiva estéril sem N ou vasos com Latossolo Roxo com 10^5 células de *Bradyrhizobium*.g^{+} de solo. Médias de cinco repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%). Segundo Brandão Jr. & Hungria (1994). O efeito da solução açucarada também foi analisado em experimento a campo em solo do Cerrado virgem e após o cultivo e inoculação. Segundo Vargas et al. (dados não publicados).

Nos casos em que se fizer necessário o tratamento de sementes, deve-se: 1- misturar as mesmas com a solução açucarada, utilizando-se 250 ml de solução (25%) a 50 kg de sementes; 2- adicionar, a seguir, o fungicida; 3- aplicar 500 g de inoculante (ou 1000 g, no caso da Região Central); 4- deixar secar à sombra por algumas horas; e 5- semear no mesmo dia e, caso isso não seja possível, repetir a inoculação no dia do plantio.

Hoje já existem máquinas no mercado que permitem a inoculação com turfa simultaneamente com o tratamento de sementes, com um rendimento de 60 $sacas.hora^{-1}$ e dispensando a secagem. Com essa facilidade, certamente mais agricultores passarão a adotar essa prática.

2.13.4. Cuidados com o inoculante e com a inoculação

Para que a inoculação seja bem sucedida é necessário, primeiramente, que o inoculante apresente um número elevado de células viáveis. De acordo com a legislação atual, esse número é de 10^7 $células.g^{-1}$ de inoculante na hora do uso. Além disso, alguns cuidados básicos devem ser tomados, como: 1- não utilizar inoculante com prazo de validade vencido; 2- ao adquirir o inoculante, certificar-

se de que o produto estava conservado em condições satisfatórias e, após a aquisição, conservá-lo em lugar fresco e arejado até o momento da utilização. Em relação à inoculação, deve-se, ainda: 1- fazer a inoculação à sombra e, preferencialmente, pela manhã; 2- interromper a semeadura quando o depósito de sementes aquecer em demasia, pois altas temperaturas matam as bactérias.

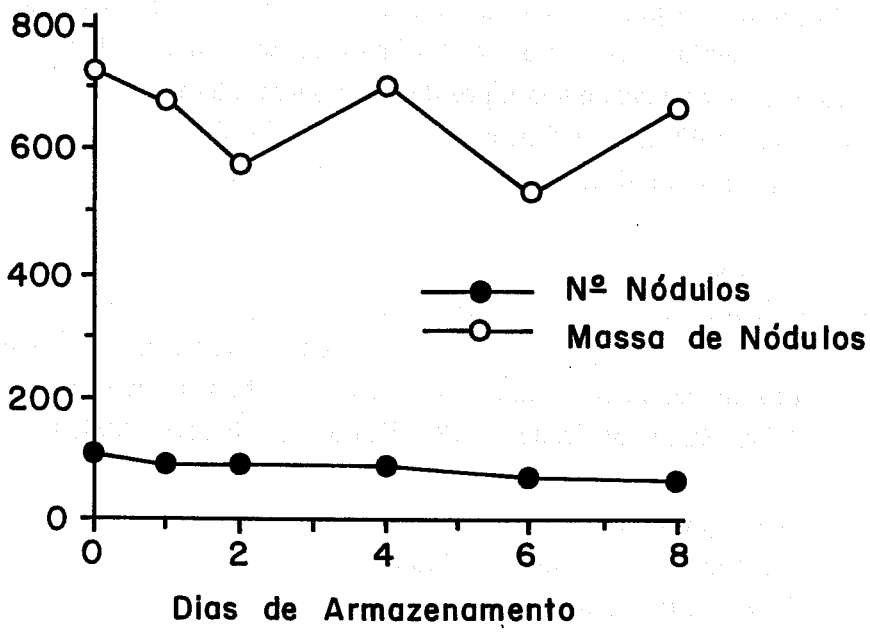


Figura 2.15. Efeito do período de armazenamento de sementes na nodulação de soja IAC-2, inoculadas com as estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587 e utilizando-se uma solução de sacarose a 25%. Segundo Peres et al.(1986).

2.13.5. Fatores ambientais que podem afetar o sucesso da inoculação

As temperaturas elevadas e o estresse hídrico, muitas vezes atuando juntos, são provavelmente os principais fatores ambientais limitantes à fixação biológica do N_2 nos trópicos, afetando a simbiose em todos os estádios.

As temperaturas elevadas podem afetar a sobrevivência das bactérias no solo, a formação de pêlos radiculares e a infecção.Os sítios de nodulação, nas partes mais novas do sistema radicular, são as áreas mais sensíveis no estádio da pré-infecção. Posteriormente, as temperaturas elevadas podem afetar a síntese de leghemoglobina, desnaturar a dinitrogenase, acelerar a senescência dos nódulos, reduzir a atividade das enzimas que assimilam a amônia resultante da fixação do N_2, entre outros. Também há os efeitos adversos causados por alterações na planta hospedeira afetando, particularmente, a fotossíntese (Sprent, 1984; La Favre & Eaglesham, 1986b, 1987; Giller & Wilson, 1991; Hungria et al., 1993; Hungria & Franco, 1993; Neumaier & Nepomuceno, 1994).

Quanto à disponibilidade hídrica, ela é importante para a importação de fotossintatos e exportação dos compostos nitrogenados. Com a deficiência hídrica, ocorre o acúmulo de compostos nitrogenados nos nódulos podendo desnaturar a dinitrogenase. Com o excesso hídrico, diminui o oxigênio para os nódulos, afetando a disponibilidade de energia para o metabolismo (Vincent, 1980; Sprent, 1984).

Os estresses térmicos e hídricos podem ser mais drásticos sob determinadas condições, como solos arenosos ou descobertos. Nessas condições, a irrigação e cobertura morta (Sekhon et al., 1984; Morote et al., 1990) e o sistema de semeadura por plantio direto, que também permite maior cobertura morta (Voss & Sidiras, 1985), podem reduzir o estresse e favorecer a nodulação.

Embora a seleção de estirpes *in vitro* para tolerância a temperaturas elevadas não correlacione, necessariamente, com a tolerância em simbiose (La Favre & Eaglesham, 1986b), há indicações, de que algumas estirpes de *B. japonicum* e genótipos de soja podem tolerar melhor os estresses térmicos e hídricos (Morote et al., 1990; Sall & Sinclair, 1991; Neumaier & Nepomuceno, 1994). Existem, portanto, diferenças genéticas que deveriam ser melhor exploradas.

2.13.6. Fatores nutricionais

As plantas que fixam N_2 são, nutricionalmente, mais exigentes, pois requerem os nutrientes necessários ao hospedeiro, ao rizóbio e ao sistema simbiótico. Neste item, os nutrientes que afetam a simbiose com soja serão apenas mencionados. Para maiores detalhes, diversas revisões podem ser consultadas (Freire, 1977; Munns & Franco, 1982; Borkert & Sfredo, 1994; Cattelan & Hungria; 1994).

Os estudos indicam que a acidez afeta principalmente o estádio de infecção, devido à redução da atividade das enzimas relacionadas com a quebra da parede celular. A acidez também prejudica a sobrevivência do *Bradyrhizobium* e apresenta efeitos indiretos, reduzindo a disponibilidade de cálcio, magnésio, molibdênio e fósforo e aumentando a de alumínio e manganês. Em relação ao microssimbionte, o alumínio e o manganês afetam a divisão das células da bactéria, podem causar mutação do rizóbio, diminuem a sua efetividade e, em relação ao hospedeiro, afetam o desenvolvimento das raízes. O início da nodulação e funcionamento dos nódulos também é afetado, drasticamente, por níveis tóxicos desses elementos (Franco & Döbereiner, 1971; Keyser & Munns, 1979a,b; Munns & Keyser, 1981), mas algumas estirpes de *Bradyrhizobium* e genótipos de soja têm se mostrado tolerantes a essas condições (Döbereiner & Arruda, 1967; Franco & Döbereiner, 1971; Keyser & Munns, 1979b; Asanuma & Ayanaba, 1990; Taylor et al., 1991).

O cálcio afeta o crescimento dos tecidos meristemáticos das raízes, a distribuição de nutrientes, a sobrevivência, a formação de flagelos e o potencial de infecção do rizóbio, além de ser um componente da parede e da membrana celulares. Em solos ácidos, incrementos no rendimento e nodulação têm sido freqüentemente relatados pela prática da calagem (Freire, 1977). Já o magnésio é muito importante para o crescimento da bactéria, estabelecimento e rigidez de seus flagelos, para a atividade da nitrogenase, além de desempenhar um papel importante no metabolismo da planta hospedeira (Freire, 1977; Robinson et al., 1992). O potássio afeta indiretamente a simbiose, pelo metabolismo da planta hospedeira e é importante no transporte dos compostos nitrogenados fixados pela soja, que vão para a parte aérea na forma de alantoato de potássio.

O fósforo, indiscutivelmente, desempenha um papel de extrema importância, tanto no início da formação dos nódulos como pelo fornecimento de energia em todos os estádios da simbiose. Em muitos solos brasileiros, caracterizados pelo baixo teor desse nutriente, adubações fosfatadas aumentam a nodulação e o rendimento da soja (Freire, 1977). Já o enxofre faz parte do complexo da dinitrogenase, além de estar associado com a fotossíntese da planta hospedeira.

Em relação aos micronutrienes, o ferro é componente da dinitrogenase e da leghemoglobina. O molibdênio é componente da dinitrogenase, razão pela qual os sintomas de deficiência desse nutriente se assemelham aos sintomas de deficiência de N. Em alguns solos, onde ocorre deficiência de molibdênio, a liberação do micronutriente pela calagem ou a fertilização pode aumentar significativamente a fixação de N_2 e a produtividade de soja (Ruschel & Eira, 1969; Lantman et al., 1989). O cobalto também é essencial para as plantas que fixam N_2 e os principais efeitos do boro, cobre e zico são indiretos, pelo metabolismo da planta hospedeira.

O nitrogênio mineral inibe o processo de fixação do N_2. Pode-se citar que alguns estudos identificaram como fator inibitório a preferência da planta pelo N mineral devido ao menor gasto energético para a sua assimilação, inibição via auxinas, inibição da síntese e atividade da dinitrogenase, aumento na resistência à difusão de oxigênio nos nódulos, formação do composto nitrosil-leghemoglobina, que inibe a síntese e atividade da leghemoglobina, entre outros (Minchin et al., 1981; Sprent, 1984; Kanayama & Yamamoto,1991; Layzell et al., 1993).

A aplicação de adubos nitrogenados na cultura da soja não é justificável, pois mesmo em áreas recém-desbravadas dos Cerrados, onde são incorporadas grandes quantidades de resíduos vegetais (26 $t.ha^{-1}$) com alta relação C/N, não se observaram respostas à aplicação de até 30 kg de N. ha^{-1} (Vargas et al., 1982b). Levantamentos de literatura mostram que 57% a 83% do N total acumulado pela soja é proveniente da fixação biológica do N_2, havendo um decréscimo para 18% a 32%, após a fertilização com 200 kg de $N.ha^{-1}$, sem qualquer aumento na produtividade (Cattelan & Hungria, 1994). Alguns resultados sobre o efeito da adubação nitrogenada no rendimento da soja estão resumidos na **Tabela 2.18**. Não é comprovado, também, que uma dose "de arranque" ("starter") de N, recomendada por alguns pesquisadores, traga qualquer benefício às plantas (Barni et al., 1977; Vargas et al., 1992a). A recomendação nacional para a cultura da soja, hoje, é de que não se aplique qualquer fonte de fertilizante nitrogenado e somente quando for mais fácil obter fórmula de adubo que contenha N, essa poderá ser utilizada, desde que não sejam aplicados mais do que 20 kg de $N.ha^{-1}$ e que isso não reflita em aumento nos custos para o agricultor.

2.13.7. Inoculação sob condições adversas

Se algum produto tóxico tiver de ser adicionado às sementes, pode-se aplicar maior dose de inoculante ou então adicionar sementes inviáveis, não tratadas, ou partículas inertes de tamanho e peso similar ao da soja (De-Polli et al., 1986). Em alguns casos, realiza-se a inoculação do solo em forma granulada, turfa ou líquido, mas o inoculante não pode ser misturado com o adubo, pois a salinidade é prejudicial ao rizóbio. As vantagens desses métodos incluem a separação de produtos tóxicos que possam estar cobrindo as sementes, mas a maior desvantagem é o custo, desde que mais inoculante precisa ser adicionado.

No caso do insucesso da inoculação da soja, em solos sob vegetação de cerrados no primeiro ano de cultivo, Peres et al. (1989) conseguiram estabelecer as estirpes desejáveis pela inoculação do arroz, que é a cultura que precede à soja. Resultados semelhantes foram obtidos por Diatloff (1969), que estabeleceu estirpes de *B. japonicum* pela inoculação de sementes de cevada, e por Gaur et al. (1980), que estabeleceu *Bradyrhizobium* sp. pela inoculação do milho. Nos cerrados, a inoculação através do arroz permitiu o estabelecimento das estirpes e um incremento no rendimento da soja de 983 $kg.ha^{-1}$ (**Figura 2.16**).

Tabela 2.18. Efeito de doses de adubação nitrogenada no rendimento dos grãos de soja em solos da região do Cerrado e do Paraná.

Região	Cultivo	Cultivar	Estirpe	Dose (kg de N.ha^{-1})	Produção (kg.ha^{-1})	Instituição	Ano	Referência
Cerrado	1° ano	IAC-2	5019+587	0	1921	CPAC	1979/80	Vargas et al. (1982c)
				10	1963			
				20	2039			
				30	2023			
Cerrado	2° ano	Paraná	5019+587	0	2190	CPAC	1977/78	Vargas et al. (1982c)
				150	2034			
Cerrado	2° ano	Sta. Rosa	5019+587	0	2817	CPAC	1977/78	Vargas et al. (1982c)
				150	2871			
Cerrado	2° ano	UFV-1	5019+587	0	3443	CPAC	1977/78	Vargas et al. (1982c)
				150	3527			
Cerrado	2° ano	IAC-2	5019+587	0	3356	CPAC	1977/78	Vargas et al. (1982c)
				150	3673			
Paraná	1° ano	Paraná	s/inoc.	0	1974	CNPSo	1979/80	Campo et al. (1982)
			566+587+ 532c	0	2252			
				10	2180			
				20	2175			
				40	2172			
Paraná	1° ano	BR-16	s/inoc.	0	2680	CNPSo	1979/80	Cattelan & Hungria*
			5079+5080	0	2888	CNPSo	1991/92	
			587+5019	0	2747			
			s/inoc.	400	2982			
Paraná	> 2° ano	BR-37	587+5019	0	4268	CNPSo	1992/93	Cattelan & Hungria*
			s/inoc.	400	4039			
Paraná	> 2° ano	BR-16	s/inoc.	0	4009	CNPSo	1992/93	Nishi & Hungria (1994)
			s/inoc.	400	3981			
			5019	0	4400			

* Dados não publicados.

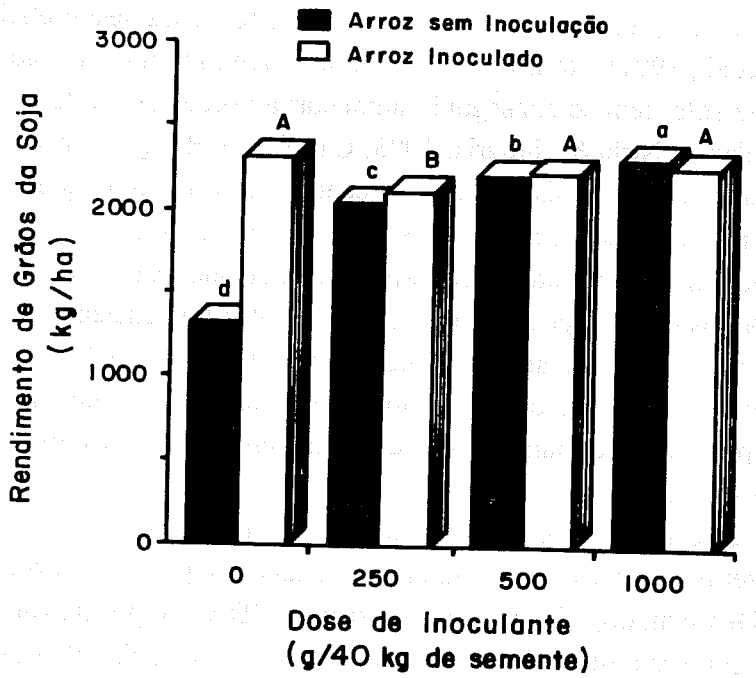


Figura 2.16. Rendimento de soja, cultivar IAC-2, recebendo quatro níveis de inoculante, em área em que o arroz havia sido ou não previamente inoculado com as mesmas doses. O experimento foi conduzido em um latossolo vermelho-amarelo do cerrado sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* e o inoculante foi preparado com as estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587.

2.13.8. Inoculação em solos com população estabelecida

Conforme discutido anteriormente, pouco se sabe sobre as bases genéticas que podem auxiliar na obtenção de estirpes mais competitivas. Deve-se pensar, portanto, em outras alternativas que permitam o estabelecimento das bactérias desejadas. Em relação à vantagem numérica, Weaver & Frederick (1974) verificaram que o número de células bacterianas do inoculante tem que ser pelo menos 1000 vezes superior ao número de bactérias do solo para formar 50% dos nódulos. Usando essa mesma relação de inóculo, porém, Meade et al. (1985) não conseguiram recuperar mais do que 33% de nódulos formados por uma estirpe introduzida de *R. leguminosarum* bv. *viceae*. Em soja, inóculos 1000 vezes superiores à população estabelecida do solo apresentaram resultados que variaram de acordo com a estirpe, com um aumento de 20% para 37% pela inoculação com a SEMIA 5019, enquanto que a inoculação com a SEMIA 566 aumentou a ocupação de 32% para 78% (Nishi & Hungria, 1993).

Há controvérsias, ainda, sobre a possibilidade de aumentar a ocupação dos nódulos em solos com população estabelecida elevada. Resultados encontrados em uma série de experimentos nos Estados Unidos detectaram que populações tão baixas quanto 20 a 50 células de rizóbio/g de solo podem

eliminar a resposta à inoculação, desde que algumas dessas bactérias sejam eficientes (Singleton & Tavares, 1986; Thies et al., 1991). No Estado do Paraná, porém, mesmo em solos com população de 10^5 a 10^6 células.g^{-1} de solo, tem-se conseguido aumentar a porcentagem de ocupação dos nódulos pelas estirpes do inoculante (Nishi & Hungria, 1993; Cattelan & Hungria, dados não publicados).

Também há muita controvérsia sobre a porcentagem de nódulos que uma estirpe eficiente precisa formar para beneficiar o hospedeiro. Thies et al. (1991) observaram que pelo menos 66% dos nódulos da planta precisam ser formados pela estirpe introduzida. Entretanto, em solos do Paraná, uma ocupação de 36% dos nódulos pela estirpe SEMIA 5019 já foi suficiente para permitir um incremento de 419 kg.ha^{-1} em relação ao tratamento recebendo 400 kg de N.ha^{-1} (Nishi & Hungria, 1993). Esses resultados, e outros obtidos também em solos do Paraná, indicam que talvez o número e massa de nódulos formados por uma determinada estirpe sejam mais importantes do que a porcentagem de nódulos ocupados por essa estirpe.

Alguns métodos de inoculação, como a aplicação de um número elevado de células por alguns anos, também podem ser recomendados para auxiliar no estabelecimento de estirpes desejáveis (Triplett & Sadowsky, 1992). Desse modo, a inoculação da estirpe USDA 110 por três anos consecutivos, nos Estados Unidos, permitiu o seu estabelecimento no solo (Duningan et al., 1984), o mesmo acontecendo com uma estirpe para o trevo forrageiro (Martensson, 1990). Doses mais elevadas de inoculante também têm permitido o melhor estabelecimento das estirpes em solos do Cerrado (Vargas & Suhet, 1980a).

Diversos fatores afetam a predominância de uma determinada estirpe no solo, mas em grande parte o estabelecimento está relacionado com as estirpes competitivas inoculadas nos anos anteriores. Na **Tabela 2.19**, estão listadas as estirpes que já foram recomendadas em inoculantes no Brasil, algumas delas altamente competitivas, como a SEMIA 587, que em solos com população estabelecida em Guaíba, RS, permitiu a ocupação de 68% a 77% dos nódulos (Freire, 1977). Na **Tabela 2.20**, estão listados alguns levantamentos mostrando os sorogrupos dominantes em certas regiões do Brasil.

Tabela 2.19. Estirpes utilizadas em inoculantes de soja de 1956 a 1994.*

Ano	**Estirpes** (SEMIA)								
1956	500	504	505	512	513	516	517	519	521
1957	504	505	509	512	513	516	519	521	525
1958	504	505	509	512	515	517	519	534	535
1961	519	521	526	531	534	535			
1962	504	510	513	519	527	531			
1964	504	513	527	531					
1965	504	513	519	532					
1966	532	543	566						
1968-1975	543	566	587						
1976	527	532	566						
1977	527	566	586						
1978	527	532	566						
1979-1991	587	5019							
1992-.....	587	5019	5079	5080					

*De 1956 a 1991 as informações foram compiladas de Freire & Kolling (1991).

Tabela 2. 20. Sorogrupos presentes nos nódulos de soja detectados em levantamentos realizados em diversos locais do Brasil.

Local	Ano	Sorogrupos (%)							Referência	Nº local
		527	532c	566	587	5019	5061	586		
Guaíba, RS	1973	5	37	5	32	n.a.	n.a.	5	Freire (1977)	1
Guaíba, RS	1975	30	21	0,25	48	n.a.	n.a.	n.a.	Freire (1977)	1
Guaíba, RS	1976	8	3	2	77	n.a.	n.a.	n.a.	Freire (1977)	1
Guaíba, RS	1984	n.a.*	1	59	33	6	0	n.a.	Campo**	1
Maquiné, RS	1984	n.a.	0	54	17	19	0	n.a.	Campo**	1
Capinópolis, MG	1990	n.a.	n.a.	21	57	21	n.a	0	Vargas et al. (1992 b)	1
Tupaciguara, MG	1990	n.a.	n.a.	4	48	49	n.a.	0	Vargas et al. (1992 b)	3
Nova Ponte, MG	1990	n.a.	n.a.	43	39	17	n.a.	0	Vargas et al. (1992 b)	1
Perdizes, MG	1990	n.a.	n.a.	0	46	64	n.a.	0	Vargas et al. (1992 b)	2
Sacramento, MG	1990	n.a.	n.a.	14	57	14	n.a.	14	Vargas et al. (1992 b)	1
Uberaba, MG	1990	n.a.	n.a.	0	50	50	n.a.	0	Vargas et al. (1992 b)	1
Tabatinga,DF	1990	n.a.	10	52	10	17	n.a.	0	Vargas et al. (1992 b)	2
Rio Preto, DF	1990	n.a.	5	37	12	31	n.a.	0	Vargas et al. (1992 b)	3
Jardim, DF	1990	n.a.	11	34	18	26	n.a.	0	Vargas et al. (1992 b)	2
PAD, DF	1990	n.a.	7	32	16	26	n.a.	0	Vargas et al. (1992 b)	6
Pipiripau, DF	1990	n.a.	11	14	8	36	n.a.	0	Vargas et al. (1992 b)	1
Cristalina, GO	1990	n.a.	11	17	23	33	n.a.	0	Vargas et al. (1992 b)	1
Vilhena, RO	1990	n.a.	n.a.	68	18	14	n.a.	n.a.	Vargas et al. (1992 b)	2
São Gabriel do Oeste, MS	1990	n.a.	n.a.	63	13	23	n.a.	n.a.	Vargas et al. (1992 b)	1
Maracaju, MS	1990	n.a.	3	51	25	21	n.a.	n.a.	Vargas et al. (1992 b)	1

* Não avaliada.
** Dados não publicados.

2.14. Resultados de Inoculação no Brasil

2.14.1. Solos de primeiro ano de cultivo

Considera-se que os solos do Brasil não possuem *Bradyrhizobium* nativo e, por isso, as respostas à inoculação em áreas não cultivadas são sempre positivas. Graças à tecnologia que permite o cultivo da soja em diversas latitudes, pode-se observar, na Região Norte, que a inoculação em um solo isento de *Bradyrhizobium* resultou em um aumento de rendimento de 239 $kg.ha^{-1}$ para 2533 $kg.ha^{-1}$ (Oliveira et al., 1992).

Nos solos sob vegetação de Cerrado, as respostas à inoculação também são muito significativas no primeiro ano de cultivo (Vargas & Suhet, 1980a,b; Vargas et al., 1982a,b,c,d). Resultados positivos de um experimento conduzido em área do Cerrado podem ser vistos na **Tabela 2.21**. Após sete anos de experimentação com as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080, Peres et al. (1993) observaram ganhos médios de 260 $kg.ha^{-1}$. Também em solos de primeiro ano de cultivo, no Rio Grande do Sul, a inoculação incrementou o rendimento em quase seis vezes (**Tabela 2.14**).

Tabela 2.21. Resposta à inoculação da soja em solo de cerrado no primeiro ano de cultivo.*

Tratamento	Matéria de Nódulos Secos ($mg.planta^{-1}$)	Produtividade ($kg.ha^{-1}$)	N total das Plantas ($kg\ de\ N.ha^{-1}$)
SEMIA 586	46,0 b	1600 a	98,04 a
SEMIA 587	176,2 a	1112 ab	61,83 ab
SEMIA 5019	121,2 a	1228 ab	71,75 ab
5019 + 587	166,2 a	1422 ab	83,46 ab
SEMIA 566 (isolado do cerrado)	204,5 a	1359 ab	75,70 ab
N mineral	0,0	1256 ab	71,23 ab
Sem inoculação	0,0	812 b	45,13 b

* Médias dos resultados obtidos pelas cultivares EMGOPA-301 e Santa Rosa. Adaptado de Oliveira et al. (1991).

2.14.2. Resultados de reinoculação em solos do brasil

Hoje em dia, porém, restam poucas áreas que ainda não foram inoculadas e a população naturalizada dos solos às vezes é muito elevada. A maioria dos produtores de soja não pratica a reinoculação, principalmente pela falta de informações sobre os resultados que podem ser obtidos. Com essa preocupação, desde a safra de 1992/93 os resultados de experimentação, em rede, nacional estão sendo conduzidos em solos com população estabelecida.

No Cerrado, em experimentos conduzidos durante três safras, somente na primeira safra não houve efeito benéfico da reinoculação. Nesses experimentos, pôde-se observar, ainda, o melhor estabelecimento das estirpes SEMIA 5080 e SEMIA 5079 (**Tabela 2.22**), justificando a recomendação dessas estirpes em inoculantes comerciais (Vargas et al., 1992b). Nos três experimentos que tenderam a responder à reinoculação, os ganhos variaram de 80 kg a 291 $kg.ha^{-1}$, correspondendo a um incremento na produtividade de 4 % a 12 %.

Tabela 2.22. Efeito da reinoculação na produtividade da soja e ocorrência dos sorogrupos nos nódulos*. Segundo Vargas et al., 1992b.

Tratamento	Nódulos ocupados pela estirpe introduzida (%)		Produtividade de grãos ($kg.ha^{-1}$)	Nódulos ocupados pela estirpe introduzida (%)		Produtividade de grãos ($kg.ha^{-1}$)
	A**	D**		A**	D**	
	——— 1988/89 ———			——— 1989/90 ———		
Testemunha			1928			3826
5019 + 587	33	25	2074	82	86	3497
5080	0	20	2008	2	51	3598
5079	68	73	2028	19	44	3799
	——— 1990/91 ———			——— 1991/92 ———		
Testemunha			3575			2321
5019 + 587	43	58	3763	94	92	2589
5080	1	24	3705	1	56	2612
5079	15	23	3744	1	57	2511

* Experimentos conduzidos pela EMBRAPA-CPAC durante três safras em solos do Cerrado com população estabelecida. Médias de quatro repetições.

** A = antes da reinoculação e D = depois da reinoculação.

Em um solo no Paraná, com população estabelecida de $2{,}21.10^5$ células.g^{-1} de solo, respostas positivas à inoculação foram obtidas por Nishi & Hungria (1993). No solo em estudo, não havia predominância de nenhum sorogrupo e todas as estirpes introduzidas foram capazes de ocupar, em média, 50% dos nódulos das plantas, representando um incremento de 140% em relação à testemunha não inoculada. Quando o experimento foi instalado na safra seguinte, pôde-se observar que as estirpes introduzidas na safra anterior voltaram aos níveis de ocupação encontrados inicialmente (**Figura 2.17**). Através da reinoculação dessas estirpes, porém, a porcentagem de ocupação dos nódulos novamente aumentou, evidenciando a importância da reinoculação anual da soja, pois somente através dela pôde-se atingir os níveis de ocupação dos nódulos necessários à maximização do processo de fixação do N_2. Em continuação a esse mesmo experimento, pôde-se observar, ainda, que quando o trigo, cultivar BR-23, foi semeado após a soja, em parcelas que haviam sido inoculadas, o rendimento e teor de N dos grãos foram superiores nos tratamentos que haviam apresentado o melhor desempenho simbiótico na safra anterior (**Figura 2.18**). Desse modo, o trigo semeado nas parcelas que haviam sido inoculadas com a SEMIA 5019 produziu 396 $kg.ha^{-1}$ a mais do que nas parcelas sem inoculação, mostrando que a inoculação da soja deixou mais N no solo para a cultura seguinte.

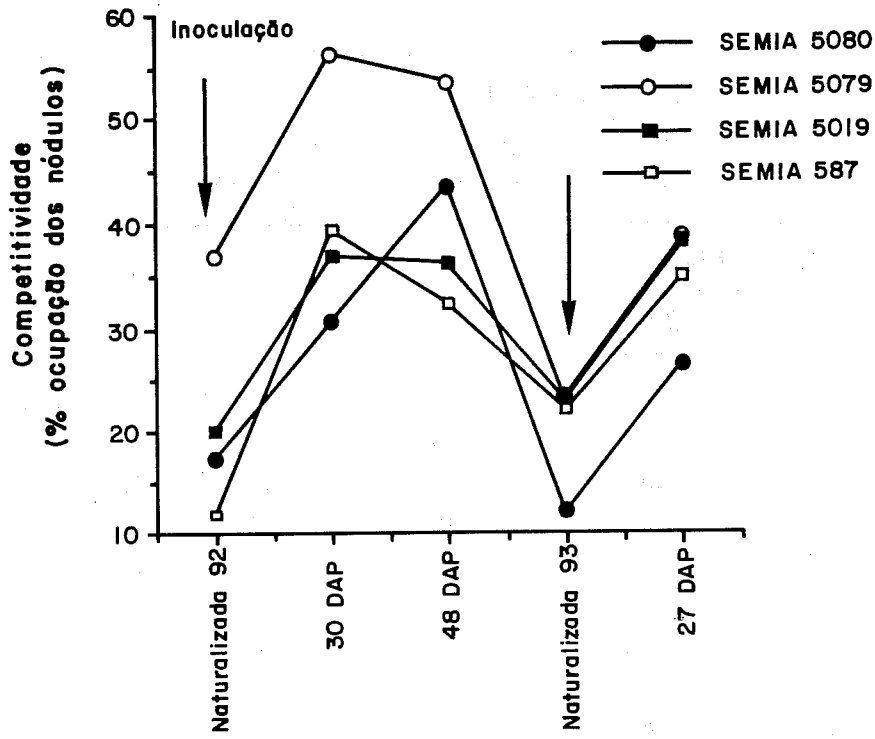


Figura 2.17. Efeito da reinoculação de soja, em um latossolo roxo do Paraná com população de $2{,}21.10^5$ células.g^{-1} de solo, na porcentagem de ocupação dos nódulos pelas estirpes introduzidas no inoculante. Segundo Nishi & Hungria (1994).

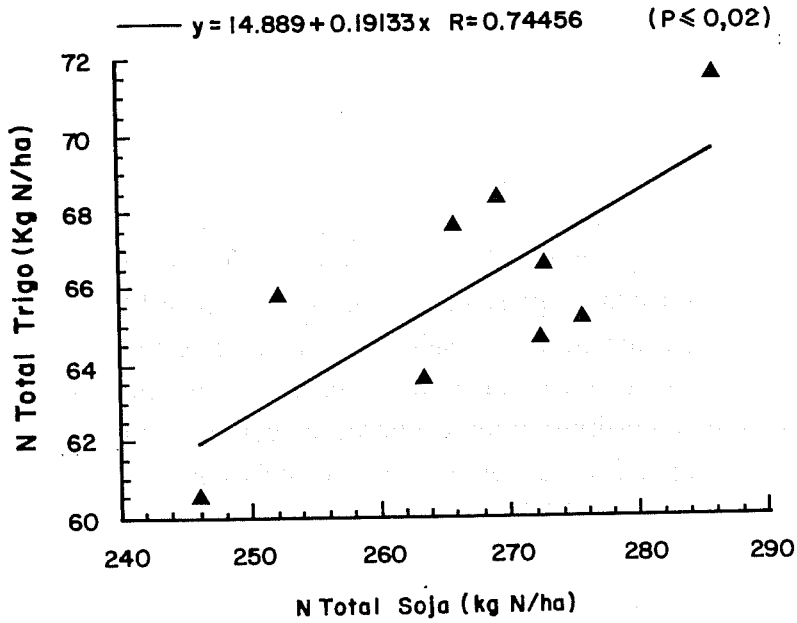


Figura 2.18. Relação linear entre o N total da soja na safra 92/93 e o N total do trigo, plantado sobre as mesmas parcelas da soja, na safra 93/94, sem receber qualquer adubação. Valores referentes às médias de quatro parcelas.

2.15. Conclusões

Os estudos sobre a simbiose da soja têm mostrado grandes avanços, particularmente nas áreas de genética e fisiologia do microssimbionte. No Brasil, a inoculação é uma técnica de baixo custo que resulta na economia de milhares de dólares para o país por ano. Em solos de primeiro ano de cultivo, os ganhos no rendimento da soja pela inoculação são indiscutíveis. Em solos já cultivados, os ganhos geralmente são menos expressivos, mas da ordem de 5 % a 15 %. Além disso, através da reinoculação da soja, estirpes mais eficientes são introduzidas e a cultura deixa de retirar N do solo, bem como o enriquece através dos restos culturais, podendo resultar em benefícios para as culturas posteriores. No Brasil, existem diversas linhas de pesquisa promissoras em andamento, incluindo a seleção de estirpes mais eficientes e competitivas e genótipos de soja com maior capacidade de fixação de N_2. Esses estudos, associados à melhoria na qualidade dos inoculantes comercializados no Brasil, podem resultar em aumentos expressivos na produtividade da soja.

2.16. Referências Bibliográficas

AGUILAR, J. M. M.; ASHBY, A. M.; RICHARDS, A. J. M.; LOAKE, G. J.; WATSON, M. D.; SHAW, C. H. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. **J. Gen. Microbiol.**, v.134, p.2741-2746, 1988.

AKAO, S.; KOUCHI, H. A supernodulating mutant isolated from soybean cultivar Enrei. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v. 38, p. 183-187, 1992.

ALBRECHT, S. L.; MAIER, R. J.; HANUS, F. J.; RUSSEL, S. A.; ELMERICH, D. W.; EVANS, H. J. Hydrogenase of *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. **Science**, v.203, p. 1255-1257, 1979.

AMES, P.; BERGMAN, K. Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, v.148, p.728-729, 1981.

ANÔNIMO. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB: list no. 45. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.43, p. 398-399, 1993.

ARP, D. J. Hydrogen cycling in symbiotic bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J., ed. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.432-460.

ASANUMA, S.; AYANABA, A. Variation in acid-Al tolerance of *Bradyrhizobium japonicum* strains from African soils. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.36, p.309-317, 1990.

ATKINS, C. A. Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In: DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R., ed. **Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.293-319.

ATKINS, C. A.; RAINBIRD, R. M.; PATE, J. S. Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N_2-fixing cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp). **Z. Pflanzenphysiol**, v. 97, p. 249-260, 1980.

ATKINS, C. A.; SHELP, B. J.; KUO, J.; PEOPLES, M. B.; PATE, J. S. Nitrogen nutrition and the development and senescence of nodules on cowpea seedlings. **Planta**, v.162, p.316-326, 1984.

BALATTI, P. A.; PUEPPKE, S. G. Identification of North American soybean lines that form nitrogen-fixing nodules with *Rhizobium fredii* USDA257. **Can. J. Plant Sci.**, v. 72, p.49-55, 1992.

BALDWIN, I. L.; FRED, E. B. Strain variation in the root nodule bacteria of clover, *Rhizobium trifolii*. **J. Bacteriol.**, v. 17, p.17-18, 1929.

BARBOUR, W. M.; WANG, S. P.; STACEY, G. Molecular genetics of *Bradyrhizobium* symbioses. In: STACEY, G.; EVANS, H. J.; BURRIS, R. H., ed. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.648-684.

BARNET, Y. M. Ecology of legume root nodule bacteria. In: DILWORTH, M. J.; GLENN A. R. **Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.199-228.

BARNI, N. A.; KOLLING, J; MINOR, H. C. Efeitos de níveis de nitrogênio sobre o rendimento de grãos, nodulação e características agronômicas da soja (*Glycine max* (L) Merr.). **Agron. sulriogr.**, v. 13, p. 93-104, 1977.

BARRADAS, C. A. A.; HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. I-Precocidade para nodulação e fixação do nitrogênio. **Turrialba**, v.39, p.236-242, 1989.

BARRADAS, C. A. A.; BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Seleção de cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* para nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos. **R. bras. Ci. Solo**, v.13, p.169-179, 1989.

BERGERSEN, F. J. Ammonia - an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodule. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 18, p.1-9, 1965.

BERGERSEN, F. J.; TURNER, G. L. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. **Biochim. Biophys. Acta**, v.141, p.507-515, 1967.

BERGERSEN, F. J.; TURNER, G. L.; GAULT, R. R.; CHASE, D. L.; BROCKWELL, J. The natural abundance of ^{15}N in an irrigated soybean crop and its use for the calculation of nitrogen fixation. **Aust. J. Agric. Res.**, v.36, p.411-423, 1985.

BETTS, J. H.; HERRIDGE, D. F. Isolation of soybean lines capable of nodulation and nitrogen fixation under high levels of nitrate supply. **Crop Sci.**, v. 27, p.1156-1161, 1987.

BHAGWAT, A. A.; KEISTER, D. L. Identification and cloning of *Bradyrhizobium japonicum* genes expressed strain selectivity in soil and rhizosphere. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p.1490-1495, 1992.

BHAGWAT, A. A.; TULLY, R. E.; KEISTER, D. L. Isolation and characterization of a competition-defective *Bradyrhizobium japonicum* mutant. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p.3496-3501, 1991.

BHUVANESWARI, T. V.; TURGEON, B. G.; BAUER, W. D. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*. **Plant Physiol.**, v.66, p.1027-1031, 1980.

BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro: II. Senescência tardia dos nódulos. **Turrialba**, v. 40, p.33-39, 1990.

BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Classificação de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* em genótipo I e II baseada em características fenotípicas e genotípicas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994a. p.66.

BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Relação entre a divisão de *B. japonicum* em genótipos e a eficiência e capacidade competitiva das estirpes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994b. p.63.

BODDEY, R. M. Methods for the quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.6, p.209-266, 1987.

BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E. Nitrogen fixation by nodulated soybean under tropical field conditions estimated by the ^{15}N isotope dilution technique. **Soil Biol. Biochem.**, v.16, p.583-588, 1984.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; NEVES, M. C. P. Quantification of the contribution of N_2 fixation to field-grown grain legumes - a strategy for the practical application of ^{15}N isotope dilution technique. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.649-655, 1990.

BOHLOOL, B. B.; SCHIMDT, E. L. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Science**, v.185, p.269-271, 1974.

BOHRER, T. R.; NEVES, M. C.; HUNGRIA, M. Caracterização de genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) para a fixação biológica do nitrogênio. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994. p.36.

BOLAND, M. J.; HANKS, J. F.; REYNOLS, P. H. S.; BLEVINS, D. G.; TOLBERT, N. E.; SCHUBERT, K. R. Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodules. **Planta**, v.155, p.45-51, 1982.

BOONKERD, N.; WEBER, D. F.; BEZDICEK, D. F. Influence of *Rhizobium japonicum* strains and inoculation methods on soybeans grown in rhizobia-populated soils. **Agron. J.**, v.70, p.547-549, 1978.

BORKERT, C. M.; SFREDO, G. J. Fertilizing tropical soils for soybean. In: FAO ed. **Tropical Soybean - Improvement and prodution**. Rome: FAO, 1994. p.175-200.

BOTTOMLEY, P. J. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J., ed. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.293-423.

BOTTOMLEY, P. J. K.; LEUNG, S. R.; STRAIN, S. R.; YAK, K.; DASHITI, N.; CLAYCOMB, P. The ecology of indigenous populations of *Rhizobium leguminosarum* bvs. *trifolii* and *viciae*. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, E.; STACEY, G.; NEWTON, W. E. **Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives**. New York: Chapman and Hall, 1990. p.371-378.

BRANDÃO Jr, O.; HUNGRIA, M. Efeito de doses de inoculante e de açúcar na aderência do inoculante às sementes e na nodulação e fixação do N_2 na soja. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994. p.52.

BREWIN, N. J. Hydrogenase and energy efficiency in nitrogen-fixing symbionts. In: VERMA, D. P. S.; HOHN, T., ed. **Genes Involved in Plant-Microbe-Interactions**. New York: Springer-Verlag, 1984. p.179-203.

BREWIN, N. J. Development of the legume root nodule. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v.7, p.191-226, 1991.

BRILL, W. J. Nitrogen Fixation: Basic to Applied. **Amer. Sci.**, v.67, p.458-466, 1979.

BUCHANAN, R. E. Approved lists of bacterial names. In: SKERMAN, V. B. D.; McGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. **Intern. J. Syst. Bacteriol.**, v.30, p.225-240. 1980.

BURNS, R. C.; HARDY, R. W. F. **Nitrogen fixation in bacteria and higher plants**. New York: Springer-Verlag, 1975.

BURRIS, R. H. Biological nitrogen fixation, 1924-1974. **Plant Physiol.**, v.54, p.443-449, 1974.

CAETANO-ANOLLES, G.; CRIST-ESTES, D. K.; BAUER, W. D. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. **J. Bacteriol.**, v.170, p.3164-3169, 1988a.

CAETANO-ANOLLES, G.; WALL, L. G.; DeMICHELI, A. T.; MACCHI, E. M.; BAUER, W. D.; FAVELUKES, G. Motility and chemotaxis affect nodulating efficiency of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiol.**, v.86, p.1228-1235, 1988b.

CALDWELL, B. E. Inheritance of a strain-specific ineffective nodulation in soybean. **Crop Sci.**, v.6, p.427-428, 1966.

CAMPO, R. J.; BORKERT, C. M.; CORDEIRO, D. S.; SFREDO, G. J.; LANTMANN, A. F.; PALHANO, J. B. Efeito de doses de nitrogênio e inoculante sobre a produção de grãos de soja. In: REUNIAO LATINOAMERICANA DE *Rhizobium*, 11 , 1982, Lima. **Memorias**. Lima: ALAR, 1982. p.108.

CANTER CREMERS, H. C. J.; BRUSSEL, A. A. N. van; PLAZINSKI, J.; ROLFE, B. G. Sym plasmid and chromosomal gene products of *Rhizobium trifolii* elicit developmental responses on various legume roots. **J. Plant Physiol.**, v.122, p.25-40, 1986.

CARLSON, R. W.; KALEMBASA, S.; TUROWSKI, D.; PACHORI, P.; NOEL, K. D. Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. **J. Bacteriol.**, v.158, p.1012-1017, 1987.

CARMEN C., M.; CARMEN C., N.; VARELA G., R. Evaluación de la fijación simbiótica del nitró geno por el cultivo de la soya (*Glycine max* (L.) Merrill) en un suelo del valle. **Acta Agron.**, v.34, p.74-85, 1984.

CARROLL, B. J.; McNEIL, D. L.; GRESSHOFF, P. M. Isolation and properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr) mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p.4162-4166, 1985a.

CARROLL, B. J.; McNEIL, D. L.; GRESSHOFF, P. M. A supernodulating and nitrate-tolerant symbiotic (nts) soybean mutant. **Plant Physiol.**, v.78, p.34-40, 1985b.

CARTER, K. R.; JENNINGS, N. T.; HANUS, J.; EVANS, H. J. Hydrogen evolution and uptake by nodules of soybeans inoculated with different strains of *Rhizobium japonicum*. **Can. J. Microbiol.**, v.24, p.307-311, 1978.

CATLOW, H. Y.; GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J. The use of transposon-induced non-motile mutants in assessing the significance of motility of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* for movement in soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.331-336, 1990a.

CATLOW, H. Y.; GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J. Does rhizobial motility affect its ability to colonize along the legume root? **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.573-575, 1990b.

CATTELAN, A. J.; HUNGRIA, M. Nitrogen nutrition and inoculation. In: FAO, ed. **Tropical Soybean - Improvement and prodution**. Rome: FAO, 1994. p.201-215.

CHATTERJEE, A.; BALATTI, P. A.; GIBBONS, W.; PUEPPKE, S. G. Interactions of *Rhizobium fredii* USDA257 and nodulation mutants derived from it with the agronomically improved soybean cultivar McCall. **Planta**, v.180, p.303-311, 1990.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **Int. J. System. Bact.**, v.38, p.393-397, 1988.

CHO, M. J.; HARPER, J. E. Effect of inoculation and nitrogen on isoflavonoid concentration in wild-type and nodulation-mutant soybean roots. **Plant Physiol.**, v.95, p.435-442, 1991.

CHUEIRE, L. M. de O.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja para nodulação com estirpes de crescimento rápido. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994. p.41.

CLARK, F. E. Nodulation responses of two near-isogenic lines of the soybean. **Can. J. Microbiol.**, v.3, p.113-123, 1957.

COELHO, R. R. R.; DROZDOWICZ, A. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. **Rev. Ecol. Biol. Sol.**, 15: 459-473, 1978.

DAZZO, F. B.; GARDIOL, A. Host-specificity in *Rhizobum*-legume interactions. In: VERMA, D. P. S. ; HOHN, T., ed. **Genes Involved in Microbe-Plant Interactions**. New York: Springer-Verlag, 1984. p.3-31.

DE-POLLI, H.; DÖBEREINER, J. Deficiência de micronutrientes em solo Podzólico Vermelho-Amarelo e sua correção com "pellet" de FTE. **Pesq. agropec. bras., Ser. Agron.**, v.9, p.93-99, 1974.

DE-POLLI, H.; CARVALHO, S. R. de; LEMOS, P. F.; FRANCO, A. A. Efeito de micronutrientes no estabelecimento e persistência de leguminosas em pastagens de morro em solo Podzólico Vermelho-Amarelo. **R. bras. Ci. Solo**, v.3, p.154-157, 1979.

DE-POLLI, H.; SOUTO. M.; FRANCO, A.A. **Compatibilidade de agrotóxicos com *Rhizobium* spp. e a simbiose das leguminosas**. Documentos, 3. EMBRAPA - UAPNPBS - Seropédica: EMBRAPA-UAPNPBS, 1986. 71p. (EMBRAPA-UAPNPBS. Documentos, 3).

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

DELWICHE, C. C. The nitrogen cycle. **Scient. Amer.**, v.223, p.136-147, 1970.

DEVINE, T. E. Genetic studies of soybean host cultivar interactions with *Rhizobium* strains. **Soyb. Genet. Newsl.**, v.3, p.19-20, 1976.

DEVINE, T. E. Inheritance of soybean nodulation response with a fast-growing strain of *Rhizobium*. **J. Her.**, v.75, p.359-361, 1984.

DEVINE, T. E. Nodulation of soybean plant introduction lines with the fast-growing rhizobial strain USDA 205. **Crop Sci.**, v.25, p.354-356, 1985a.

DEVINE, T. E. Host range and compatibility of soybean with rhizobial microsymbionts. In: SHIBLES, R. WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3, 1985, Ames. **Proceedings**. Boulder: Westview Press, 1985b. p.484-492.

DEVINE, T. E.; BREITHAUPT, B. H. Phenotypic thermal stability of rhizobitoxine-induced chlorosis and the nodulation controlling gene, rj_1. **Crop Sci.**, v.20, p.394-396, 1980.

DEVINE, T. E.; O'NEILL, J. J. Genetic allelism of nodulation response genes Rj_1, Rj_2 and Rj_4 in soybean. **Crop Sci.**, v.29, p.1345-1350, 1989.

DEVINE, T. E. ; WEBER, D. F. Genetic specificity of nodulation. **Euphytica**, v.26, p.27-535, 1977.

DEVINE, T. E.; KUYKENDALL, L. D.; BREITHAUPT, B. H. Nodule-like structures induced on peanut by chlorosis producing strains of Rhizobium classified as *R. japonicum*. **Crop Sci.**, v.23, p.394-397, 1983.

DEVINE, T. E.; KUYKENDALL, L. D.; O'NEILL, J. L. DNA homology group and the identity of bradyrhizobial strains producing rhizobitoxine-induced foliar chlorosis on soybean. **Crop Sci.**, v.28, p.38-941, 1988.

DEVINE, T. E.; KUYKENDALL, L. D.; O'NEILL, J. J. The Rj_4 allele in soybean represses nodulation by chlorosis-inducing bradyrhizobia classified as DNA homology group II by antibiotic resistance profiles. **Theor. Appl. Genet.**, v.80, p.33-37, 1990.

DEVINE, T. E.; KUYKENDALL, L. D.; O'NEILL, J. J. Nodulation interaction of the soybean allele Rj_2 with asiatic isolates of *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop Sci.**, v.31, p.1129-1131, 1991.

DEVRON, J. J.; KALIA, V. C.; HECKMANN, M. O.; SALSAC, I. Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of *Glycine* and *Vigna* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, p.610-612, 1987.

DHARMATILAKE, A. J.; BAUER, W. D. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. **Appl. Environ. Microb.**, v.58, p.1153-1158, 1992.

DIATLOFF, A. The introduction of *Rhizobium japonicum* to soil by seed inoculation of non-host legume and cereals. **Aust. J. Exp. Agr. Anim. Husb.**, v.9, p. 357-360, 1969.

DIXON, R. A.; DEY, P. M. ; LAMB, C. Phytoalexins: Enzymology and molecular biology. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v.55, p.1-136, 1983.

DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.41, p. 339-367, 1990.

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, p.850-852, 1966.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B. de. Interrelações entre variedades e nutrição na nodulação e simbiose da soja (*Glycine max* (L.) Merril). **Pesq. agropec. bras.**, v.2, p.475-487, 1967.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B. DE; PENTEADO, A. de F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o pêso do nódulos. **Pesq. agropec. bras.**, v.1, p. 233-237, 1966.

DÖBEREINER, J.; FRANCO, A. A.; GUZMÁN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesq. agropec. bras.**, v.5, p.155-161, 1970.

DOWLING, D. N.; BROUGHTON, W. J. Competition for nodulation of legumes. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.40, p.131-157, 1986.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov, a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **Intern. J. System. Bacteriol.**, v.38, p.89-98, 1988.

DUNIGAN, E. P.; BOLLICH, P. K.; HUTCHINSON, R. L.; HICKS, P. M.; ZAUNBRECHER, F. C.; SCOTT, S. G.; MOWERS, R. P. Introduction and survival of an inoculant strain of *Rhizobium japonicum* in soil. **Agron. J.**, v.76, p. 463-466, 1984.

ESKEW, D. L.; KAPUYA, J. ; DANSO, S. K. A. Nitrate inhibition of nodulation and nitrogen fixation by supernodulating nitrate-tolerant symbiosis mutants of soybean. **Crop Sci.**, v.29, p.1491-1496, 1989.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.1-42.

EVANS, H. J.; HANUS, F. J.; HAUGLAND, R. A.; CANTRELL, M. A.; XU, L. S.; RUSSELL, S. A.; LAMBERT, G. R.; HARKER, A. R. Hydrogen recycling in nodules affects nitrogen fication and growth of soybeans. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3, 1985 Ames. **Proceedings**. Boulder: Westview Press, 1985. p.935-942.

EVANS, H. J.; HARKER, A. R.; PAPEN, H.; RUSSELL, S. A.; HANUS, F. J.; Zuber, M. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.41, p.335-361, 1987.

FAO. **Inoculantes para leguminosas y su uso**. Rome: FAO, 1985. p.5.

FAO. **FAO Quart. Bull. Statist**., v.1, p.66, 1993.

FARIA, S. M. D.; DE-POLLI, H.; FRANCO, A. A. Adesivos para inoculação e revestimento de sementes de leguminosas. **Pesq. agropec. bras.**, v.20, p.169-176, 1985.

FAUCHER, C.; MAILLET, F.; VASSE, J.; ROSENBERG, C.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; TRUCHET, G. ; DÉNARIÉ, J. *Rhizobium meliloti* host range *nodH* determines production of an alfalfa-specific extracellular signal. **J. Bacteriol.**, v.170, p.5489-5499, 1988.

FRANCO, A. A. Contribution of the legume-*Rhizobium* to ecossystem and food production. In: DÖBEREINER, J.; BURRIS, R.H.; HOLLAENDER, A.; FRANCO, A.A.; NEYRA,C.A.; SCOTT, D.B., ed. **Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics**. New York: Plenum Press, 1978. p.65-73.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. Toxidez de manganês de um solo ácido na simbiose soja-*Rhizobium*. **Pesq. agropec. bras., Sér. Agron.**, v.6, p.57-66, 1971.

FRANCO, A. A.; FONSECA, O. O. M.; MARRIEL, L. Efeito do nitrogênio mineral na atividade da nitrogenase e nitrato redutase durante o ciclo da soja no campo. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.2, p.110-114, 1978.

FRANSSEN, H. J.; VIJN, I.; YANG, W. C.; , T. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Mol. Biol.**, v.19, p. 89-107, 1992.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. **Root Nodule Bacteria of Leguminous Plants**. Madison: The University of Wisconsin Press, 1932. 343p.

FREIRE, J. R. Inoculation of soybeans. In: VINCENT, J. M.; WHITNEY, A. S.; BOSE, J. **Exploiting the Legume-*Rhizobium* Symbiosis in Tropical Agriculture**. Maui: Niftal, 1977. p.335-379. (College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication, 145)

FREIRE, J. R. J. Research into the *Rhizobium*/Leguminosae symbiosis in Latin America. **Pl. Soil**, v.67, p.227-239, 1982.

FREIRE, J. R. R.; KOLLING, J. Contribuição do Centro de Fixação Biológica do Nitrogênio IPAGRO/ UFRGS para a aplicação da tecnologia Rhizobio/leguminosas e para a expansão da cultura da soja no Brasil. Porto Alegre: MIRCEN, 1991. 11p.

FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p.224-229, 1990.

GALLI, L. V. Avaliação de genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* para eficiência simbiótica. Piracicaba: ESALQ, 1987. (Tese de mestrado).

GAUR, Y. D.; SEN, A. N.; SUBBA RAO, N. S. Improved legume-rhizobium symbiosis by inoculating preceding cereal crop with rhizobium. **Pl. Soil**, v.54, p.313-316, 1980.

GAWORZEWSKA, E. T.; CARLILE, M. J. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. **J. Gen. Microbiol.**, v.128, p.1179-1188, 1982.

GAZZONI, D. L. Botany. In: FAO, ed. **Tropical Soybean Improvement and production**. Rome: FAO, 1994. p. 1-12.

GIBSON, A. H.; HARPER, J. E. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop Sci.**, v.25, p.497-501, 1985.

GILLER, K. E.; WILSON, K. J. **Nitrogen Fixation in Cropping Systems**. Wallingford: C.A.B. International, 1991. 313p.

GOBER, J. W.; KASHKET, E. R. K^+ regulates bacteroid-associated functions of *Bradyrhizobium*. **Proc. Natl. Acad. sci. USA**, v.84, p.4650-4654, 1987.

GOBER, J. W.; KASHKET, E. R. Role of DNA superhelicity in regulation of bacteroid-associated functions of *Bradyrhizobium* sp. strain 32H1. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, p.1420-1425, 1989.

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

GRESSHOFF, P. M. Plant Function in nodulation and nitrogen fixation in legumes. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E., ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.31-42.

GULASH, M.; AMES, P.; LAKOSILIERE, R. C.; BERGMAN, K. Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.48, p. 149-152, 1984.

HAHN, M.; HENNECKE, H. Cloning and mapping of a novel nodulation region from *Bradyrhizobium japonicum* by genetic complementation of a deletion mutant. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.54, p.55-61, 1988.

HALVERSON, L. J.; STACEY, G. Host recognition in the *Rhizobium*-soybean symbiosis. Evidence for the involvemente of lectin in nodulation. **Plant Physiol.**, v.77, p.621-625, 1985.

HAM, G. E. Inoculation of legumes with *Rhizobium* in competition with naturalized strains. In: NEWTON, W. E.; ORME-JOHNSON, W. H., ed. **Nitrogen Fixation**. Baltimore: University Press, 1980. p.131-138.

HAM, G. E.; CARDWELL, V. B.; HOHNSON, H. W. Evaluation of *Rhizobium japonicum* inoculants in soil containing naturalized populations of rhizobia. **Agron. J.**, v.63, p.301-303, 1971.

HANDELSMAN, J.; UGALDE, R. A.; BRILL, W. J. *Rhizobium meliloti* competitiveness and the alfalfa agglutinin. **J. Bacteriol.**, v.157, p.703-707, 1984.

HANUS, F. J.; ALBRECHT, S. L.; ZABLOTOWICZ, R. M.; ELMERICH, D. W.; RUSSELL, S. A.; EVANS, H. J. Yield and N content of soybean seed as influenced by *Rhizobium japonicum* inoculants possessing the hydrogenase characteristic. **Agron. J.**, v.73, p.368-372, 1981.

HARDARSON, G.; ZAPATA, F.; DANSO, S. K. A. Field evaluation of symbiotic nitrogen fixation by rhizobial strains using ^{15}N methodology. **Pl. Soil**, v.82, p.369-375, 1984.

HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biol. Biochem.**, v.5, p.47-81, 1973.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiol.**, v.43, p.1185-1207, 1968.

HARPER, J. E. Soil and symbiotic nitrogen requirements for optimum soybean production. **Crop Sci.**, v.14, p.255-260, 1974.

HARPER, J. E.; GIBSON, A. H. Differential nodulation tolerance to nitrate among legume species. **Crop Sci.**, v.24, p.173-179, 1984.

HARTWIG, U.; BOLLER, B.; NOSEBERGER, J. Oxygen supply limits nitrogenase activity of clover nodules after defoliation. **Ann. Bot.**, v.59, p. 285-291, 1987.

HERRIDGE, D. F. Use of the ureide technique to describe the nitrogen economy of field-grown soybeans. **Plant Physiol.**, v.70, p.7-11, 1982.

HERRIDGE, D. F.; BETTS, J. H. Field evaluation of soybean genotypes selected for enhanced capacity to nodulate and fix nitrogen in the presence of nitrate. **Pl. Soil**, v.110, p.129-135, 1988.

HILDEBRAND, D. F.; HARPER, J. E.; HYMOWITZ, T. Effect of nitrate level on nitrogen metabolism in winged and soya bean. **Ann. Bot.**, v.48, p.307-313, 1981.

HOLLAND, A. A. Competition between soil and seed-borne *Rhizobium trifolii* in nodulation of introduced *Trifolium subterraneum*. **Pl. Soil**, v. 32, p.293-302, 1970.

HOLLIS, A. B.; KLOOS, W. E.; ELKAN, G. H. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. **J. Gen. Microbiol.**, v.123, p.215-222, 1981.

HUBER, T. A.; AGARWAL, A. K.; KEISTER, D. L. Extracellular polysaccharide composition, *ex planta* nitrogenase activity, and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.**, v.58, p.1168-1171, 1984.

HUNGRIA, M. Efeito das temperaturas elevadas nos passos iniciais da infecção e nodulação do feijoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO FEIJÃO, 4,.1993, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1993. p.132.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Rev. bras. Ci. Solo**, 1994. (no prelo)

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris*. **Trop. Agric.**, v.65, p.341-346, 1988.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Effects of high temperatures on nodulation and N_2 fixation in *Phaseolus vulgaris* L. **Pl. Soil**, v.149, p.95-102, 1993.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.; SPRENT, J. I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Pl. Soil**, v.149, p. 95-102, 1993.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. **Pesq. agropec. bras.**, v.21, p. 9-24, 1986.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Cultivar and *Rhizobium* strain effects on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. **Pl. Soil**, v. 103, p.111-121, 1987a.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Partitioning of nitrogen fixation from biological fixation and fertilizer in *Phaseolus vulgaris*. **Physiol. Plant.**, v. 69, p.55-63, 1987b.

HUNGRIA, M.; THOMAS, R. J. Effects of cotyledons and nitrate on nitrogen assimilation of *Phaseolus vulgaris* L. **MIRCEN J.**, v.3, p.411-419, 1987.

HUNGRIA, M.; BARRADAS, C. A.; WALLSGROVE, R. M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris*. **J. Exp. Bot.**, v.42, p. 839-844, 1991.

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*. **Biol. Fert. Soils**, v.7, p. 325-329, 1989.

JARVIS, B. D. W.; DOWNER, H. L.; YOUNG, J. P. W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment of *Rhizobium fredii*. **Int. J. Syst. Bact.**, v.42, p.93-96, 1992.

JOHNSON, H. W.; MEANS, U. M.; CLARK, F. E. Responses of seedlings to extracts of soybean nodules bearing selected strains of *Rhizobium japonicum*. **Nature**, v. 83, p.308-309, 1959.

JONES, R. S.; PATTERSON, R. P.; RAPER, C. D. J. The influence of temperature and nitrate on vegetative growth and nitrogen accumulation by nodulated soybean. **Pl. Soil**, v.63, p.333-344, 1981.

JORDAN, D. C.; ALLEN, N. O. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: BUCHNAN, R. E. ; GIBBONS, N. E., ed. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore-London:Williams & Wilkins Co., 1974. p.235-244.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.32, p.136-139, 1982.

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R. ; HOLT, J. G., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co.,1984. p.235-244.

KALUZA, K.; HAHN, M.; HENNECKE, H. Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the nif region of the *Rhizobium japonicum* genome. **J. Bacteriol.**, v. 162, p.535-542, 1985.

KAMICKER, B. J.; BRILL, W. J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.51, p.487-492, 1986.

KANAYAMA, Y.; YAMAMOTO, Y. Formation of nitrosylleghemoglobin in nodules of nitrate-treated cowpea and pea plants. **Plant Cell Physiol.**, v.32, p.19-24, 1991.

KANESHIRO, T.; KWOLEK, W. F. Stimulated nodulation of soybeans by *Rhizobium japonicum* mutant (B-14075) that catabolizes the conversion of tryptophan to indol-3yl-acetic acid. **Plant Sci.**, v.42, p.141-146, 1985.

KAPE, R.; PARNISKE, M.; BRANDT, S.; WERNER, D. Isoliquiritigenin, a strong *nod* gene- and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.1705-1710, 1992.

KAPE, R.; PARNISKE, M.; WERNER, D. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p.316-319, 1991.

KARR, D. B.; EMERICH, D. W. Protein phosphorylation in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids and cultures. **J. Bacteriol.**, v.171, p.2994-3000, 1989.

KEISTER, D. L.; MARSH, S. S. Hemoproteins of *Bradyrhizobium japonicum* cultured cells and bacteroids. **Appl. Environ. Microb.**, v.56, p.2736-2741, 1990.

KEYSER, H. H.; MUNNS, D. N. Effects of calcium, manganese, and aluminum on growth of rhizobia in acid media. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 43, p.500-503, 1979a.

KEYSER, H. H.; BOHLOOL, B. B.; HU, T. S.; WEBER, D. F. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybeans. **Science**, v.215, p.1631-1632, 1982.

KEYSER, H. H.; MUNNS, D. N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum and phosphate. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.43, p.519-523, 1979b.

KIJNE, J. W. The *Rhizobium* infection process. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J., ed. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.349-398.

KIJNE, J. W.; SMIT, G.; DIAZ, C. L.; LUGTENBERG, B. J. J. Lectin enhanced accumulation of manganese-limited *Rhizobium leguminosarum* cells on pea root hair tips. **J. Bacteriol.**, v.170, p.2994-3000, 1988.

KOLLING, J.; SCHOLLES, S.; MENDES, N. G.; VACCA, M. Efeitos de técnicas de inoculação e formas de inoculantes sobre a simbiose em soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA, 18, 1990 Passo Fundo. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1990. (Trabalho oral).

KOSSLAK, R. M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H. E.; APPELBAUM, E. R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavone isolated from *Glycine max*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.7428-7432, 1987.

KOWALSKI, M.; HAM, G. E.; FREDERICK, L. R.; ANDERSON, I. E. Relationship between strains of *Rhizobium japonicum* and their bacteriophages from soil and nodules of field-grown soybeans. **Soil Sci.**, v.118, p.221-228, 1974.

KUYKENDALL, L. D.; ROY, M. A.; O'NEILL, J. J.; DEVINE, T. E. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.38, p.358-361, 1988.

KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Can. J. Microbiol.**, v.38, p. 501-505, 1992.

LA FAVRE, A. K.; EAGLESHAM, A. R. J. The effects of high temperatures on soybean nodulation and growth with different strains of bradyrhizobia. **Can. J. Microbiol.**, v.32, p.22-27, 1986b.

LA FAVRE, A. K.; EAGLESHAM, A. R. J. Effects of high temperatures and starter nitrogen on the growth and nodulation of soybean. **Crop Sci.**, v. 27, p.742-745, 1987.

LA FAVRE, J. S.; EAGLESHAM, A. R. J. Rhizobitoxine: a phytotoxin of unknown function which is commonly produced by bradyrhizobia. **Pl. Soil**, v.92, p.443-452, 1986a.

LANTMAN, A. F.; SFREDO, G. J.; BORKERT, C. M.; OLIVEIRA, M. C. N. Resposta da soja a molibdênio em diferentes níveis de pH do solo. **R. bras. Ci. Solo**, v.13, p.45-49, 1989.

LAWTON, M. A.; LAMB, C. J. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. **Mol. Cell Biol.**, v.7, p. 335-341, 1987.

LAYZELL, D. B.; HUNT, S. Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. **Physiol. Plant.**, v.80, p.322-327, 1990.

LAYZELL, D. B.; CASTILLO, D. DE; HUNT, S.; KUZMA, M.; CAUWENBERGHE, O. V.; ORESNIK, I. The regulation of oxygen and its role in regulating nodule metabolism. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E., ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.393-398.

LAYZELL, D. B.; HUNT, S.; PALMER, G. R. Mechanism of nitrogenase inhibition in soybean nodules. **Plant Physiol.**, v.92, p.1101-1107, 1990.

LEPO, J. E.; HICKOK, R. E.; CANTRELL, M. A.; RUSSELL, S. A.; EVANS, H. J. Revertible hydrogen uptake-deficient mutants of *Rhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.**, v.146, p.614-620, 1981.

LEROUGE, P.; ROCHE, P.; FAUCHER, C.; MAILLET, F.; TRUCHET, G.; PROMÉ, J.-C.; DÉNARIÉ, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide. **Nature**, v.344, p.781-784, 1990.

LIN, J.; WALSH, K. B.; JOHNSON, D. A.; CANVIN, D. T.; SHUJIN, W.; LAYZELL, D. B. Characterization of *R.fredii* QB1130, a strain effective on commercial soybean cultivars. **Pl. Soil**, v.99, p.441-446, 1987.

LIU, R.; TRAN, V. M.; SCHMIDT, E. L. Nodulationg competitiveness of a nonmotile Tn7 mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in nonsterile soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, p.1895-1900, 1989.

LÖHNIS, F. ; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **J. Agric. Res.**, v.20, p.543-556, 1921.

LOPES, E. S.; GIARDINI, A. R.; KIIHL, R. A. S. Presença e eficiência de *Rhizobium japonicum* em solos cultivados ou não com soja, no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 35, p.389-396, 1976a.

LOPES, E. S.; GIARDINI, A. R.; KIIHL, R. A. S.; IGUE, T. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estireps de *Rhizobium japonicum* para as variedades Santa-Rosa, Viçosa e IAC-2 de soja. **Bragantia**, v.35, p.1-11, 1976b.

LUNGE, V. R. Identificação e análise filogenética entre estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* por RFLP e RAPD. Porto Alegre: UFRGS-FA, 1993. (Tese de mestrado).

MAHON, J. D. Energy relationships. In: BROUGHTON, W. J., ed. **Nitrogen Fixation, 3, Legumes**. Oxford: Clarendon Press, 1983. p.299-325.

MAIER, R. J. Biochemistry, regulation, and genetics of hydrogen oxidation in *Rhizobium*. **CRC Crit. Rev. Biotech.**, v.3, p.17-38, 1986.

MAIER, R. J.; BRILL, W. J. Involvement of *Rhizobium japonicum* O antigen in soybean nodulation. **J. Bacteriol.**, v.133, p.1295-1299, 1978.

MAIER, R. J.; GRAHAM, L. Mutant strains of *Bradyrhizobium japonicum* with increased symbiotic N_2 fixation rates and altered Mo metabolism properties. **Appl. Environ. Microb.**, v.56, p.2341-2346, 1990.

MARTENSSON, A. M. Competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in red clover using repeated inoculation and increased inoculum levels. **Can. J. Microbiol.**, v.36, p.136-139, 1990.

MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M.; YAMAMOTO, Y. Incorporation of ^{15}N into allantoin in nodulated soybean plants supplied with $^{15}N_2$. **Plant Cell Physiol.**, v.18, p.459-462, 1977.

McDERMOTT, T. R.; GRAHAM, P. H. Competitive ability of efficiency in nodule formation of strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, v.3035-3039, 1990.

MEADE, J.; HIGGINS, P.; O'GARA, F. Studies on the inoculation and competitiveness of a *Rhizobium leguminosarum* strain in soils containing indigenous rhizobia. **Appl. Environ. Microb.**, v.49, p.899-903, 1985.

MELLOR, H. Y.; GLENN, A. R.; ARWAS, R.; DILWORTH, M. J. Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifolii* TAL. **Arch. Microbiol.**, v.47, p.607-612, 1987.

MIFLIN, B. J.; CULLIMORE, J. V. Nitrogen assimilation in the legume-*Rhizobium* symbiosis: A joint endeavour. In: VERMA, D. P. S. ; HOHN, T., ed. **Genes Involved in Microbe Plant Interactions**. Wien: Springer-Verlag, 1984. p.129-178.

MINAMISAWA, K. Hydrogenase phenotype, rhizobitoxine-producing ability and serinol content in soybean nodules formed with various strains of *Bradyrhizobium japonicum*. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F. J. DE NEWTON, W. E., ed. **Nitrogen Fixation: Hundred Years After**. Stuttgart: Gustav Fisher, 1988. p.586.

MINAMISAWA, K. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Plant Cell Physiol.**, v.30, p.877-884, 1989.

MINAMISAWA, K. Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by *nifDKE* sequence divergence. **Plant Cell Physiol.**, v.31, p.81-89, 1990.

MINAMISAWA, K.; FUKAI, K. Production of indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*: a correlation with genotype grouping and rhizobitoxine production. **Plant Cell Physiol.**, v.32, p.1-9, 1991.

MINAMISAWA, K.; ARIMA, Y.; KUMAZAWA, K. Characteristics of asparagine pool in soybean nodules in comparison with ureide pool. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.32, p.1-14, 1986.

MINAMISAWA, K.; ONODERA, S.; KOBAYASHI, N.; TANIMURA, Y.; YUHASHI, K.; AKAO, S. Competitiveness of different genotype groups of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* for nodule occupancy. In: PALACIOS, R.; MORA, J. ; NEWTON, W. E., ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.632.

MINAMISAWA, K.; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMI, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. **Appl. Environ. Microb.**, v.58, p.2832-2839, 1992a.

MINCHIN, F. R.; PATE, J. S. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. **J. Exp. Bot.**, v.24, p.259-271, 1973.

MINCHIN, F. R.; SHEEHY, J. E.; WITTY, J. F. Further errors in acetylene reduction assay: effects of plant disturbance. **J. Exp. Bot**, v.37, p.1581-1591, 1986.

MINCHIN, F. R.; SUMMERFIELD, R. J.; HADLEY, P.; ROBERTS, E. H.; RAWSTHORNE, S. Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. **Plant Cell Environ.**, v.4, p.5-26, 1981.

MINCHIN, F. R.; WITTY, J. F.; SHEEHY, J. E. A new technique for the measurement of the respiratory costs of symbiotic nitrogen fixation. In: JONES, D. G.; DAVIES, D. R., ed. **Temperate Legumes: Physiology, Genetics and Nodulation**. Boston: Pitman Advanced Publishing Program, 1983. p.201-217.

MIRZA, N. A.; BOHLOOL, B. B.; SOMASEGARAN, P. Non-destructive chlorophyll assay for screening of strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.203-207, 1990.

MOROTE, C. G. B.; VIDOR, C.; MENDES, N. G.; PEREIRA, J. S. Melhoria da nodulação da soja pela cobertura do solo e inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*. **R. bras. Ci. Solo**, v.14, p.143-150, 1990.

MORRIS, R. O. Genes specifying auxin and cytokins biosynthesis in phytopathogens. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.37, p.509-538, 1986.

MORRIS, V. J.; BROWNSEY, G. J.; HARRIS, J. E.; GUNNING, A. P.; STEVENS, B. J. H.; JOHNSTON, A. W. B. Cation-dependent gelation of the acidic extracelular polysaccharides of *Rhizobium leguminosarum*: A non-specific mechanism for the attachment of bacteria to plant roots. **Carbohydr. Res.**, v.191, p.315-320, 1989.

MUNNS, D. N.; FRANCO, A. A. Soil constraints to legume production. In: GRAHAM, P.H.; S. C. HARRIS, S.C., ed. **Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture**. Cali: CIAT, 1982. p.133-152.

MUNNS, D. N.; KEYSER, H. H. Response of *Rhizobium* strains to acid and aluminum stress. **Soil Biol. Biochem.**, v.13, p.115-118, 1981.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. Cultural practices - water management. In: FAO, ed. **Tropical Soybean - Improvement and prodution**. Rome: FAO, 1994. p.153-160.

NEVES, M. C. P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.6, p.267-321, 1987.

NEVES, M. C. P.; DIDONET, A. D.; DUQUE, F. F.; DÖBEREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **J. Exp. Bot.**, v.36, p.1179-1192, 1985.

NEVES, M. C. P.; MARTINAZZO, A. F.; RAMOS, A. L. G.; DÖBEREINER, J. Gradual adaptation of more efficient *Bradyrhizobum* spp. of soybean and cowpeas for replacement of already established population. In: MULONGLY, K.; GUEYE, M. SPENCER, D. S. C., ed. **Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture**. Nigeria: IITA-Wiley-Sayce, 1992. p.219-233.

NEWTON, W. E. Nitrogenase: Distribution, composition, structure and function. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E., ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.5-18.

NICOL, H.; THORNOTON, H. G. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. **Proc. R. Soc. London**, v.130, p.32-59, 1941.

NISHI, C. Y. M.; HUNGRIA, M. **Eficiência da fixação biológica do N_2 e capacidade competitiva das estirpes SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 inoculadas em soja (*Glycine max* (L.) Merrill).** Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1993. 13p. (EMBRAPA-CNPSo. Pesquisa em andamento,.15).

NISHI, C. Y. M.; HUNGRIA, M. Capacidade competitiva das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 566, SEMIA 586 e suas variantes genéticas SEMIA 5079 e SEMIA 5080. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994. p. 37.

NOEL, K. D.; BRILL, W. J. Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium japonicum* populations. **Appl. Environ. Microb.**, v. 40: 931-938, 1980.

O'BRIAN, M. R.; MAIER, R. J. Hydrogen metabolism in *Rhizobium*: energetics, regulation, enzymology and genetics. **Adv. Microb. Physiol.**, v.29, p.1-52, 1988.

OLIVEIRA, J. C.; RAMOS, M. L. G.; DUQUE, F. F. Inoculação da soja, em solo de Cerrado, no primeiro ano de cultivo. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.15, p.273-276, 1991.

OLIVEIRA, L. A. de; GRAHAM, P. H. Speed of nodulation and competitive ability among strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. **Arch. Microbiol.**, v.153, p.311-315, 1990.

OLIVEIRA, L. A. de; SMYTH, T. J.; BONETTI, R. Efeito das adubações anteriores na nodulação e rendimento da soja e do feijao-caupi num latossolo amarelo da Amazônia. **R. bras. Ci. Solo**, v.16, p.195-201, 1992.

OWENS, L. D.; WRIGHT, D. A. Rhizobial-induced chlorosis in soybeans: isolation, production in nodules and varietal specificity of the toxin. **Plant Physiol.**, v.40, p.927-930, 1964a.

OWENS, L. D.; WRIGHT, D. A. Production of the soybean-chlorosis toxin by *Rhizobium japonicum* in pure culture. **Plant Physiol.**, v.40, p.931-933, 1964b.

PACOVSKY, R.; HUNGRIA, M. Glutamine synthetase may limit nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY G. ; NEWTON, W. E., ed. **Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives**. New York: Chapman and Hall, 1990. p.359.

PEDROSA, F. O.; NASCIMENTO, A. J.; ALVAHYDO, R.; DÖBEREINER, J. Teores de leg-hemoglobina e de molibdênio nos nódulos de soja (*Glycine max*) inoculada com estirpes de *Rhizobium japonicum* de eficiência normal e excepcional. **Pesq. agropec. bras.**, v.5, p.373-379, 1970.

PERES, J. R. R. **Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill**. Porto Alegre: UFRGS-FA, 1979. (Tese de mestrado).

PERES, J. R. R.; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja. **Agron. Sul Riograd.**, v.16, p.205-219, 1980.

PERES, J. R. R.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solos de cerrado. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.17, p.357-363, 1993.

PERES, J. R. R.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Sobrevivência de estirpes de *Rhizobium japonicum* na superfície de sementes de soja inoculadas. **Pesq. agropec. bras.**, v.21, p.489-493, 1986.

PERES, J. R. R.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Estabelecimento de *Bradyrhizobium japonicum* num solo de cerrado pela inoculação de sementes de arroz. **R. bras. Ci. Solo**, v.13, p.35-39, 1989.

PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Variabilidade na eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. **R. bras. Ci. Solo**, v.8, p.193-196, 1984.

PETERS, N. K.; FROST, J. W.; LONG, S. R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**, v. 233, p.1980, 1986.

PHILLIPS, D. A. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.31, p.29-49, 1980.

PHILLIPS, D. A. Genetic enhancement of nitrogen fixation. In: DILWORTH, M.J.; GLENN, A. R., ed. **Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.408-428.

PHILLIPS, D. A.; TEUBER, L. R. Plant genetics of symbiotic nitrogen fixation. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H. ; EVANS, H. J., ed. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.625-647.

POSTGATE, J. R. ; HILL, S. Nitrogen Fixation. In: LYNCH, J. M.; POOLE, N. J. ed. **Microbial Ecology, a Concept Approach**. Oxford: Blackwell, 1979. p.191-213.

PRIEFER, U. B. Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39. **J. Bacteriol.**, v.171, p.6161-6168, 1989.

PUEPPKE, S. G. Adsorption of slow- and fast-growing rhizobia to soybean and cowpea roots. **Plant Physiol.**, v.75, p.924-928, 1984.

ROBINSON, J. B.; TUOVINEN, O. H.; BAUER, W. D. Role of divalent cations in the subunit associations of complex flagella from *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, v.174, p.3896-3902, 1992.

RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R. C.; TRIPLETT, E. W. Characterization of Brazilian soybean inoculant as group II strains of *B. japonicum*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E., ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers , 1993a. p.648.

RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R. C.; VAN BERKUM, P.; TRIPLETT, E. W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Appl. Environ. Microb.**, v.59, p.4371-4373, 1993b.

RUSCHEL, A. P.; EIRA, P. A. d. Fixação simbiótica do nitrogênio na soja (*Glycine max* (L.) Merril): Influência da adição de cálcio ao solo e molibdênio ao revestimento da semente. **Pesq. agropec. bras.**, v.4, p. 103-107, 1969.

RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B.; VICTORIA, R. L.; SALATI, E. Comparison of isotope techniques and non-nodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on dinitrogen fixation in soybean, *Glycine max*. **Pl. Soil**, v.53, p.513-525, 1979.

SAARI, L. L.; LUDDEN, P. W. The energetics and energy costs of symbiotic nitrogen fixation. In: KOSUGE, T.; NESTER, E. W., ed. **Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives**. New York: Macmillan Publishing Company, 1986. p.147-193.

SADOWSKY, M. J.; CREGAN, P. B. The soybean Rj_4 allele restricts nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 strains. **Appl. Environ. Microb.**, v.58, p.720-723, 1992.

SALL, K.; SINCLAIR, T. R. Soybean genotypic differences in sensitivity of symbiotic nitrogen fixation to soil dehydration. **Pl. Soil**, v. 133, p.31-37, 1991.

SANJUAN, J.; CARLSON, R. W.; BHAT, U. R.; SPAINK, H. P.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; STOKKERMAN, T.; PETERS, K.; GLUSHKA, J.; LUGTENBERG, B. J. J.; STACEY, G. *Bradyrhizobium japonicum* strains produce multiple 2-*O*-methylfucose-containing lipo-oligosaccharide. In: PALACIOS, R.; MORA, J. ; NEWTON, W. E., ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 177-182.

SAWADA, Y.; MIYASHITA, K.; YOKOYAMA, T. Diversity within serogroups of japanese isolates of *Bradyrhizobium japonicum* as indicated by intrinsic antibiotic resistance. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.30, p. 501-504, 1990.

SCHOLLA, M. H.; ELKAN, G. H. *Rhizobium fredii* sp nov, a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **Int. J. Syst. Bact.**, v.34, p. 484-486, 1984.

SCHUBERT, K. R.; COKER, G. T. I. Studies of nitrogen and carbon assimilation in N_2-fixing plants: short-term studies using (^{13}N) and (^{11}C). In: ROOT, J. W.; KROHN, K. A., ed. Recent Developments in Biological and Chemical Research with Short-Lived Radioisotopes., **Adv. Chem. Ser.**, v.197 p.317-339, 1982.

SCHUBERT, K. R.; EVANS, H. J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.73, p.1207-1211, 1976.

SCHUBERT, K. R.; RYLE, G. J. A. The energy requirements for nitrogen fixation in nodulated legumes. In: SUMMERFIELD, R. J. ; BUNTING, A. H. **Advances in Legume Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1980. p.85-96.

SCHUBERT, K. R.; JENNINGS, N. T.; EVANS, H. J. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. II. Effects on dry matter accumulation and nitrogen fixation. **Plant Physiol.**, v.61, p.398-401, 1978.

SCOTTI, M. R. M. M. L.; NEVES, M. C. P.; DÖBEREINER, J.; PAIVA, E. Competitive and proteic alterations in *Bradyrhizobium japonicum* strains after contact with soybean root (*Glycine max* (L.) Merrill). **An. Acad. bras. Ci.**, v.65, p.427-438, 1993.

SCOTTI, M. R. M. M. L.; SÁ, N. M. H.; VARGAS, M. A. T.; DÖBEREINER, J. Resistência natural à estreptomicina de estirpes de *Rhizobium* e sua possível influência na nodulação de leguminosas em solos de cerrado. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2, 1981, Brasilia. **Anais**. Brasilia: EMBRAPA,1981. p.183-184

SCOTTI, M. R. M. L.; SÁ, N. M. H.; VARGAS, M. A. T.; DÖBEREINER, J. Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian cerrados. **An. Acad. brasil. Ciênc.**, v.54, p.733-738, 1982.

SEKHON, H. S.; KAUL, J. N.; DHINGRA, K. K. Effect of *Rhizobium inoculation* mulch and nitrogen and phosphorus fertilizers on soya bean (*Glycine max* (L.) Merrill. **J. Agric. Sci.**, v.102, p.475-478, 1984.

SHELP, B. J. ; ATKINS, C. A. Subcellular location of enzymes of ammonia assimilation and asparagine synthesis in root nodules of *Lupinus albus* L. **Plant Sci. Lett.**, v.36, p.225-230, 1984.

SINGLETON, P. W ; TAVARES, J. W. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous rhizobium population. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.51, p.1013-1018, 1986.

SMIT, G.; KIJNE, J. W.; LUGTENBERG, B. J. J. Correlation between extracellular fibrils and attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. **J. Bacteriol.**, v.168, p.821-827, 1986.

SMIT, G.; KIJNE, J. W.; LUGTENBERG, B. J. J. Both cellulose fibrils and a Ca^{2+}-dependent adhesin are involved in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. **J. Bacteriol.**, v.169, p.4294-4301, 1987.

SMITH, G. B.; WOLLUM II, A. G. Bacterial culture history affects the attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to host *Glycine max* roots. **Can. J. Microbiol.**, v.37, p.730-736, 1991.

SOBRAL, B. W. S.; HONEYCUTT, R. J.; ATHERLY, A. G.; NOEL, K. D. Recognition and infection in legume nodulation. In: DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R., ed. **Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.229-258.

SPRENT, J. I. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. **Plant Cell Environ.**, v.3, p.35-43, 1980.

SPRENT, J. I. **The biology of nitrogen-fixing organisms**. London: Mc Graw-Hill Book Company (UK) Limited, 1984. 196p.

SPRENT, J. I.; Thomas, R. J. Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. **Plant Cell Environ.**, v.7, p.637-645, 1984.

STANLEY, J. S.; BROWN, G. G.; VERMA, D. P. S. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. **J. Bacteriol.**, v.163, p.148-154, 1985.

STEPHENS, P. M.; COOPER, J. M. Variation in speed of infection of "no root hair zone" of white clover and nodulating competitiveness among strains of *Rhizobium trifolii*. **Soil Biol. Biochem.**, v.20, p.465-470, 1988.

STREETER, J. G. Estimation of ammonium concentration in the cytosol of soybean nodules. **Plant Physiol.**, v.90, p.779-782, 1989.

SUTTON, W. D. Nodule development and senescence. In: BROUGHTON, W.J., ed. **Nitrogen Fixation**. Oxford: Clarendon Press, Oxford, 1983. p.144-212.

SUZUKI, A.; VIDAL, J.; NGUYEN, J.; GADAL, P. Occurence of ferredoxin dependent glutamate synthase in plant cell fraction of soybean root nodules. **FEBS Lett.**, v.173, p.204-208, 1986.

TAYLOR, R. W.; WILLIAMS, M. L.; SISTANI, K. R. N_2 fixation by soybean-*Bradyrhizobium* combinations under acidity, low P and high Al stresses. **Pl. Soil**, v.131, p.293-300, 1991.

TEANEY, G. B.; FUHRMANN, J. J. Soybean response to nodulation by bradyrhizobia differing in rhizobitoxine phenotype. **Pl. Soil**, v.145, p.275-285, 1992.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Appl. Environ. Microb.**, v.57, p.19-28, 1991.

TJEPKEMA, J. D.; YOCUM, C. S. Measurement of oxygen partial pressure within soybean nodules by oxygen microelectrodes. **Planta**, v.119, p. 351-360, 1974.

TRIPLETT, E. W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.3, p. 199-206, 1990a.

TRIPLETT, E. W. Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p.98-103, 1990b.

TRIPLETT, E. W.; SADOWSKY, M. J. Genetics of competition for nodulation of legumes. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.46, p.399-428, 1992.

TRUCHET, G.; ROCHE, P.; LEROUGE, P.; VASSE, J.; CAMUT, S.; DE BILLY, F.; PROMÉ, J.-C.; DÉNARIÉ, J. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. **Nature**, v.351, p.670-673, 1991.

VAN BERKUM, P. Evidence for a third uptake hydrogenase phenotype among the soybean bradyrhizobia. **Appl. Environ. Microb.**, v.56, p. 3835-3841, 1990.

VAN BERKUM, P.; SLOGER, C. Hydrogen oxidation by the host-controlled uptake hydrogenase phenotype of *Bradyrhizobium japonicum* in symbiosis with soybean host plants. **Appl. Environ. Microb.**, v.57, p. 1863-1865, 1991.

VAN BERKUM, P.; SLOGER, C.; WEBER, D. F.; CREGAN, P. B.; KEYSER, H. H. Relationship between ureide N and N_2 fixation, aboveground N accumulation, acetylene reduction, and nodule mass in greenhouse and field studies with *Glycine max* L. (Merr). **Plant Physiol.**, v.77, p.53-58, 1985.

VAN BRUSSEL, A. A. N.; ZAAT, S. A. J.; CANTER CREMERS, H. C. J.; WIJFFELMAN, C. A.; PEES, E.; TAK, T.; LUGTENBERG, B. J. J. Role of plant root exudate and sym plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of Tsr factor which causes thick and short roots on common vetch. **J. Bacteriol.**, v.165, p.517-522, 1986.

VAN EGERAAT, A. W. S. M. The growth of *Rhizobium leguminosarum* on the root surface and in the rhizosphere of pea seedlings in relation to root exudates. **Pl. Soil**, v.42, p.367-374, 1975a.

VAN EGERAAT, A. W. S. M. The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings. **Pl. Soil**, v.42, p.381-386, 1975b.

VANCE, C. P. *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease? **Ann. Rev. Microbiol.**, v.37, p.399-424, 1983.

VARGAS, M. A.; SUHET, A. R. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de cerrado. **Pesq. agropec. bras.**, v.15, p. 343-347, 1980a.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Efeitos da inoculação e deficiência hídrica no desenvolvimento da soja em um solo de cerrado. **R. bras. Ci. Solo**, v.4, p. 17-21, 1980b.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. **Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1992a. 3p. (Comunicado Técnico, 62).

VARGAS, M. A. T; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DA SOJA NOS CERRADOS, 1992, Uberaba. **Cultura da soja nos cerrados: Anais**. Piracicaba: POTAFOS,1992b. p.159-182.

VARGAS, M. A. T.; PERES, J. R. R.; SUHET, A. R. Reinoculação da soja em função dos serogrupos de *Rhizobium japonicum* predominantes em solos de Cerrado. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA EM SOJA, 2, 1981, Brasília. **Anais**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1982, v.2, p.715-722. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 1)

VARGAS, M. A. T.; PERES, J. R. R. SUHET, A. R. Adubação nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em um solo sob cerrado. **Pesq. agropec. bras.**, v.17, p.1127-1132, 1982a.

VARGAS, M. A. T.; PERES, J. R. R.; SUHET, A. R. **Adubação nitrogenada e inoculação de soja em solos de cerrado**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1982b. 11p. (Circular Técnica, 13)

VARGAS, M. A. T.; PERES, J. R. R.; SUHET, A. R. Fixação de nitrogênio atmosférico pela soja em solos do cerrado. **Inf. Agropec., Belo Horizonte**, v.8, p.20-23, 1982c.

VASILAS, B. L. ; FUHRMANN, J. J. Field response of soybean to nodulation by a rhizobiotoxine-producing strain of *Bradyrhizobium*. **Agron. J.**, v.85, p.302-305, 1993.

VERDCOURT, B. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the flora of tropical East Africa. II. **Kell Bull.**, v.24, p.235-307, 1970.

VERMA, D. P. S. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. **Plant Cell**, v.4, p.373-382, 1992.

VERMA, D. P. S.; CHEON, C.-I.; LEE, N.-G.; HONG, Z.; MIAO, G.-H. Biogenesis of peribacteroid membrane (PBM) forming a subcellular compartment essential for symbiotic nitrogen fiation. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E., ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993. p.269-274.

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

VESSEY, J. K.; WALSH, K. B.; LAYZELL, D. B. Oxygen limitation of nitrogen fixation in stem-girdled and nitrate-treated soybean. **Physiol. Plant.**, v.85, p.137-144, 1988.

VEST, G. Rj_3 a gene conditioning ineffective nodulation in soybean. **Crop Sci.**, v.10, p.34-35, 1970.

VEST, G.; GRANT, C.; CALDWELL, B. E. Rj_4- A gene conditioning eneffective nodulation in soybeans. **Crop Sci.**, v.12, p.692-694, 1972.

VEST, G.; WEBER, D. F.; SLOGER, C. Nodulation and nitrogen fixation. In: CALDWELL, B. E., ed. **Soybeans: Improvement, production, and uses**. Madison: ASA, 1973. p.353-390.

VINCENT, J. M. Factors controlling the legume-*Rhizobium* symbiosis. In: NEWTON, W. E.; ORME-JOHNSON, W. J., ed. **Nitrogen fixation, 2**. Baltimore: University Park Press, 1980. p.103-129.

VITERI, S. E.; SCHMIDT, E. L. Ecology of indigenous soil rhizobia: response of *Bradyrhizobium japonicum* to readily available substrates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, p.1872-1875, 1987.

VOSS, M.; SIDIRAS, N. Nodulação da soja em plantio direto em comparação com plantio convencional. **Pesq. agropec. bras.**, v.20, p. 775-782, 1985.

WADISIRISUK, P.; DANSO, S. K. A.; HARDARSON, G.; BOWEN, G. D. Influence of *Bradyrhizobium japonicum* location and movement on nodulation and nitrogen fixation in soybean. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, p.1711-1716, 1989.

WEAVER, R. W.; FREDERICK, L. R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I- Greenhouse studies. **Agron. J.**, v.66, p.229-232, 1974.

WEISER, G. C.; SKIPPER, H. D.; Wollum II, A. G. Exclusion of inefficient *Bradyrhizobium japonicum* serogroups by soybean genotypes. **Pl. Soil**, v.121, p.99-105, 1990.

WILLIAMS, L. E.; LYNCH, D. L. Inheritance of a non-nodulating character in the soybean. **Agron. J.**, v.46, p.28-29, 1954.

WILLIAMS, L. E .; PHILLIPS, D. A. Increased soybean productivity with a *Rhizobium japonicum* mutant. **Crop Sci.**, v.23, p.246 - 250, 1983.

WILSON, P. W. **The biochemistry of symbiotic fixation**. Madison: The University of Wisconsin Press, 1940.

WITTY, J. F.; MINCHIN, F. R. Oxygen diffusion in the legume root nodule. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G. ; NEWTON, W. E., ed. **Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives**. New York: Chapman and Hall, 1990. p.285-292.

WITTY, J. F.; MINCHIN, F. R.; SKØT, L.; SHEEHY, J. E. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. In: MIFLIN, B. J., ed. **Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology**. Oxford: University Press, 1986. p.275-314.

WU, S.; HARPER, J. E. Dinitrogen fixation potential and yield of hypernodulating soybean mutants: a field evaluation. **Crop Sci.**, v.31, p. 1233-1240, 1991.

YATES, M. G.; CAMPBELL, F. O. The effect of nutrient limitation on the competition between an H_2-uptake hydrogenase positive (Hup^+) recombinant strain of *Azotobacter chroococcum* and the Hup^- mutant parent in mixed populations. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135, p.221-226, 1989.

YONEYAMA, T. Partitioning and metabolism of nitrogen supplied as nitrate, amides and allantoin to detached vegetative shoots of soybeans *via* transpiration stream. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.30, p.333-343, 1984a.

YONEYAMA, T. Partitioning and metabolism of nitrate, asparagine, and allantoin in the soybean shoots at the grain-filling stage. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.30, p.583-587, 1984b.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J., ed. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.43-86.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **J. Bacteriol.**, v.173, p.2271-2277, 1991.

YOUNG, P.; MARTÍNEZ, E.; BARNET, Y.; COOPER, J.; LINDSTROM, K. Report from the taxonomy meeting, subcommittee on *Agrobacterium* and *Rhizobium*. In: PALACIOS, R.; MORA, J. ; NEWTON, W. E., ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.777-778.

ZAAT, S. A. J.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; TAK, T.; PEES, E.; LUGTENBERG, B. J. J. Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce *nodDABC* gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. **J. Bacteriol.**, v.169, p.3388-3391, 1987b.

ZAAT, S. A. J.; WIJFFELMAN, C. A.; SPAINK, H. P.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; OKKER, R. J. H.; LUGTENBERG, B. J. J. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. **J. Bacteriol.**, v.169, p.198-204, 1987a.

ZABLOTOWICZ, R. M.; RUSSEL, S. A.; EVANS, H. J. Effect of the hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* on the nitrogen fixation and growth of soybeans at different stages of development. **Agron. J.**, v.72, p.555-559, 1980.

ZDOR, R. E.; PUEPPKE, S. G. Nodulation competitiveness of Tn5-induced mutants of *Rhizobium fredii* USDA 208 that are altered in motility and extracelllular polysaccharide production. **Can. J. Microbiol.**, v. 37: 52-58, 1991.

CAPÍTULO 3

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM FEIJÃO

Ricardo S. Araujo[1]

3.1. Introdução

O feijão constitui uma das principais fontes de proteína da dieta do brasileiro, sendo consumido por todas as classes de renda do país. Entretanto, o consumo *per capita* caiu nos últimos anos (Vieira, 1988), refletindo uma queda no poder aquisitivo do consumidor, uma elevação do preço do produto e uma redução na oferta de feijão no mercado, provavelmente decorrente da redução na produtividade da cultura.

Um dos fatores mais limitantes à produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo fósforo e nitrogênio, nos solos agrícolas. A adição de nitrogênio na forma de fertilizantes é cara e, em muitos casos, ineficiente, principalmente devido a perdas do elemento causadas por práticas culturais inadequadas. As leguminosas evoluiram obtendo nitrogênio da simbiose formada com bactérias fixadoras de nitrogênio, os rizóbios. Essa simbiose é conhecida e explorada comercialmente há mais de cem anos, sendo a soja e os adubos verdes os exemplos de maior sucesso conhecidos.

Há um descrédito crônico na capacidade de o feijoeiro fixar nitrogênio atmosférico suficiente para expressar seu potencial produtivo, quando em associação com o *Rhizobium*, recomendando-se indistintamente o uso de fertilizante nitrogenado para a cultura (EMBRAPA, 1993). Entretanto, resultados de vários anos de pesquisa apontam na direção contrária, sugerindo que é possível que a cultura do feijoeiro se beneficie, em nível de campo, da fixação do nitrogênio. A exemplo da cultura da soja, se o uso da inoculação do feijoeiro se tornar uma prática comum na agricultura, isto poderá representar uma economia de divisas para o país. Considerando-se uma área plantada com feijão, de aproximadamente 5 milhões de hectares, e uma recomendação média de adubação nitrogenada com 60 kg de $N \cdot ha^{-1}$, os gastos com o fertilizante, sulfato de amônio ou uréia, totalizam 320 ou 200 milhões de dólares, respectivamente. Contudo, essa adubação na maioria das vezes não é suficiente para que a cultura atinja seu potencial produtivo, pois a eficiência de uso do fertilizante nitrogenado pelo feijoeiro é muito baixa, o que faz com que seja necessária a aplicação de muito mais fertilizante.

Em contrapartida, considerando-se o preço (superestimado) de um dólar, por dose de inoculante, e uma aplicação de uma dose de inoculante por hectare, os custos cairiam para cinco milhões de dólares, representando uma grande economia de divisas que poderiam ser direcionadas para outros aspectos da melhoria da produtividade agrícola, e outros insumos extremamente importantes para a cultura do feijão. Mesmo que a inoculação não seja suficiente para suprir todo o nitrogênio e seja necessária a realização de adubações nitrogenadas em cobertura, a eliminação ou redução da adubação no plantio já representa uma economia a ser considerada.

---

[1] Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF), Caixa Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

Neste capítulo é apresentado um resumo dos resultados de pesquisa sobre inoculação do feijoeiro, e discutida a viabilidade do uso da inoculação na prática.

3.2. O Microsimbionte

A pesquisa sobre o microsimbionte do feijoeiro teve um grande impulso nas décadas de 80 e 90, e hoje se conhecem melhor algumas das propriedades e características desejáveis desses organismos. Os resultados mais relevantes são apresentados a seguir, de acordo com as características estudadas.

3.2.1. Nomenclatura/especificidade hospedeira

O feijoeiro foi sempre considerado uma leguminosa de nodulação específica, tendo como único microsimbionte o *Rhizobium phaseoli*, posteriormente denominado *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (Rlp). Essa nova denominação resultou de estudos genéticos que mostraram que *R. leguminosarum*, *R. trifolii* e *R. phaseoli* diferem apenas no plasmídio simbiótico, tendo o restante de seu genoma idêntico. Por essa razão, as três espécies foram agrupadas na espécie *R. leguminosarum*, identificando-se a especificidade por meio dos biovares *viciae, trifolii* e *phaseoli*, respectivamente (Jordan, 1984). A transferência do plasmídio simbiótico entre os biovares lhes confere a habilidade de nodulação cruzada dos hospedeiros.

Rlp, porém, era um grupo muito heterogêneo de isolados (Beynon & Josey, 1980; Roberts et al., 1980; Catteau et al., 1984), tendo sido dividido em Tipos I e II, de acordo com a presença ou ausência, respectivamente, de múltiplas cópias (reiterações) de seqüências de DNA ligadas à fixação de nitrogênio e de acordo com a capacidade de nodular outros hospedeiros (Martinez et al., 1985; Flores et al., 1987). Inicialmente, pensou-se que as múltiplas cópias desses genes representassem uma vantagem evolutiva para Rlp (Martinez et al., 1985; Romero et al., 1988), mas depois observou-se que as reiterações estão relacionadas à constante variabilidade de diversos fenótipos de Rlp (Soberón-Chavez et al., 1986; Flores et al., 1988).

Os estudos das diferenças entre os Tipos I e II de Rlp levaram Pinero et al. (1988) a concluir que a inclusão de todos os isolados, capazes de nodular o feijoeiro, em uma única espécie ou biovar é uma irrealidade genética, podendo acarretar erros de taxonomia. Os autores sugeriram ainda uma classificação baseada em características genotípicas, e não fenotípicas. Em 1991, Martinez-Romero et al. apresentaram os resultados de laboriosos estudos que culminaram na separação dos isolados do Tipo II em uma nova espécie, *R. tropici* (Rt), definindo assim um novo microsimbionte do feijoeiro com a capacidade de nodular, também, a *Leucaena*. Com essa divisão, todos os isolados capazes de nodular a *Leucaena* e o feijoeiro, e que não apresentam reiterações gênicas, passaram a ser classificados como Rt, enquanto aqueles que nodulam exclusivamente o feijoeiro e apresentam reiterações foram classificados como Rlp.

Recentemente, os Rlp foram novamente subdivididos, dando origem à espécie *R. etli* (Re; Segovia et al., 1993), que agrupa os rizóbios que nodulam exclusivamente o feijoeiro e que foram isolados dos solos do México e das Américas Central e do Sul. Os rizóbios que nodulam apenas o feijoeiro e que foram isolados dos solos da Europa e América do Norte continuam pertencendo à espécie Rlp. Em pouco tempo, portanto, o feijoeiro deixou de ser uma leguminosa de nodulação

específica e se tornou uma das leguminosas de nodulação mais promíscua, o que hoje é confirmado por saber-se que rizóbios isolados de diversas outras leguminosas são capazes de induzir a formação de nódulos eficientes ou ineficientes no feijoeiro (Eardly et al., 1985; Martinez et al., 1985; Bromfield & Barran, 1990; Hungria et al., 1993; Laguerre et al., 1993). As principais características de cada uma das espécies são apresentadas na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1. Principais características das espécies de *Rhizobium* definidas como microsimbiontes do feijoeiro comum.

Espécie de *Rhizobium*	**Origem**	**Hospedeiros**	**Características Ecológicas**
R. l. bv. *phaseoli*	Europa e parte do hemisfério norte	Feijão	Reiterações dos genes *nif*; perdas de eficiência; sensível a estresses ambientais.
R. etli	México e centros de origem do feijão	Feijão	Como Rlp.
R. tropici	Solos tropicais	Feijão *Leucaena*	Sem reiterações; tolerância a temperatura e acidez elevadas; geneticamente estável.

3.2.2. Eficiência simbiótica

Por muito tempo diversos pesquisadores relataram problemas de instabilidade na eficiência nodular das estirpes de rizóbios utilizadas na inoculação do feijoeiro (Flores et al., 1988). Nesse período quase todos os trabalhos eram realizados com estirpes obtidas do exterior, já que não havia disponibilidade de muitos isolados locais com eficiência comprovada. Hoje sabemos que a maioria dessas estirpes eram de Rlp e/ou Re, sujeitas portanto a um elevado grau de instabilidade genética (Soberón-Chavez et al., 1986; Flores et al., 1988), o que pode explicar, pelo menos em parte, a grande variabilidade na nodulação e fixação de nitrogênio pelas estirpes controle. Em vários experimentos realizados no laboratório de microbiologia do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF), da EMBRAPA, as estirpes recomendadas para o feijoeiro foram empregadas como controle nos testes para avaliação e seleção de isolados locais eficientes. Como na maioria dos outros casos, constatou-se variabilidade nesses parâmetros ao longo dos experimentos **(Tabela 3.2)**, dificultando a comparação e seleção dos isolados em teste pela ausência de estirpes-referência confiáveis.

O inoculante comercial para o feijoeiro no Brasil, hoje, é composto por duas estirpes, SEMIA4077 (CIAT899, Rt), proveniente da Colômbia, e SEMIA4064 (UMR1135, Rlp), proveniente de Minnesota, Estados Unidos. Esta última tem mostrado perda da capacidade de nodular e da eficiência em nível de campo, e diversos pesquisadores têm sugerido sua eliminação do inoculante, e sua substituição por uma ou mais novas estirpes, mas de Rt, já que sua maior estabilidade genética, associada a suas outras características favoráveis **(Tabela 3.1)**, apontam o seu potencial para sucesso na

inoculação do feijoeiro, em condições tropicais (Hungria et al., 1993). Os programas atuais para avaliação e seleção de estirpes buscam, portanto, isolados de Rt com alta eficiência na nodulação e fixação de nitrogênio em associação com o feijoeiro.

Tabela 3.2. Nitrogênio total fixado por diferentes estirpes de *Rhizobium* spp., recomendadas para a inoculação do feijoeiro, em associação com plantas de feijão (cv. Negro Argel), crescidas em vasos de Leonard, no CNPAF.

Estirpe	**N total fixado** (mg. pl $^{-1}$)							
	abr./82	jun./82	out./82	jan./83	dez./83	dez./84	jan./85	maio/85
SEMIA476	74	4	88	NT*	NT	NT	NT	NT
SEMIA487	91	67	58	NT	NT	NT	NT	NT
SEMIA491	52	7	39	NT	NT	NT	NT	NT
SEMIA492	111	28	126	63	127	13	23	218
SEMIA4002	99	89	127	59	160	NT	NT	NT
SEMIA4021	87	106	114	NT	NT	NT	NT	NT
SEMIA4026	110	69	41	NT	NT	NT	NT	NT

* NT = não testada.

Uma das características que conferem maior eficiência simbiótica a certos rizóbios é a capacidade de reciclar, através do sistema "uptake hydrogenase" (Hup; Schubert & Evans, 1976), o hidrogênio evoluído durante a fixação de nitrogênio. Esse sistema oxida o hidrogênio produzido e os elétrons recuperados pela reação são devolvidos à cadeia de transporte, conservando energia (Emerich et al., 1979). Essa conservação de energia pode proporcionar um aumento na eficiência da fixação de nitrogênio (Evans et al., 1985). Apesar de há alguns anos Piha & Munns (1987) terem sugerido que se buscassem rizóbios capazes de reciclar hidrogênio para inocular o feijoeiro, só recentemente foi realizado um trabalho em que se identificaram combinações entre genótipos de feijoeiro e rizóbios que expressam a característica Hup (Navarro et al., 1993). Esses autores, entretanto, observaram um efeito significativo da variedade de feijão na atividade Hup, sugerindo que a planta exerce controle sobre a expressão dessa característica bacteriana, o que pode levar a diferentes níveis de eficiência simbiótica, dependendo da combinação estirpe x variedade. Esse tipo de controle foi observado também em ervilha (Dixon, 1972), soja (Gibson et al., 1981) e caupi (van Berkun, 1990). Finalmente, em trabalho recente, van Berkun et al. (1994) demonstraram que o sistema Hup é uma característica marcante de Rt, sendo encontrada com baixa freqüência em Rlp e Re. Isto reforça a necessidade de se buscarem melhores estirpes de Rt para emprego em inoculantes, e de testes dessas estirpes, a nível nacional, em combinação com as diferentes variedades de feijão cultivadas.

3.2.3. Persistência no solo

Um dos conceitos mais antigos em rizobiologia, especialmente no que se refere às características das bactérias inoculadas, é que estas devem ter a habilidade de colonizar o solo e sobreviver ali, na ausência do hospedeiro, até a estação de plantio seguinte. Entretanto, para que isso aconteça, é necessário que as bactérias do inoculante tenham uma alta competência saprofítica para competir (por nutrientes) não apenas com a microflora do solo (microrganismos não-simbióticos), mas também com os rizóbios preestabelecidos no solo (que competem por recursos limitados com o inoculante, por exemplo, o número de sítios infectíveis nas raízes). Na maioria dos solos onde se cultiva o feijoeiro existe uma população naturalizada de rizóbios capazes de nodular a cultura, como demonstraram diversos levantamentos de nodulação espontânea. Por exemplo, em 1982, foi realizada pela equipe do CNPAF uma viagem às regiões produtoras de feijão no Estado de Goiás, com o objetivo de coletarem-se amostras de nódulos para o isolamento de estirpes nativas. Nessa coleta foram encontrados nódulos, em maior ou menor quantidade, em todos os locais visitados, obtendo-se uma coleção de 490 isolados **(Tabela 3.3)**.

Tabela 3.3. Número de isolados de *Rhizobium* spp., isolados de nódulos espontâneos de feijoeiro, coletados em diferentes localidades nas regiões produtoras de feijão no Estado de Goiás, 1982.

Localidade	Número de Isolados
Anicuns	40
Carmo do Rio Verde	45
Caturaí	40
Ceres	14
Firminópolis	39
Goiás	30
Inhumas	49
Itaberaí	39
Itapuranga	71
Itauçú	48
Jaraguá	34
Nazário	10
Uruana	31
Total	490

Recentemente, observou-se nodulação espontânea abundante em plantas de feijão da cultivar Diamante Negro (grupo comercial preto), em Goiás, em um campo que fora pastagem por 40 anos antes da introdução do feijão, e na cultivar Aporé (grupo comercial carioca), em área de produção de feijão sob irrigação onde nunca foi feita a inoculação. Isto confirma a baixa especificidade do feijoeiro, em relação às exigências quanto ao seu microsimbionte, e demonstra as dificuldades que o inoculante tem que enfrentar ao ser introduzido no solo, sugerindo que a resposta à inoculação poderá também depender do histórico de cultivo da área plantada.

Os rizóbios que nodulam o feijoeiro podem ter seus genes de nodulação induzidos por diversos flavonóides liberados pelas sementes e raízes de feijão (Hungria et al., 1992). Não se pode descartar, portanto, a possibilidade dessa indução ocorrer por compostos liberados por outras leguminosas presentes na área de cultivo, na ausência do feijoeiro, ampliando sua gama de hospedeiros alternativos e oferecendo uma vantagem para o estabelecimento e permanência no solo das estirpes inoculadas. Entretanto, isso pode representar um problema no futuro, no evento da pesquisa criar novos inoculantes a serem introduzidos no solo, pois eles terão que competir com aqueles previamente estabelecidos. Talvez a alternativa seja a obtenção de bactérias competitivas (para que consigam beneficiar a cultura quando introduzidas), mas que sejam específicas para o feijoeiro de modo que não sobrevivam no solo de uma estação de plantio para outra. A única exigência seria a reinoculação a cada plantio.

3.2.4. Competitividade nodular

A nutrição nitrogenada das culturas que dependem do nitrogênio fixado está diretamente relacionada à eficiência das bactérias que ocupam os nódulos. Nem sempre os rizóbios naturalizados são os mais eficientes na fixação de nitrogênio (Baldwin & Fred, 1929; Dunham & Baldwin, 1931), contribuindo muito pouco ou nada para a nutrição nitrogenada do feijoeiro. A alternativa, então, é a inoculação das sementes com estirpes mais eficientes (Baldwin & Fred, 1929). Porém, nesses casos, a inoculação das sementes com rizóbios mais eficientes só trará benefícios para a cultura se o inoculante for composto por rizóbios mais competitivos (Nicol & Thornton, 1941). Esse conceito foi proposto há mais de 50 anos, porém, infelizmente, ainda pouco se conhece sobre os mecanismos que conferem maior competitividade a certas estirpes.

Define-se competitividade nodular como a relação entre a representação numérica de uma determinada estirpe de *Rhizobium* no inóculo, e sua representação numérica nos nódulos do hospedeiro. Uma estirpe é considerada competitiva quando, representando menos de 50% do inóculo, ocupa mais de 50% dos nódulos do hospedeiro. Entretanto, a ocupação nodular é uma medida indireta da competitividade de uma estirpe, pois pode ser alterada em conseqüência da dose de inóculo. Em solos com população estabelecida de rizóbios específicos para uma determinada cultura, a inoculação em massa pode resultar em melhor ocupação nodular pelo inoculante, como demonstrado para soja (Dunigan et al., 1984; Weaver & Frederick, 1974) e trevo (Martensson, 1990). Nesses casos, foi necessário empregar uma dose de inoculação (por semente) mil vezes maior que a população do solo, mas nem sempre esse procedimento funciona (Meade et al., 1985).

Os exemplos citados ilustram a complexidade de se obterem respostas à inoculação em solos com população estabelecida. O grupo NifTAL, no Havaí, computou resultados de experimentos de inoculação de leguminosas, realizados em diversos anos e em diversas localidades naquele Estado,

com o objetivo de se estabelecerem modelos matemáticos que permitissem predizer a resposta de uma leguminosa à inoculação levando em consideração a população do solo (Thies et al., 1991a, b). De acordo com os dados, a resposta das leguminosas à inoculação variou com o local e a espécie. A inoculação resultou em aumento significativo da produtividade do feijoeiro em apenas 50% das vezes, principalmente em solos com baixa população de rizóbios específicos ($<100 . g^{-1}$ solo) para a cultura (Thies et al., 1991a). Em trabalho subseqüente, os autores observaram que, na ausência de rizóbios naturalizados no solo, a magnitude da resposta à inoculação é diretamente proporcional à disponibilidade de N no solo, e desenvolveram um modelo matemático para prever a resposta à inoculação, levando em conta a população nativa de rizóbios e o N do solo (Thies et al., 1991b).

Como dito anteriormente, é muito difícil encontrarem-se plantas de feijão sem nódulos. Além disso, o caráter de promiscuidade nodular do feijoeiro é mais uma barreira a ser transposta para que a inoculação tenha sucesso. É preciso, portanto, que num primeiro passo na busca de inoculantes mais eficientes, seja feito um levantamento qualitativo e quantitativo da população naturalizada de rizóbios; é preciso que se conheça bem o "inimigo" para elaborar a melhor estratégia numa batalha. Os resultados conhecidos, por exemplo, não deixam claro se Rt é intrinsecamente mais ou menos competitivo que Rlp/Re, pois são contraditórios (Martinez-Romero & Rosenblueth, 1990; Streit et al., 1992; Straliotto et al., 1992). A competitividade relativa entre Rt e Rlp/Re pode, também, ser alterada de acordo com as condições do solo (Wolff et al., 1991). A maioria dos levantamentos indica que 90% da população dos solos onde o feijoeiro é cultivado é composta por Rlp ou Re (Martinez et al., 1985, 1988; N.M.H.Sá, comunicação pessoal), mas ainda faltam dados sobre levantamentos de nódulos provenientes de plantas cultivadas em solos onde nunca houvera feijão. Provavelmente serão necessárias estratégias diferentes caso a inoculação vá ser feita em um solo onde predomina Rt ou Rlp/Re.

3.2.5. Tolerância a estresses

O feijoeiro nodulado é extremamente sensível a estresses, tais como alta temperatura e baixo pH do solo, associado ou não a níveis tóxicos de Al^{3+} (Piha & Munns, 1987). Uma das alternativas para se buscar melhor resposta à inoculação nessas condições seria, portanto, a inoculação com estirpes tolerantes à alta temperatura e/ou acidez do solo, de acordo com cada situação. Em um trabalho preliminar, Hungria & Franco (1993) não encontraram nenhuma estirpe de Rlp que mantivesse a fixação de nitrogênio ativa a 35°C ou 38°C. Em contrapartida, Cunha & Franco (1988) haviam observado que as árvores *Leucaena leucocephala* e *Prosopis juliflora*, inoculadas com estirpes tolerantes à alta temperatura, mantinham uma fixação ativa a 35°C e 38°C. Sabendo que certas estirpes, isoladas dessas e outras árvores, são capazes de nodular e fixar nitrogênio em associação com o feijoeiro, Hungria et al. (1993) observaram fixação de nitrogênio a 40°C, sob condições controladas, pelo feijoeiro inoculado com estirpes de Rt, sugerindo que essas estirpes têm potencial para melhorar a resposta à inoculação em áreas tropicais sujeitas a temperaturas elevadas, como observado por Karanja & Wood (1988a) e Sá et al. (1993).

Os efeitos da acidez do solo são notados tanto sobre a planta quanto sobre seus simbiontes. Em solos ácidos, a sobrevivência dos rizóbios é comprometida, o que acarreta redução na nodulação. Há resultados na literatura que demonstram que algumas estirpes de Rt são resistentes à ação da acidez e do alumínio (Cunningham & Munns, 1984; Graham et al., 1982; Karanja & Wood, 1988b;

Vargas & Graham, 1988), tendo sido mais competitivas na nodulação do feijoeiro cultivado sob condições de acidez elevada (Ramos et al., 1987; Vargas & Graham, 1989; Wolff et al., 1993). Esses resultados reforçam a potencialidade da inoculação do feijoeiro com estirpes de Rt nos solos tropicais, e justificam a busca dessas estirpes para a composição do inoculante comercial.

Além dos efeitos nocivos da temperatura e acidez elevadas, os rizóbios inoculados estão sujeitos a outros tipos de estresse, como deficiência hídrica e salinidade do solo, e a estresses bióticos como, por exemplo, a presença, no solo, de antibióticos ou outras substâncias tóxicas produzidas por membros da microflora do solo. Em relação à salinidade, Santos et al. (1990) observaram resposta à inoculação do caupi (*Vigna unguiculata*) com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. previamente selecionadas como tolerantes a alto nível de salinização. Essas observações sugerem que a inoculação é viável, e as respostas positivas, quando se empregam as plantas e bactérias apropriadas para cada condição. O papel mais importante da pesquisa é identificar essas combinações.

3.3. A Planta Hospedeira

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) teve origem no continente americano, tendo sido levado ao Velho Mundo como planta ornamental após o descobrimento da América (Zimmermann & Teixeira, 1988). Dois centros de origem/domesticação foram definidos para o feijoeiro comum, um na Mesoamérica e outro na zona Andina (para revisões veja Gepts, 1988; Debouck & Tohme, 1989). Os materiais originados desses centros apresentam variações em caracteres morfológicos como tamanho da semente, idade de floração, hábitos de crescimento, em marcadores moleculares como a faseolina, isoenzimas e DNA mitocondrial, e na efetividade da simbiose com o *Rhizobium* (Kipe-Nolt et al., 1992). A posição sistemática do gênero *Phaseolus*, conforme Vilhordo et al. (1988) é apresentada a seguir.

Divisão: *Angiospermae*
Classe: *Dicotyledoneae*
Subclasse: *Archichlamydae*
Ordem: *Rosales*
Subordem: *Leguminosineae*
Família: *Leguminosae (Fabaceae)*
Subfamília: *Faboideae*
Tribo: *Phaseoleae*
Subtribo: *Phaseolineae*
Gênero: *Phaseolus*

O gênero *Phaseolus* compreende mais de 100 espécies diplólides (2n = 22), mas apenas quatro delas, *P. vulgaris* L., *P coccineus* L., *P. acutifolius* Gray var. *latifolius* Freem e *P. lunatus* var. *lunatus,* são cultivadas comercialmente (Zimmermann & Teixeira, 1988). Neste capítulo é discutida a espécie cultivada de maior importância econômica, *P. vulgaris* L.

3.3.1. Hábitos de crescimento

O feijoeiro comum apresenta quatro tipos de planta, classificados de acordo com o hábito de crescimento (Vilhordo et al., 1980):

Tipo I - crescimento determinado, porte arbustivo, com ramificação ereta, fechada;
Tipo II - crescimento indeterminado, porte semi-arbustivo, com ramificação ereta, fechada;
Tipo III - crescimento indeterminado, porte semi-arbustivo, com ramificação aberta;
Tipo IV - crescimento indeterminado, porte prostrado ou trepador.

A duração do ciclo da cultura varia com o hábito de crescimento, tendo as cultivares do Tipo I o ciclo mais curto, cerca de 60 a 70 dias do plantio à colheita (cultivares precoces) e as do Tipo IV o ciclo mais longo, com mais de 100 dias do plantio à colheita (cultivares tardias). As cultivares dos Tipos II e III apresentam ciclos intermediários, durando cerca de 80 a 100 dias do plantio à colheita, de acordo com a cultivar e com as condições ambientais.

Graham & Halliday (1977), Graham & Rosas (1977) e Graham (1978) demonstraram diferenças entre cultivares na habilidade de fixar nitrogênio no campo; nesses estudos, os autores observaram que as cultivares trepadoras (Tipo IV) eram consistentemente superiores às demais na nodulação e fixação de nitrogênio, enquanto as do Tipo I eram consistentemente inferiores (**Tabela 3.4** e **Figura 3.1**). Variabilidade genotípica também foi demonstrada por Westerman & Kolar (1978) e Pereira et al. (1984), que sugeriram que tal variabilidade poderia servir de base para o melhoramento genético dessa característica no feijoeiro.

Tabela 3.4. Parâmetros da fixação de nitrogênio em oito cultivares de feijoeiro comum, com diferentes hábitos de crescimento, quando cultivadas no campo. Adaptada de Graham (1981).

Cultivar	Hábito de Crescimento	Idade de Floração (dias)*	Peso de Nódulos (mg. pl^{-1})**	Ativ. Red. de Acetileno ($\mu mol\ C_2H_4 \cdot pl^{-1} \cdot h^{-1}$)**
P635	I	42	8,8	0,8
P536	I	41	73,4	10,0
P417	II	55	23,1	7,5
P561	II	43	69,1	8,8
P589	III	60	46,9	8,5
P498	III	50	118,4	32,2
P717	IV	48	99,3	17,4
P590	IV	66	545,6	37,7

* Tempo até que 50% das plantas apresentassem pelo menos uma flor aberta.
** Valores máximos obtidos para cada parâmetro durante o ciclo.

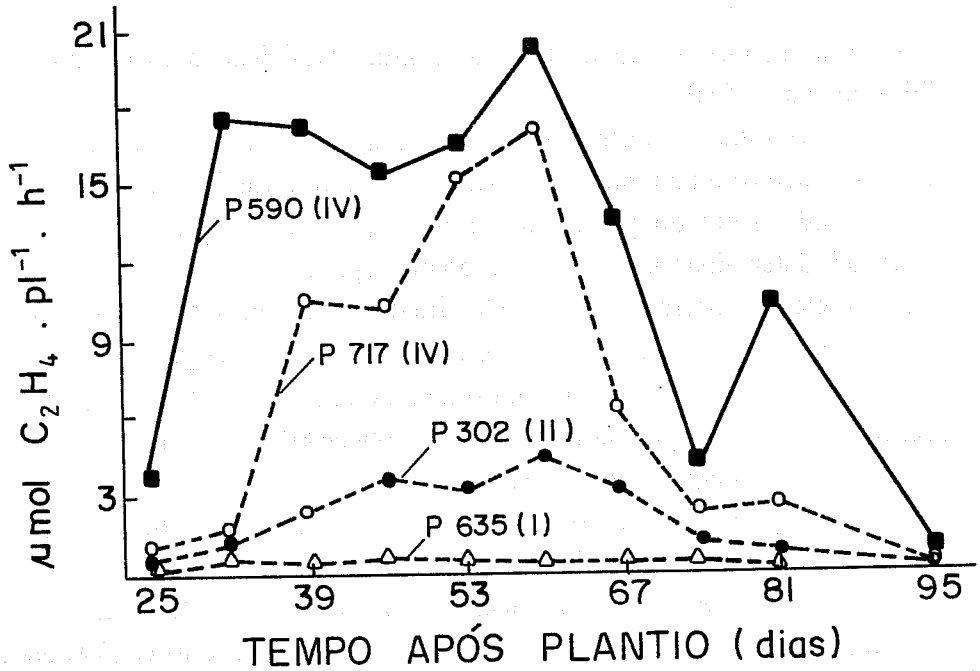


Figura 3.1. Perfil da fixação de nitrogênio (redução do acetileno) ao longo do ciclo de quatro variedades de feijão, com diferentes hábitos de crescimento (indicado entre parênteses). Segundo Graham (1981).

Recentemente, Hardarson et al. (1993) compilaram e analisaram resultados de experimentos realizados em todo o mundo visando a quantificação da fixação de nitrogênio pelo feijoeiro em simbiose, e observaram que nos diferentes experimentos o feijoeiro fixou de 35% a 70% do nitrogênio total encontrado nas plantas **(Tabela 3.5)**, sendo os valores mais altos obtidos quando as condições ambientais eram favoráveis ao desenvolvimento da cultura. Os autores observaram ainda que, em geral, as cultivares com tipos mais indeterminados e trepadores fixaram mais nitrogênio que as cultivares de hábito determinado, mas que entre estas últimas, aquelas com maturação ligeiramente mais tardia podem fixar um pouco mais que as mais precoces. Esses resultados indicam que há possibilidade de se melhorar a fixação de nitrogênio pelo feijoeiro através de uma seleção criteriosa e do melhoramento genético.

Vários trabalhos já foram realizados na tentativa de se elucidarem as causas das diferenças no potencial de fixação de nitrogênio por diferentes sistemas simbióticos, e os resultados de alguns deles podem ser aplicados ao feijoeiro. Os trabalhos de Lawrie & Wheeler (1973), Minchin & Pate (1973), Lawn & Brun (1974), Streeter (1974), Hardy & Havelka (1976) Herridge & Pate (1977), Mahon (1977) e Wilson et al. (1978) indicaram que a disponibilidade de carboidratos, provenientes da fotossíntese, para os nódulos, é um dos fatores mais limitantes à fixação de nitrogênio. No feijoeiro, cultivares trepadoras parecem transferir mais carboidratos para os nódulos que as cultivares com outros hábitos de crescimento (Graham, 1981). Graham & Rosas (1977) observaram que as cultivares de porte arbustivo, logo após a germinação, absorvem N do solo mais rapidamente que as trepadoras, o que pode reduzir o suprimento de carboidratos aos nódulos (Small & Leonard, 1969), diminuindo a fixação de nitrogênio.

Tabela 3.5. Variabilidade na fixação de nitrogênio por cultivares de feijão testadas em diversas localidades. Segundo Hardarson et al. (1993).

Localidade	Ano	NDAr* (%)	Fixação (kg . ha^{-1})	N° de cultivares
Áustria	1987	27-67	25-165	29
Brasil, Goiânia	1987	12-25	4-12	17
Piracicaba	1987	12-25	11-53	7
Chile	1987	38-60	27-62	21
	1988	27-60	25-115	12
Colômbia	1985	32-47	18-36	9
Guatemala	1989 (Verão)	69-73	92-125	10
	1989 (Inv.)	22-57	12-50	10
México, Irapuato	1987	5-58	7-108	20
Colima	1988 (Inv.)	0-50	0-70	17
Peru	1986 (Inv.)	24-56	15-59	20
	1988 (Verão)	13-56	7-81	22

* Nitrogênio total derivado do ar pela fixação simbiótica.

3.3.2. Ciclo da cultura

A duração do ciclo da cultura e, conseqüentemente, do período ativo de fixação de nitrogênio pode influenciar o resultado final. Por exemplo, Zapata et al. (1987a) observaram que a soja tem fixação inicial limitada, com a parte mais substancial ocorrendo aos 74 dias após o plantio; ao final do ciclo, 50% do N na soja foi proveniente da fixação. Já em fava (*Vicia faba*), a fixação mais expressiva ocorreu dos 60 aos 110 dias após o plantio, e a cultura terminou o ciclo com 75% do N proveniente da fixação (Zapata et al., 1987b). Em feijão, Franco et al. (1979) observaram que a fixação de nitrogênio, medida pela redução do acetileno (Hardy et al., 1968) foi baixa durante as duas primeiras semanas após o plantio, com um pico na floração e subsequênte queda acentuada. Teoricamente, portanto, plantas que comecem a fixar nitrogênio mais cedo e mantenham um período de fixação ativa mais longo poderão se beneficiar com maior quantidade de N fixado incorporado nas vagens.

A eficiência da fixação de nitrogênio pelo feijoeiro pode ser afetada pela idade em que as plantas começam a translocar o N fixado para as vagens (Peña-Cabriales et al., 1993), o que também ocorre na soja e caupi (Hungria &Neves, 1987; Neves & Hungria, 1987), que, por sua vez, depende dos genótipos da planta e da bactéria. As vagens em desenvolvimento podem competir por produtos da fotossíntese e reduzir o crescimento nodular e a fixação de nitrogênio (Lawn & Brun, 1974). Entre-

tanto, Hansen et al. (1993a) observaram que a remoção dos frutos em formação, de plantas de feijão, a partir dos 37 dias após o plantio, estimulou a respiração nodular e não afetou a eficiência dos nódulos, sugerindo que a atividade simbiótica não foi negativamente afetada pela competição por carboidratos entre os nódulos e os frutos. Os autores concluiram ainda que a precocidade da reprodução no ciclo do feijoeiro não parece ser responsável pela performance inadequada de fixação de nitrogênio no campo.

Em um estudo do desenvolvimento da fixação de nitrogênio pelo feijoeiro, Peña-Cabriales et al. (1993) observaram que a maior taxa de assimilação de nitrogênio ocorreu durante a fase reprodutiva, coincidindo com o período em que a quantidade e a atividade dos nódulos da coroa da planta decresceram. Os autores sugeriram que essa contradição poderia ser explicada pela fixação ocorrida nos nódulos formados nas raízes secundárias do feijoeiro (nodulação mais tardia), que seria essencial para suprir a planta com N, o que foi posteriormente confirmado por Hardarson et al. (1989) e Wolyn et al. (1989).

Uma estratégia para melhorar a fixação de nitrogênio pelo feijoeiro seria a extensão do período de atividade fixadora, buscando-se combinações de planta e bactéria capazes de suportar uma nodulação efetiva precoce e de manter os nódulos em atividade por mais tempo. A nodulação efetiva precoce já foi observada e apontada como um fator que aumenta a fixação de nitrogênio pelo feijoeiro por diversos autores (Hungria & Thomas, 1987; Barradas & Hungria, 1989; Barradas et al., 1989; Chaverra & Graham, 1992; Kipe-Nolt et al., 1993; Kipe-Nolt & Giller, 1993). Se os nódulos formados nas raízes secundárias têm papel importante na fixação de nitrogênio pelo feijoeiro, cabe à pesquisa determinar maneiras de fazer com que o inoculante atinja essas raízes, garantindo assim que esses nódulos sejam formados por estirpes mais eficientes que as do solo.

3.3.3. Número de nódulos

Em um trabalho pioneiro, Döbereiner (1966a) demonstrou que havia uma correlação positiva e significativa entre a quantidade de tecido nodular ativo e a quantidade de nitrogênio acumulado em plantas de feijão dependentes do N fixado. Posteriormente, Wadisirisuk & Weaver (1985) observaram a mesma correlação em caupi. Essas observações sugerem que uma estratégia que resulte em mais nódulos por planta pode contribuir com maior fixação de nitrogênio para a cultura. Recentemente, Pereira et al. (1993) demonstraram ser possível aplicar técnicas convencionais de melhoramento genético para obterem-se plantas de feijão com maior nodulação, e que o ganho genético em número de nódulos é acompanhado por ganho na quantidade de nitrogênio fixado **(Tabela 3.6)**. Os autores sugerem que um dos benefícios advindos da maior suscetibilidade à nodulação seria a formação de maior número de nódulos nas raízes secundárias que, segundo Wolyn et al. (1989), contribuem com uma grande proporção do N fixado pelo feijoeiro.

A correlação entre a maior nodulação e o aumento na fixação de nitrogênio pelo feijoeiro, entretanto, não é linear. Hansen et al. (1993) observaram que uma mutante supernodulante de feijoeiro apresentou uma massa nodular duas vezes maior e um número de nódulos seis vezes maior que os parentais. Entretanto, a fixação de nitrogênio foi quase igual, sugerindo que a supernodulação resulta em formação de nódulos menores, com menor eficiência relativa. São necessários estudos mais detalhados das plantas com maior número de nódulos, no sentido de se quantificar, no campo, sua fixação de nitrogênio e a contribuição dessa fixação para o aumento da produtividade da cultura.

Tabela 3.6. Nodulação de plantas de feijão após três ciclos de seleção visando o aumento do número de nódulos. Segundo Pereira et al. (1993).

Ciclo/População*	N°Nód (% Cont.)**	Peso Nód-mg/pl (% Cont)	N Fixado ($kg \cdot ha^{-1}$)
C_0			
Controle (Med.pais)	102 (100)	134 (100)	43
População Total	94 (92)	138 (103)	ND
Indiv. Selecionados	130 (127)	153 (114)	ND
C_1			
Controle (Med. pais)	158 (100)	226 (100	ND
População Total	162 (102)	269 (119)	ND
Indiv. Selecionados	235 (149)	304 (135)	44
C_2			
Controle (Med. pais)	111 (100)	151 (100)	ND
População Total	175 (158)	210 (139)	ND
Indiv. Selecionados	234 (211)	242 (160)	53

* C_0, C_1 e C_2 são ciclos de seleção correspondentes à população basal (C_0) e dois ciclos de recombinações através de intercruzamentos (C_1 e C_2).
** Porcentagem em relação ao controle.

3.3.4. Seletividade nodular

Alguns genótipos de soja carregam genes que lhes conferem a habilidade de restringir a nodulação de suas raízes por bactérias de determinados sorogrupos encontrados nos solos (ver capítulo anterior). Essa habilidade foi logo vista pelos microbiologistas como mais uma arma para solucionar o problema da falta de competitividade dos inoculantes, pois através de melhoramento poderia ser possível manipular o hospedeiro de forma a alterar a especificidade na nodulação, favorecendo a ocupação dos nódulos por estirpes melhoradas, em solos onde predominem estirpes de sorogrupos que são excluídos dos nódulos pelo hospedeiro (Devine & Weber, 1977; Devine & Breithaupt, 1980).

No feijoeiro e em outras leguminosas, esse tipo de especificidade não é conhecido. Entretanto, conhecem-se casos em que a planta exerce controle sobre a velocidade com que os nódulos são iniciados por determinadas estirpes, como no trevo (Jonas & Hardarson, 1979), soja (Cregan & Keyser, 1986) e alfafa (Hardarson et al., 1982). Em trabalho recente, em que foram avaliados 50 genótipos de feijoeiros selvagens e cultivados, Kipe-Nolt et al. (1992) observaram uma tendência dos genótipos de origem Mesoamericana em nodular mais rapidamente com Rlp do que com Rt. Em contrapartida, alguns dos genótipos de origem Andina tenderam a nodular mais rapidamente com Rt. Esses resulta-

dos indicam a importância do germoplasma selvagem, como fonte de características desejáveis a serem transferidas para as variedades cultivadas, e sugerem uma interessante linha de estudos que merece mais atenção, uma vez que pode oferecer uma solução simples para um problema tão complexo.

Um outro aspecto interessante é a aparente capacidade de certas cultivares em selecionar, dentro da população de rizóbios do solo, aqueles mais eficientes na fixação de nitrogênio. Esse tipo de seletividade foi observado recentemente com a cultivar de feijão Aporé. Durante dois anos, em experimentos realizados em área de um produtor de feijão em Jussara - GO, Pereira e colaboradores não observaram resposta daquela cultivar à inoculação ou à adubação nitrogenada, obtendo boa produtividade (dados não publicados). Essa ausência de resposta à adubação nitrogenada e à inoculação pelo feijoeiro pode refletir uma de duas possibilidades: a) o solo é rico em nitrogênio, ou b) os rizóbios nativos são eficientes o suficiente para promover a produtividade da cultura.

Na tentativa de elucidar essa situação foi conduzido naquela propriedade um experimento que incluiu uma linhagem não-nodulante de feijoeiro como testemunha (Araujo, dados não publicados). Se o solo fosse rico em nitrogênio, a linhagem não-nodulante não deveria responder à adubação nitrogenada, ao passo que se o solo fosse rico em rizóbios eficientes deveria haver resposta à adubação. Naquelas condições, a cultivar Aporé não respondeu à adubação ou à inoculação, enquanto a linhagem não-nodulante apresentou resposta linear à adubação nitrogenada **(Tabela 3.7)**. Esses dados sugerem que há possibilidade de se obterem boas produtividades com a fixação de nitrogênio, desde que se utilizem variedades apropriadas, cultivadas nas condições adequadas. A capacidade das cultivares atualmente recomendadas para cultivo em nodular com os rizóbios do solo merece estudos.

Tabela 3.7. Produtividade do feijoeiro irrigado em resposta à adubação nitrogenada em um solo arenoso em Jussara-GO, 1993.

Adubação*	**Produtividade** (kg. ha^{-1})**	
	Linhagem NORH 54***	Variedade Aporé
PK	902 b	2157
NPK	1314 ab	2008
NPK + N	1578 a	2258

* PK = 80 kg de P_2O_5 . ha^{+} e 60 kg de K_2O . ha^{+}; NPK = PK + 30 kg de N . ha^{+} no plantio; NPK + N = NPK + 30 kg de N . ha^{+} em cobertura.

** Números seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (α = 0,05).

*** Linhagem não-nodulante de feijão.

3.3.5. Nodulação na presença de N no solo

Os efeitos negativos do nitrogênio combinado sobre o número e o tamanho dos nódulos de leguminosas são conhecidos há muitos anos (Fred & Graul, 1916; Strowd, 1920), sendo posteriormente observados efeitos negativos sobre a massa e a atividade do tecido nodular, sugerindo múltiplos efeitos sobre os sistemas simbióticos (Streeter, 1988). Uma forma de aliviar esse problema é o conhecimento dos mecanismos que causam efeitos negativos, com a conseqüente busca de maneiras para saná-los. Uma outra alternativa é a busca de genótipos de plantas e bactérias que tolerem a presença do nitrogênio combinado, estabelecendo uma simbiose funcional.

Em um screening de genótipos de soja, Herridge & Betts (1988) encontraram alguns que foram capazes de nodular e fixar nitrogênio quando cultivados em solo rico em N. Os autores sugeriram que esses genótipos representavam boas fontes de características desejáveis a serem introduzidas através de programas de melhoramento. Recentemente, Francisco Jr. & Akao (1993) observaram que a habilidade da soja nodular na presença de N é regulada pela parte aérea da planta, por um mecanismo que também afeta a resposta autoreguladora da nodulação. A alteração nesses mecanismos dá origem a plantas mutantes supernodulantes, capazes de suprir uma possível inibição da fixação de nitrogênio pelo N combinado com a produção de maior massa nodular.

Em estudos sobre o microsimbionte da alfafa, *R. meliloti*, Dusha et al. (1989) observaram que os genes ligados à iniciação da nodulação, *nodABC*, têm sua expressão regulada pela presença de N, e obtiveram mutantes capazes de nodular a alfafa na presença de amônia. O mesmo tipo de regulagem foi sugerido para *Bradyrhizobium japonicum* por Wang & Stacey (1990). Nelson (1983) observou diferenças entre estirpes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* no grau de inibição da atividade da nitrogenase na presença de N combinado, sugerindo a possibilidade de se aumentar a fixação de nitrogênio em ervilha pela seleção de rizóbios tolerantes ao nitrogênio.

Em feijão, entretanto, não se conhecem mutantes supernodulantes ou mesmo indicações precisas de que algum genótipo de planta ou estirpe seja capaz de nodular normalmente na presença de N no solo. Os relatos de efeitos do N combinado na simbiose do feijoeiro são contraditórios. Franco & Döbereiner (1968), por exemplo, observaram que a aplicação de uma dose equivalente a 20 kg de N . ha^{-1} proporcionou um aumento substancial na nodulação, enquanto Trinchant & Rigaud (1984) demonstraram que a aplicação de N - nitrato na concentração de 3,5 mM causou uma redução no fornecimento de poder redutor para a dinitrogenase, contribuindo para uma redução na fixação de nitrogênio. Mais recentemente, Silva et al. (1993) observaram que a aplicação foliar de nitrogênio para o feijoeiro inoculado foi menos supressiva que a aplicação ao solo, e obtiveram aumento significativo na nodulação e atividade da nitrogenase com esse tratamento. Os autores sugeriram que deve haver possibilidade de se aumentar a fixação de nitrogênio pelo feijoeiro com a aplicação de "doses homeopática" de nitrogênio por via foliar.

Esses dados coincidem com algumas observações empíricas da nodulação espontânea da cultivar Aporé, em área de cultivo sob irrigação com pivô central, em Jussara - GO. Nessa propriedade não foi feita a inoculação das sementes e o feijão foi plantado com uma adubação de 600 kg . ha^{-1} da fórmula 4-30-16 (equivalente a cerca de 24 kg de N . ha^{-1}) e recebeu adubações foliares semanais (cerca de oito) com 10 kg de N . ha^{-1} (uréia). Foi encontrada nodulação abundante e efetiva (nódulos com coloração interna vermelha) em todas as 100 plantas coletadas ao acaso dentro do pivô (dados

não publicados), sugerindo a possibilidade de se estar trabalhando com uma variedade de feijão capaz de suportar nodulação e fixação de nitrogênio satisfatórias na presença de N combinado. Mais estudos são necessários para que essas situações possam ser elucidadas.

Finalmente, foi observado por Sanjuan & Olivares (1989) que um dos plasmídios da estirpe GR4 de *R. meliloti* (Rm) carrega uma seqüência de DNA denominada *nfe* (*n*odule *f*ormation *e*fficiency), cuja expressão está sob controle da expressão da região *nifA* (ligada à sintese da dinitrogenase - ver capítulo anterior) que, por sua vez, é regulada pela concentração de N no meio. A expressão de *nfe* aumenta a competitividade nodular da estirpe GR4. Apesar de não ter sido encontrada em outras estirpes de Rm, essa região genética oferece uma fascinante idéia para a manipulação da competitividade de outras estirpes de *Rhizobium*. Por exemplo, bactérias que contenham a região *nfe* e que sejam capazes de nodular e fixar nitrogênio normalmente na presença de N combinado, poderão ter vantagens competitivas sobre os rizóbios do solo, permitindo resposta à inoculação em solos com população estabelecida. Essa linha de pesquisa merece mais atenção.

3.4. Fatores Externos que Afetam a Simbiose *Rhizobium* x Feijoeiro

Em termos agrícolas, não basta que haja disponibilidade das melhores variedades de uma determinada cultura para garantir a produtividade; é necessário que se proporcionem às culturas as condições de cultivo adequadas, de acordo com recomendações técnicas, para se atingir o potencial de produtividade em cada caso. O feijoeiro nodulado, como todas as culturas, requer condições ideais de umidade, fertilidade e preparo do solo, temperatura e controle de pragas e doenças para que a produção seja satisfatória. São apresentadas a seguir informações sobre alguns aspectos agronômicos relevantes.

3.4.1. Preparo e fertilidade do solo

As exigências nutricionais das plantas noduladas são maiores que as daquelas que recebem N mineral, pois há necessidade de manter não apenas a planta e o rizóbio, mas também de atender a requerimentos específicos do sistema simbiótico. O feijoeiro sempre foi caracterizado como cultura de subsistência, sendo cultivado em pequenas propriedades e nas áreas de solos mais férteis dessas propriedades (Moraes, 1988). Entretanto, a necessidade de aumentar a produção de alimentos e a garantia de um mercado consumidor têm animado produtores a expandir a área cultivada, inclusive com o investimento de capital em preparo e correção do solo, mecanização e irrigação complementar. Essas práticas já são uma meia garantia de aumento na produtividade do feijoeiro, principalmente se associadas ao plantio de cultivares modernas e mais produtivas.

Em relação ao preparo do solo, todas as culturas sofrem redução no crescimento do sistema radicular em decorrência de compactação das camadas subsuperficiais do solo. A formação dessa camada ocorre principalmente em solos de textura pesada, devido ao excesso de mecanização, sendo as gradagens grandes responsáveis pela formação do chamado "pé-de-grade". O sistema radicular truncado pelo pé-de-grade representa menor área para ser nodulada, além de sujeitar a planta a estresses como deficiência hídrica e desnutrição, uma vez que as raízes, que se concentram nas camadas mais superficiais do solo, não conseguem buscar água e nutrientes suficientes. O plantio direto ou cultivo mínimo é uma alternativa para se reduzirem os problemas físicos do solo, e tem sido testado com

relativo sucesso na cultura do feijão. Entretanto, faltam resultados concretos de trabalhos de pesquisa para que essa prática se torne uma recomendação para a cultura.

A adubação recomendada para a cultura do feijão no Brasil pode ser generalizada em cerca de 250 kg de uma fórmula do tipo 4-30-16 por hectare, adicionada de zinco, principalmente nos solos de cerrado, e de outros micronutrientes de acordo com as necessidades detectadas pela análise do solo. A adubação nitrogenada recomendada para o feijoeiro é, em média, de 60 kg de N . ha^{-1}, sendo normal a aplicação de metade da dose no plantio e a outra metade em cobertura, dividida ou não em duas ou mais parcelas. A resposta da cultura a essa adubação vai depender da cultivar plantada. Em diversos experimentos recentes, por exemplo, constatou-se que a cultivar Aporé não parece responder à adubação nitrogenada ou, se responde, o incremento na produção em relação às plantas noduladas por estirpes nativas ou pelo inoculante é questionável, muitas vezes não compensando a adubação **(Tabela 3.8.)**. Por essa razão, tem-se recomendado que seja eliminada a adubação nitrogenada no plantio em favor da inoculação das sementes, fazendo-se uma adubação de cobertura durante a fase vegetativa (**Figura 3.2**), caso a cultura apresente sintomas de deficiência de nitrogênio. No caso de adubos formulados, já contendo nitrogênio, os estudos preliminares indicam que essa dose de N não é alta o suficiente para inibir a formação dos nódulos, mas há necessidade de mais estudos para confirmar tais resultados.

Tabela 3.8. Produtividade da cultivar de feijão Aporé, em ensaios em rede realizados no Estado de Goiás, plantio da seca, 1993.

Localidade	**Produtividade** (kg . ha^{-1})*		
	S/ Inoculação	C/ Inoculação	NPK**
Pirenópolis	2181	2136	2154
Goianira	2094	2113	2252

* Médias de quatro repetições.

** Adubação com 30 kg de N . ha^{1} no plantio + 30 kg de N . ha^{1} em cobertura.

Os solos tropicais são conhecidamente pobres em fósforo. Por isso, a adubação fosfatada no plantio é fundamental para a produtividade do feijoeiro. Quanto ao feijoeiro inoculado, a recomendação não é diferente, já tendo sido apontado por vários autores que em experimentos onde se pretende estudar o desempenho de leguminosas inoculadas é imprescindível que a cultura disponha de níveis adequados de todos os nutrientes (Cassman et al., 1981; França et al., 1973; Gates & Wilson, 1974; Hernandez & Focht, 1985; Lynd & Ansman, 1989, 1990). Em trabalho recente, Tsai et al. (1993) observaram que a nodulação e a fixação de nitrogênio pelo feijoeiro respondeu positivamente ao aumento nos níveis de P, K e S do solo, e que quando o feijoeiro recebeu um balanço adequado de nutrientes, não houve inibição, mas sim um efeito sinergístico da adubação nitrogenada sobre a nodulação e fixação do nitrogênio.

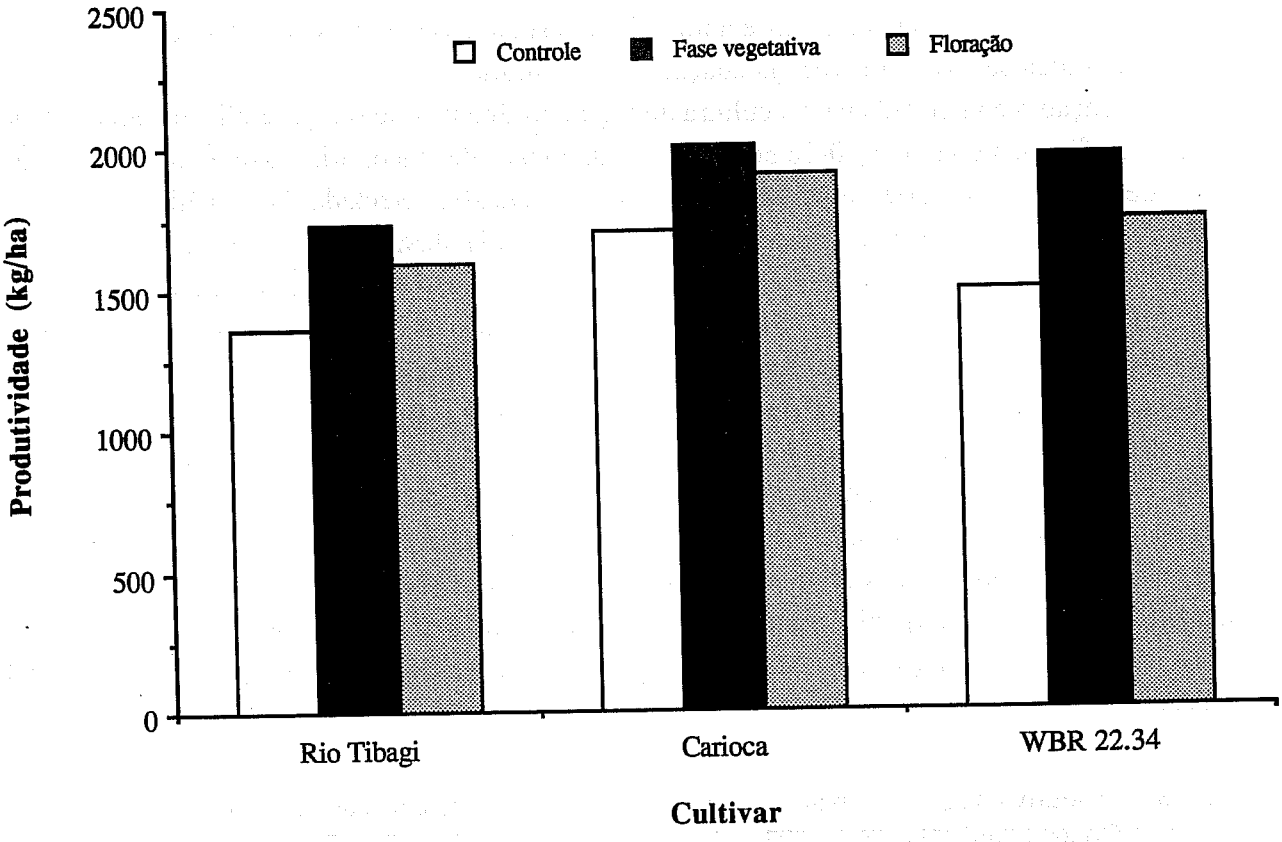


Figura 3.2. Produtividade do feijoeiro inoculado, resultante da realização de adubação nitrogenada em cobertura, em diferentes fases do ciclo da cultura.

Em relação aos micronutrientes, o molibdênio tem papel vital na fixação de nitrogênio pelos rizóbios e na assimilação do nitrato absorvido do solo pela cultura (Marschner, 1986). A maioria dos solos dispõe de teores adequados de molibdênio, porém as interações do elemento com a acidez do solo muitas vezes o tornam indisponível ao feijoeiro. Recente trabalho realizado em Minas Gerais (Vieira et al., 1992) demonstrou que a aplicação foliar de 20 g de Mo . ha^{-1} resultou em aumentos significativos da produtividade do feijoeiro inoculado, substituindo parcial ou completamente a adubação nitrogenada nas condições do ensaio. Entretanto, esses resultados não podem ser generalizados, pois as respostas vão depender das condições de cada local de cultivo. Com efeito, em ensaios em rede nacional para verificar a resposta da cultura à adubação foliar com molibdênio, somente em Viçosa (MG) e no Espírito Santo têm sido observadas respostas positivas (dados não publicados). Mais estudos são necessários antes que se possa recomendar essa prática para a cultura.

3.4.2. Acidez do solo

O feijoeiro, por ser uma planta sensível à acidez do solo, não cresce nem produz bem em solos ácidos (Moraes, 1988). Este tipo de solo, além das deficiências em Ca e Mg, pode apresentar outros problemas, como níveis altos de alumínio e manganês. As informações a respeito da tolerância do feijoeiro à acidez são relativamente escassas. Há relatos que o pH ótimo para o crescimento da planta

situa-se entre 5,5 e 6,7 (Malavolta, 1976; Munns & Fox, 1976), e que o feijoeiro é intolerante a níveis de Al trocável acima de 3 ppm (Ruschel et al., 1968; Abruna et al., 1975). Entretanto, existem diferenças entre cultivares de feijoeiro quanto à tolerância ao Al (Foy et al., 1967; Spain et al., 1975; Miranda & Lobato, 1978), e entre os rizóbios quanto à tolerância ao pH, ao Al e ao Mn (Graham & Parker, 1964; Döbereiner, 1966; Graham et al., 1982; Cunningham & Munns, 1984; Karanja & Wood, 1988a, b; Vargas & Graham, 1988).

Dados de levantamentos de nodulação espontânea em feijoeiros cultivados no Estado de Goiás demonstram que a nodulação é mais abundante quando as plantas são crescidas em pH mais próximo da neutralidade **(Figura 3.3)**. Essas observações sugerem que o pH do solo afeta a quantidade de rizóbios disponíveis para nodular a planta hospedeira, o que pode ter implicações na competitividade do inoculante, como demonstrado por Wolff et al. (1993).

A calagem reduz os efeitos da acidez e das toxicidades de Al e Mn sobre a nodulação do feijoeiro (Döbereiner, 1966b; Morales et al., 1973; Graham et al., 1980), além de beneficiar a cultura pela adição de Ca e, às vezes, Mg. A recomendação de calagem deve ser baseada na análise do solo da área de cultivo. Em casos onde não se realiza a calagem, a escolha da variedade de feijão e do inoculante mais apropriado se torna o passo mais importante para que se obtenha uma produtividade razoável.

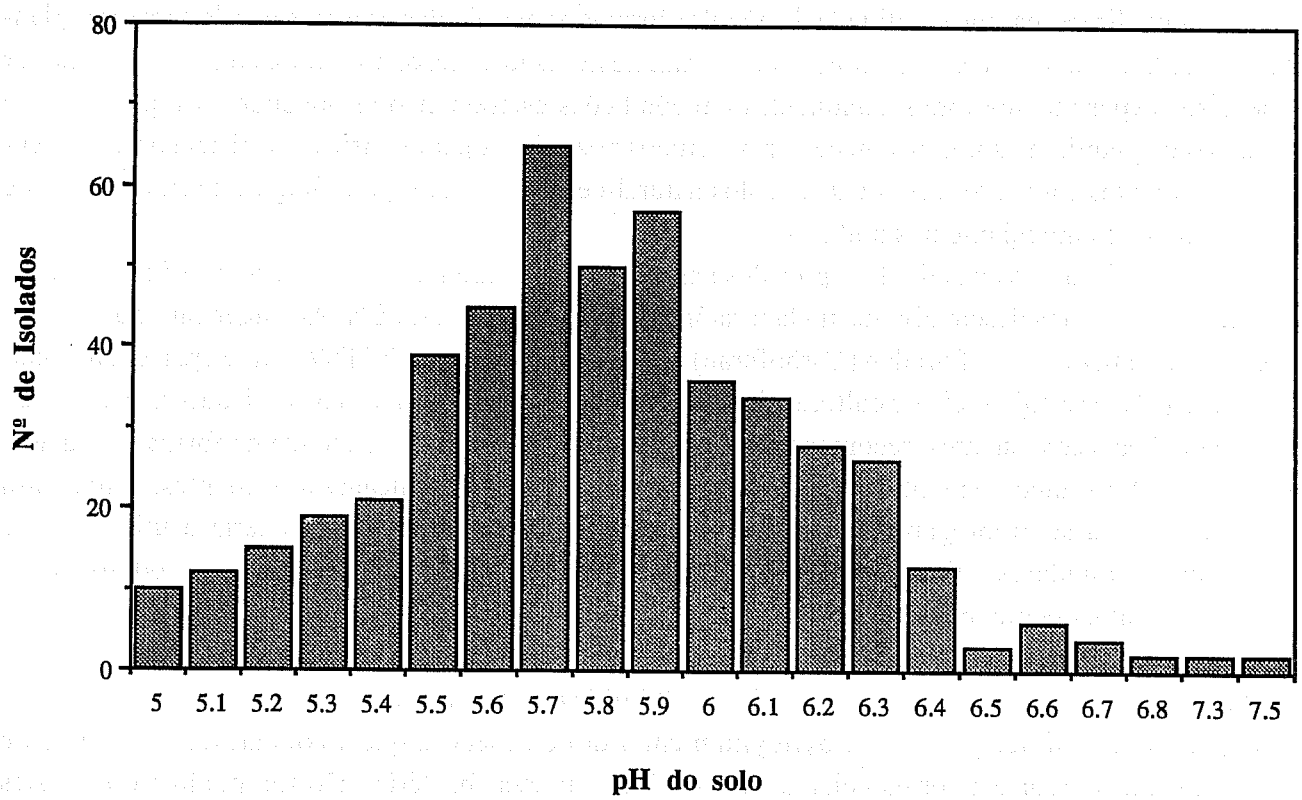


Figura 3.3. Distribuição de isolados de nódulos espontâneos de feijoeiros coletados no Estado de Goiás, conforme o pH do solo.

3.4.3. Tratamento das sementes com defensivos agrícolas

Em muitos casos, e principalmente em áreas onde o feijão é cultivado todos os anos com ou sem rotação de culturas, torna-se necessário o tratamento das sementes com fungicidas e/ou inseticidas para evitar que a incidência de doenças e pragas afete o stand da cultura, reduzindo a produtividade. Em plantios onde se pretende fazer a inoculação, é imprescindível que os rizóbios inoculados sejam tolerantes aos defensivos empregados no tratamento da semente; caso contrário, haverá morte das bactérias e a inoculação falhará. Os resultados sobre a compatibilidade entre defensivos e inoculantes (De Polli et al., 1986) são relativamente antigos, faltando informações sobre os produtos atualmente registrados e recomendados para uso no tratamento das sementes de feijão. O único estudo recente foi realizado por Ramos & Ribeiro Jr. (1993), testando o efeito dos fungicidas Ridomil 25%, Benlate 50%, Vitavax 75%, Banrot 40%, e Difolatan 80%, aplicados nas sementes sete dias antes da inoculação, sobre a sobrevivência das bactérias nas sementes. Os autores observaram que a estirpe CIAT899 (Rt) teve melhor sobrevivência nas sementes tratadas que as estirpes CIAT652 e CPAC1135 (Rlp). Os fungicidas Benlate e Banrot foram os que causaram maior mortalidade das bactérias. Em adição, o tratamento das sementes com Benlate reduziu a ocorrência das bactérias inoculadas nos nódulos.

Em estudos semelhantes, realizados no laboratório de microbiologia do CNPAF, observou-se que o tratamento das sementes com os fungicidas Benlate, Captan, Vitavax, Terraclor, Rizolex, Rhodiauran, Tecto-100 e a mistura comercial de Vitavax + Thiran, nas doses recomendadas pelos fabricantes, não causou morte total da estirpe CIAT899 nas sementes (dados não publicados), não acarretando diferenças na quantidade de nódulos formados nas plantas provenientes de sementes plantadas imediatamente após, ou 24 horas após o tratamento e inoculação. Contudo, há que se considerar que esses experimentos foram conduzidos em condições estéreis, não se podendo extrapolar para a situação de plantio no solo. São necessários estudos posteriores para verificar a eficácia do tratamento das sementes com esses produtos em solos naturalmente infestados com fungos, e seu efeito sobre a ocorrência do inoculante nos nódulos.

Em relação aos inseticidas aplicados nas sementes, também há uma carência de informações. Resultados de testes desenvolvidos no laboratório de microbiologia do CNPAF sugeriram que o tratamento das sementes com Furadan (Carbofuran) não afeta os rizóbios (CIAT899), que crescem normalmente em placas a cujo meio de cultura o inseticida foi adicionado (dados não publicados). Na falta de resultados mais consistentes, recomenda-se como alternativa o uso do inseticida na forma granulada, que aplicado ao sulco de plantio não fará contato com as bactérias aplicadas às sementes. Uma outra alternativa para se empregarem inoculantes no plantio de sementes tratadas seria a utilização de inoculantes granulares. Entretanto, essa forma de inoculação não é apreciada por produtores e o produto é praticamente indisponível no mercado.

Finalmente, pouco também se conhece sobre os efeitos de herbicidas sobre os rizóbios. Roslycky (1985a) obteve variantes de diversas espécies de *Rhizobium* com adaptação para resistência ao herbicida Paraquat (1, 1' - dimethyl - 4, 4' bipyridylium chloride) e observou que a nodulação, o acúmulo de matéria seca, o vigor e a cor das plantas inoculadas com essas bactérias não foram alterados. Estes dados demonstram a possibilidade de se obterem inoculantes capazes de tolerar os defensivos empregados, mas deve-se levar em conta que algumas das modificações decorrentes da adaptação para tolerância ao princípio ativo podem ser danosas às bactérias (Roslycky, 1985b). Existem duas manei-

ras principais de aplicação de herbicidas: pré-plantio, incorporado ao solo, e pós-plantio, pulverizado após a emergência da cultura. Teoricamente, os herbicidas aplicados pré-plantio têm mais chances de afetar negativamente os rizóbios, já que as sementes inoculadas farão contato com o solo tratado. Por outro lado, os herbicidas aplicados pós-plantio só deverão afetar os rizóbios quando chegarem aos nódulos, após serem absorvidos e translocados para as raízes pela planta, mas seus efeitos sobre a atividade nodular são desconhecidos.

3.4.4. Inoculação das sementes

A inoculação das sementes é a maneira de se promover o contato dos rizóbios com as raízes emergentes da plântula, de forma que tenham acesso aos sítios de infecção para a formação dos nódulos. É imprescindível que existam bactérias vivas na superfície das sementes no ato do plantio. De um modo geral, a inoculação consiste na mistura do inoculante turfoso com um veículo que serve como adesivo. Esse veículo pode ser uma solução de goma arábica pura, polvilhos caseiros ou açúcar cristal (sacarose), não devendo ser empregadas colas comerciais porque possuem fungicidas e conservantes tóxicos aos rizóbios. A goma arábica e o açúcar cristal promovem a sobrevivência das bactérias inoculadas na superfície das sementes, sendo a solução de açúcar cristal aquela que permite que haja bactérias vivas nas sementes pelo período mais longo **(Figura 3.4)**.

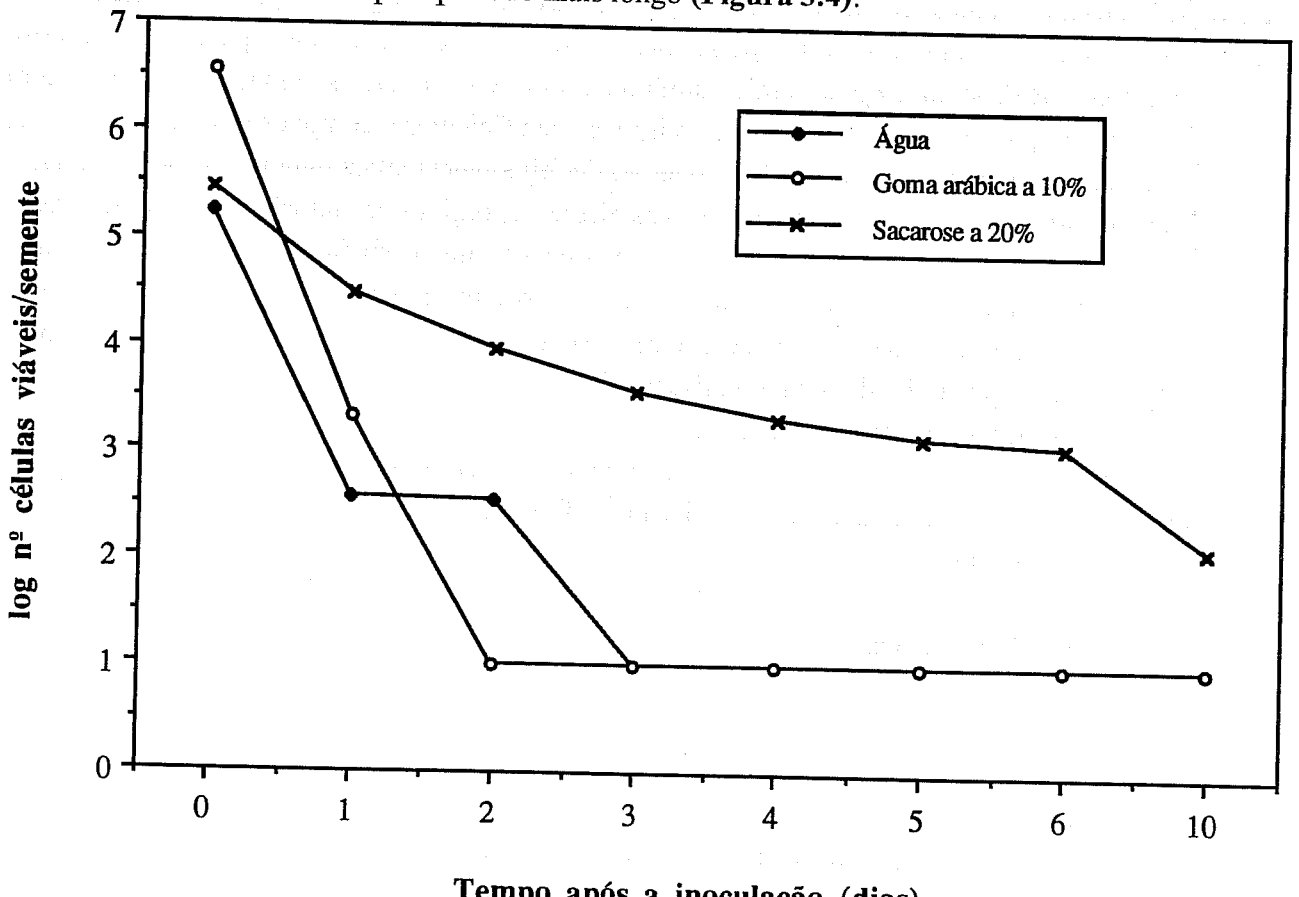


Figura 3.4. Logaritmo do número de células viáveis de *Rhizobium tropici* CIAT899 na superfície de sementes de feijão inoculadas com inoculante turfoso misturado em água, goma arábica ou sacarose, e mantidas à temperatura ambiente.

Para fazer a inoculação das sementes do feijoeiro mistura-se uma dose de 250 g de inoculante em um copo (do tipo americano) com água a que se adicionaram duas colheres de sopa de açúcar cristal, gerando uma lama preta. Essa lama é, então, aplicada a 40 kg de sementes, misturando-se bem para que as sementes fiquem completamente revestidas pelo inoculante. A inoculação pode ser feita sobre o chão (cimento) limpo, sobre uma lona, em sacos plásticos ou, preferencialmente, em um tambor de eixo descentralizado, sempre à sombra. As sementes inoculadas devem ser deixadas secar à sombra, e seu plantio deve ser feito imediatamente após a secagem, no mesmo dia da inoculação. Quando se faz a inoculação das sementes para plantio em áreas onde nunca se utilizou o inoculante, recomenda-se uma dose de 500 g de inoculante para cada 40 kg de sementes. No caso de inoculação e tratamento das sementes com defensivos, as sementes devem ser tratadas com os produtos químicos antes da inoculação. Para mais detalhes sobre os cuidados com o inoculante e a inoculação, veja o capítulo anterior.

3.5. Conclusões

Os estudos sobre a simbiose do feijoeiro progrediram bastante nos últimos anos, sobretudo no que diz respeito à definição taxonômica dos microsimbiontes. O fato de se ter conhecimento da inadequação dos inoculantes previamente empregados para o feijoeiro significa que praticamente todo o trabalho terá que ser refeito, no sentido de se aprender mais sobre os diversos aspectos da simbiose do feijoeiro com o *Rhizobium tropici*, o microsimbionte preferencial para as nossas condições. Além disso, é necessário que se identifiquem novas estirpes mais eficientes e competitivas que possam ser empregadas nos inoculantes. As variedades modernas de feijão apresentam maior aptidão produtiva e melhor adaptabilidade para a produção de grãos nas diferentes regiões produtoras de feijão no Brasil. Apesar dessas variedades geralmente responderem à adubação nitrogenada, alguns resultados sugerem que elas têm boa capacidade simbiótica, merecendo portanto mais estudos. A conscientização atual da maioria dos produtores sobre a necessidade de se tecnificar a cultura do feijoeiro tem proporcionado à pesquisa a oportunidade para a realização de testes de inoculação nas mais diversas condições, inclusive com irrigação complementar e em várzeas, onde antes não se cultivava feijão. Num futuro próximo a pesquisa deverá ser capaz de apontar as melhores combinações entre parceiros simbióticos para que se possa fazer da inoculação do feijoeiro uma prática tão comum e rentável quanto a inoculação da soja.

3.6. Referências Bibliográficas

ABRUNA, F.; PEARSON, R.W.; PEREZ, R. Lime response of corn and beans grown on typical ultisols and oxisols of Puerto Rico. In: BORNEMISZA, E.; ALVARADO, A. ed. **Soil Management in Tropical America.** North Carolina State University, 1975. p.228-245.

BALDWIN, I.L.; FRED, E.B. Strain variation in the root nodule bacteria of clover, *Rhizobium trifolii*. **J. Bacteriol.**, v.17, p.17-18, 1929.

BARRADAS, C.A.A.; BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Seleção de cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* para nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.13, p.169-179, 1989.

BARRADAS, C.A.A.; HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. I - Precocidade para nodulação e fixação do nitrogênio. **Turrialba**, v.39, p.236-242, 1989.

BEYNON, J.L.; JOSEY, D.P. Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. **J. Gen. Microbiol.**., v.118, p.437-442, 1980.

BROMFIELD, E.S.P.; BARRAN, L.R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. **Can. J. Microbiol.**, v.36, p.369-372, 1990.

CASSMAN, K.G.; WHITNWY, A.S.; FOX, R.L. Phosphorus requirements of soybean and cowpea as affected by mode of N nutrition. **Agron. J.**, v.73, p.17-22, 1981.

CATTEAU, M.; KHANAKA, H.; LEGRAND, M.D.; GUILLAUME, J. Contribution to the study of *Rhizobium* and *Agrobacterium* genus: numerical taxonomy. In: VEEGER, C;

NEWTON, W.E. ed., **Advances in Nitrogen Fixation Research**. The Hague & Wageningen: Nijhoff, Junk & Podoc, 1984. p.330.

CHAVERRA, M.H.; GRAHAM, P.H. Cultivar variation in traits affecting early nodulation of common bean. **Crop Sci.**, v.32, n.6, p.1432-1436, 1992.

CREGAN, P.B.; KEYSER, H.H. Host restriction of nodulation by Bradyrhizobium japonicum strain USDA 123 in soybean. **Crop Sci.**, v.26, p.911-916, 1986.

CUNHA, C.O.; FRANCO, A.A. **Efeito de altas temperaturas na nodulação e crescimento de 10 leguminosas arbóreas**. Academia Brasileira de Ciências, Julho, Rio de Janeiro (abstract), 1988.

CUNNINGHAM, S.D.; MUNNS, D.A. The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.48, p.1273-1276, 1984.

DE-POLLI, H.; SOUTO, S.M.; FRANCO, A.A. **Compatibilidade de agrotóxicos com *Rhizobium* spp. e a simbiose das leguminosas**. EMBRAPA-UAPNPBS, Seropédica, RJ, 1986. pp.75.

DEBOUCK, D.G.; TOHME, J. Implications for bean breeders of studies on the origins of common beans *Phaseolus vulgaris* L. In: **Current Topics in Breeding of Common Bean**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1989. p.3-42.

DEVINE, T.E.; BREITHAUPT, B.H. Phenotypic thermal stability of rhizobitoxine-induced chlorosis and the nodulation controlling gene, rj_1. **Crop Sci.**, v.20, p.394-396, 1980.

DEVINE, T.E.; WEBER, D.F. Genetic specificity of nodulation. **Euphytica**, v.26, p.27-35, 1977.

DIXON, R.O.D. Hudrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. **Arch. Microbiol.**, v.85, p.193-201, 1972.

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, v.210, p.850-852, 1966a.

DÖBEREINER, J. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in acid soils. **Pl. Soil**, v.24, p.153-166, 1966b.

DUNHAM, D.H.; BALDWIN, I.L. Double infection of leguminous plants with good and poor strains of rhizobia. **Soil Sci.**, v.32, p.235-249, 1931.

DUNIGAN, E.P.; BOLLICH, P.K.; HUTCHINSON, R.L.; HICKS, P.M.; ZAUNBRECHER, F.C.; SCOTT, S.G.; MOWERS, R.P. Introduction and survival of an inoculant strain of *Rhizobium japonicum* in soil. **Agron. J.**, v.76, p.463-466, 1984.

DUSHA, I.; BAKOS, A.; KONDOROSI, A.; DE BRUIJN, F.; SCHELL, J. The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. **Mol. Gen. Genet.** v.219, p.89-96, 1989.

EARDLY, B.D.; HANNAWAY, D.B.; BOTTOMLEY, P.J. Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules: ability to nodulate bean plants [*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.]. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.50, p.1422-1427, 1985.

EMBRAPA. **Recomendações técnicas para o cultivo de feijão, zonas 61 e 83**. Brasília: Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. 1993. pp. 93.

EMERICH, D.W.; RUIZ-ARGÜESO, T.; CHING, T.M.; EVANS, H.J. Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. **J. Bacteriol.**, v.137, p.153-160, 1979.

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

FLORES, M.; GONZALES, V.; PARDO, M.A.; LEIJA, A.; MARTINEZ, E.; ROMERO, D.; PIÑERO, D.; DAVILA, G.; PALACIOS, R. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. **J. Bacteriol.**, v.170, p.1191-1196, 1988.

FLORES, M.; GONZALEZ, V.; BROM, S.; MARTINEZ, E.; PIÑERO, D.; ROMERO, D.; DAVILA, G.; PALACIOS, R. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. **J. Bacteriol.**, v.169, p.5782-5788, 1987.

FOY, C.D.; ARMIGER, W.H.; FLEMING, A.L.; ZAUMEYER, W.J. Differential tolerance of drybean, snapbean and lima bean varieties to an acid soil high in exchangeable aluminium. **Agron. J.**, v.59, p.561-563.

FRANÇA, G.E.; BAHIA FILHO, A.F.C.; CARVALHO, M.M. DE. Influência de magnésio, micronutrientes e calagem no desenvolvimento e fixação simbiótica de nitrogênio na soja perene var. Tinaroo (*Glycine weightii*) em solo de cerrado. **Pesq. agropec. bras.**, v.8, p.197-202, 1973.

FRANCISCO JR., P.B.; AKAO, S. Autoregulation and nitrite inhibition of nodule formation in soybean cv. Enrei and its nodulation mutants. **J. Exp. Bot.**, v.44, n.260, p.547-553, 1993.

FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Interferência do cálcio e do nitrogênio na fixação simbiótica do nitrogênio por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. **Pesq. agropec. bras.**, v.3, p.223-227, 1968.

FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C.; NEYRA, C.A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiol.**, v.63, p.421-424, 1979.

FRED, E.B.; GRAUL, E.J. The effect of soluble nitrogenous salts on nodule formation. **J. Am. Soc. Agron.**, v.8, p.316-322, 1916.

GATES, C.T.; WILSON, J.R. The interaction of nitrogen and phosphorus on the growth, nutrient status and nodulation of *Stylosanthes humilis* H.B.K. (Townsville Stylo). **Pl. Soil**, v.41, p.325-333, 1974.

GEPTS, P. A middle American and an Andean common bean gene pool. In: **Genetic Resources of Phaseolus Beans**. Kluwer Academic Press, 1988. p.375-390.

GIBSON, A.H.; DREYFUS, B.L.; LAWN, R.J.; SPRENT, J.I.; TURNER, G.L. Host and environmental factors affecting hydrogen evolution and uptake. In: GIBSON, A.H.; NEWTON, W.E. ed., **Current pesrpectives in nitrogen fixation.** Canberra: Australian Academy of Sciences, 1981. p.373.

GRAHAM, P.H. **Plant improvement to enhance levels of nitrogen fixation in cultivars of *Phaseolus vulgaris* L.** Paper presented to the Symposium on Breeding Legumes for Enhanced Nitrogen Fixation. Boyce Thompson Institute, Ithaca, NY, 22pp, 1978.

GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. : A review. **Field Crops Res.**, v.4, p.93-112, 1981.

GRAHAM, P.H.; HALLIDAY, J. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. In: VINCENT, J.M., ed. **Exploiting the Legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture.** University of Hawaii College of Tropical Agriculture Miscelaneous Publications, 1977. p.313-334.

GRAHAM, P.H.; OCAMPO, G.; RUIZ, L.D.; DUQUE, A. Survival of *Rhizobium phaseoli* in contact with chemical seed protectants. **Agron. J.**, v.72, p.625-627, 1980.

GRAHAM, P.H.; PARKER, C.A. Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. **Pl. Soil**, v.20, p.383-396, 1964.

GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. as influenced by planting density. **J. Agric. Sci.**, v.90, p.19-29, 1977.

GRAHAM, P.H.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.A.T.; PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. **Field Crops Res.**, v.5, p.121-128, 1982.

HANSEN, A.P.; YONEYAMA, T.; KOUCHI, H.; MARTIN, P. Respiration and nitrogen fixation of hydroponically cultured *Phaseolus vulgaris* L. cv. OAC Rico and a supernodulating mutant. I. Growth, mineral composition and effect of sink removal. **Planta**, v.189, p.538-545, 1993.

HARDARSON, G.; BLISS, F.A.; CIGALES-RIVERO, M.R.; HENSON, R.A.; KIPE-NOLT, J.A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABRIALES, J.J.; PEREIRA, P.A.A.; SANABRIA, C.A.; TSAI, S.M. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. **Pl. Soil**, v.152, p.59-70, 1993.

HARDARSON, G.; GOLBS, M.; DANSO, S.K.A. Nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L. Merril) as affected by nodulation patterns. **Soil Biol. Biochem.**, v.21, p.783-787, 1989.

HARDARSON, G.; HEICHEL, G.H.; BARNES, D.K.; VANCE, C.P. Rhizobial strain preference of alfalfa populations selected for characteristics associated with N2 fixation. **Crop Sci.**, v.22, p.55-58, 1982.

HARDY, R.W.F.; HAVELKA, U.D. Photosynthate as amajor factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes, with emphasis on soybeans. In: NUTMAN, P.S., ed., **Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants.** London: Cambridge University Press, 1976. p.421-439.

HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N2 fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiol.**, v.43, p.1185-1207, 1968.

HERNANDEZ, B.S.; FOCHT, D.D. Effects of phosphorus, calcium, and Hup- and Hup+ rhizobia on pigeon pea yields in an infertile tropical soil. **Agron. J.**, v.77, p.867-871, 1985.

HERRIDGE, D.F.; BETTS, J.H. Field evaluation of soybean genotypes selected for enhanced capacity to nodulate and fix nitrogen in the presence of nitrate. **Pl. Soil**, v.110, p.129-135, 1988.

HERRIDGE, D.F.; PATE, J.S. Utilization of net photosynthate for nitrogen fixation and protein production in an annual legume. **Plant Physiol.**, v.60, p.759-764, 1977.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Pl. Soil**, v.149, p.95-102, 1993.

HUNGRIA, M.; JOHNSTON, A.W.B.; PHILLIPS, D.A. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on nodD-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.5, n.3, 199-203, 1992.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Cultivar and *Rhizobium* strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. **Pl. Soil**, v.103, p.111-121, 1987.

HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J. Effects of cotyledons and nitrate on nitrogen assimilation of *Phaseolus vulgaris* L. **MIRCEN J.**, v.3, p.411-419, 1987.

HUNGRIA, M; FRANCO, A.A.; SPRENT, J.I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Pl. Soil**, v.149, p.103-109, 1993.

JONES, D.G.; HARDARSON, G. Variation within and between white clover varieties in their preference for strains of *Rhizobium trifolii*. **Ann. Appl. Biol.**, v.92, p.221-228, 1979.

JORDAN, D.C. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, 321^{AL}. In: KRIEG, N.R.;HOLT, J.G., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984. p.234-254.

KARANJA, N.K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: infectiveness and tolerance of acidity and aluminium. **Pl. Soil**. v.112, p.7-13, 1988b.

KARANJA, N.K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: tolerance of high soil temperature and antibiotic resistance. **Pl. Soil**, v.112, p.15-22, 1988a.

KIPE-NOLT, J.A.; GILLER, K.E. A field evaluation using the 15N isotope dilution method of lines of *Phaseolus vulgaris* L. bred for increased nitrogen fixation. **Pl. Soil**, v.152, p.107-114, 1993.

KIPE-NOLT, J.A.; MONTEALEGRE, C.M.; TOHME, J. Restriction of nodulation by the broad host range *Rhizobium tropici* strain CIAT899 in wild accessions of *Phaseolus vulgaris* L. **New Phytol.**, v.120, p.489-494, 1992.

KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H.; GILLER, K.E. Nitrogen fixation in breeding lines of *Phaseolus vulgaris* L. **Pl. Soil**, v.152, p.103-106, 1993.

LAGUERRE, G.; GENIAUX, E.; MAZURIER, S.I.; CASARTELLI, R.R.; AMARGER, N. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. **Can. J. Microbiol.**, v.39, p.412-419, 1993.

LAWN, R.J.; BRUN, W.A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source sink manipulations. **Crop Sci.**, v.14, p.11-16, 1974.

LAWRIE, A.C.; WHEELER, C.T. The supply of photosynthetic assimilates to nodules of *Pisum sativum* L. in relation to the fixation of nitrogen. **New Phytol.**, v.72, p.1341-1348, 1973.

LYND, J.G.; ANSMAN, T.R. Effects of P, Ca with four K levels on nodule histology, nitrogenase activity and improved 'spanco' peanut yields. **J. Plant Nutr.**, v.12, p.65-84, 1989.

LYND, J.G.; ANSMAN, T.R. Soil conditions with distinctive coralloid nodulation and nitrogen fixation of 'Mecca' alfalfa. **J. Plant Nutr.**, v.13, p.77-94, 1990.

MAHON, J.D. Respiration and the energy requirements for nitrogen fixation in nodulated pea roots. **Plant Physiol.**, v.60, p.817-821, 1977.

MALAVOLTA, E. **Manual de Química Agrícola.** Nutrição de Plantas e Fertilidade do Solo. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1976. 528p.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. New York: Academic Press, 1986. 674p.

MARTENSSON, A.M. Competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in red clover using repeated inoculation and increased inoculum levels. **Can. J. Microbiol.**, v.36, p.136-139, 1990.

MARTINEZ, E.; PARDO, M.A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M.A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **J. Gen. Microbiol.**, v.131, p.1779-1786, 1985.

MARTINEZ-ROMERO, E.; ROSENBLUETH, M. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium strains*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.56, p.2384-2388, 1990.

MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.41, p.417-426, 1991.

MEADE, J.; HIGGINS, P.; O'GARA, F. Studies on the inoculation and competitiveness of a *Rhizobium leguminosarum* strain in soils containing indigenous rhizobia. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.49, p.899-903, 1985.

MINCHIN, F.R.; PATE, J.S. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. **J. Exp. Bot.**, v.24, p.259-271, 1973.

MIRANDA, L.N.; LOBATO, E. Tolerância de variedades de feijão e de trigo ao alumínio e à baixa disponibilidade de fósforo no solo. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.2, p.44-50, 1978.

MORAES, J.F.V. Calagem e adubação. In: ZIMMERMANN, M.J. DE. O.; ROCHA, M.; YAMADA, T., ed., **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988. p.261-301.

MORALES, V.M.; GRAHAM, P.H.; CAVALLO, R. Influencia del método de inoculación y el encalamiento del suelo de Carimagua (Llanos Orientales, Colombia) en la nodulación de leguminosas. **Turrialba**, v.23, p.239-241, 1973.

MUNNS, D.N.; FOX, R.L. Depression of legume growth by liming. **Pl. Soil**, v.45, p.701-705, 1976.

NAVARRO, R.B.; VARGAS, A.A.T.; SCHRÖDER, E.C.; VAN BERKUM, P. Uptake hydrogenase (Hup) in common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbioses. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, n.12, p.4161-4165, 1993.

NELSON, L.M. Variation in ability of *Rhizobium leguminosarum* isolates to fix dinitrogen symbiotically in the presence of ammonium nitrate. **Can. J. Microbiol.**, v.29, n.12, p.1626-1633, 1983.

NEVES, M.C.P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.3, p.269-321, 1987.

NICOL, H.; THORNTON, H.G. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. **Proc. Royal Soc. London**, v.130, p.32-59, 1941.

PEÑA-CABRIALES, J.J.; GRAGEDA-CABRERA, O.A.; KOLA, V.; HARDARSON, G. Time course of N2 fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pl. Soil**, v.152, p.115-121, 1993.

PEREIRA, P.A.A.; ARAUJO, R.S.; ROCHA, R.E.M.D.; STEINMETZ, S. Capacidade de genótipos de feijoeiro de fixar N2 atmosférico. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, n.7, p.811-815, 1984.

PEREIRA, P.A.A.; MIRANDA, B.D.; ATTEWELL, J.R.; KMIECIK, K.A.; BLISS, F.A. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pl. Soil**, v.148, p.203-209, 1993.

PIHA, M.I.; MUNNS, D.N. Nitrogen fixation potential of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) compared with other grain legumes under controlled conditions. **Pl. Soil**, v.98, p.169-182, 1987.

PIÑERO, D.; MARTINEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.54, p.2825-2832, 1988.

RAMOS, M.L.G.; MAGALHÃES, N.F.M.; BODDEY, R.M. Native and inoculated rhizobia isolated from field grown *Phaseolus vulgaris*: effects of liming an acid soil on antibiotic resistance. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.179-185, 1987.

RAMOS, M.L.G.; RIBEIRO JR., W.Q. Effect of fungicides on survival of *Rhizobium* on seeds and the nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pl. Soil**, v.152, p.145-150, 1993.

ROBERTS, G.P.; LEPS, W.T.; SILVER, L.E.; BRILL, W.J. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.39, p.414-422, 1980.

ROMERO, D.; SINGLETON, P.W.; SEGOVIA, L.; MORETT, E.; BOHLOOL, B.B.; PALACIOS, R.; DAVILA, G. Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.54, p.848-850, 1988.

ROSLYCKY, E.B. Paraquat-induced changes in selected rhizobia and agrobacteria. **Can. J. Soil Sci.** v.65, p.667-675, 1985.

ROSLYCKY, E.B. Sensitivity and adaptation of selected rhizobia and agrobacteria to paraquat. **Can. J. Soil Sci.**, v.65, p.555-562, 1985.

RUSCHEL, A.P.; ALVAHYDO, R.; SAMPAIO, I.B.M. Influência do excesso de alumínio no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em solução nutritiva. **Pesq. agropec. bras.**, v.3, p.229-233, 1968.

SÁ, N.M.H. DE; SCOTTI, M.R.M.M.L.; PAIVA, E.; FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Selection and characterization of *Rhizobium* spp. strains stable and capable in fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Rev. Microbiol.**, v.24, p.38-48, 1993.

SANJUAN, J.; OLIVARES, J. Implication of nifA in regulation of genes located on a Rhizobium *meliloti* cryptic plasmid that affect nodulation efficiency. **J. Bacteriol.**, v.171, n.8, p.4154-4161, 1989.

SANTOS, D.R.; STANFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R. Inoculação do caupi em solo salinizado da região semi-árida do nordeste do Brasil. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.14, p.291-295, 1990.

SCHUBERT, K.R.; EVANS, H.J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.73, p.1207-1211, 1976.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.43, p.374-377, 1993.

SILVA, P.M. DA; TSAI, S.M.; BONETTI, R. Response to inoculation and N fertilization for increased yield and biological nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pl. Soil**, v.152, p.123-130, 1993.

SMALL, J.G.C.; LEONARD, O.A. Translocation of C^{14} labelled photosynthate in nodulated legumes as influenced by nitrate nitrogen. **Am. J. Bot.**, v.56, p.187-194, 1969.

SOBERÓN-CHAVEZ, G.; NAJERA, R.; OLIVERA, H.; SEGOVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. **J. Bacteriol.**, v.167, p.487-491, 1986.

SPAIN, J.M.; FRANCIS, C.A.; HOWELER, R.W.; CALVO, F. Differential species and varietal tolerance to soil acidity in tropical crops and pastures. In: BORNEMISZA, E.; ALVARADO, A. ed., **Soil Management in Tropical America.** Raleigh: North Carolina State University, 1975. p.308-329.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C.O; FRANCO, A.A. Competitividade entre estirpes de *Rhizobium tropici* e *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* e uso de mutantes glucuronidase positivas. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 24, 1993, Goiânia, **Resumos**, Vol. 1. Goiânia: SBCS, 1993, p. 313.

STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and nitrogen N_2 fixation by nitrate. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.7, n.1, p.1-23, 1988.

STREETER, J.G. Growth of two soybean shoots on a single root. **J. Exp. Bot.**, v.25, p.189-198, 1974.

STREIT, W.; KOSCH, K.; WERNER, D. Nodulation competitiveness of *Rhizobiumleguminosarum* bv. *phaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured bu glucuronidase (gus) gene fusion. **Biol. Fert. Soils**, v.14, p.140-144, 1992.

STROWD, W.H. The relation of nitrates to nodule production. **Soil Sci.**, v.10, p.343-350, 1920.

THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n.1, p.19-28, 1991a.

THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Modeling symbiotic performance of introduced rhizobia in the field by use of indices of indigenous population size and nitrogen status of the soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, n.1, p.29-37, 1991b.

TRINCHANT, J.C.; RIGAUD, J. Nitrogen fixation in French-beans in the presence of nitrate: effect on bacteroid respiration and comparison with nitrite. **J. Plant Physiol.**, v.116, p.209-217, 1984.

TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Pl. Soil**, v.152, p.131-138, 1993.

VAN BERKUM, P. Evidence for a third uptake hydrogenase phenotype among the soybean bradyrhizobia. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p.3835-3841, 1990.

VAN BERKUM, P.; NAVARRO, R.B.; VARGAS, A.A.T. Classification of the uptake hydrogenase-positive bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, n.2, p.554-561, 1994.

VARGAS, A.A.T.; GRAHAM, P.H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. **Pl. Soil**, v.117, p.195-200, 1989.

VARGAS, A.A.T.; GRAHAM, P.H. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. **Field Crops Res.**, v.19, p.91-101, 1988.

VIEIRA, C. Perspectiva da cultura do feijão e de outras leguminosas de grão no país e no mundo. In: ZIMMERMANN, M.J. DE O.; ROCHA, M.; YAMADA, T., ed., **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988. p.3-19.

VIEIRA, C.; NOGUEIRA, A.O.; ARAÚJO, G.A. DE A. Adubação nitrogenada e molíbdica na cultura do feijão. **Rev. Agric.**, v.67, n.2, p.117-124, 1992.

VILHORDO, B.W.; BURIN, M.E.; GANDOLFI, V.H. Morfologia. In: ZIMMERMANN, M.J. DE. O.; ROCHA, M.; YAMADA, T., ed., **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988. p.87-123.

VILHORDO, B.W.; MÜLLER, L.; EWALD, L.F.; LEÃO, M.L. Hábito de crescimento em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agron. Sulriograndense**, v.16, n.1, p.79-98, 1980.

WADISIRISUK, P.; WEAVER, R.W. Importance of bacteroid number in nodules and effective nodule mass to dinitrogen fixation by cowpeas. **Pl. Soil**, v.87, p.223-231, 1985.

WANG, S.-P.; STACEY, G. Ammonia regulation of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. **Mol. Gen. Genet.**, v.223, p.329-331.

WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I. Greenhouse studies. **Agron. J.**, v.66, p.229-232, 1974.

WESTERMANN, D.T.; KOLAR, J.J. Symbiotic N_2 (C_2H_2) fixation by bean. **Crop Sci.**, v.18, p.986-990, 1978.

WILSON, R.F.; BURTON, J.W.; BUCK, J.A.; BRIM, C.A. Studies on genetic male sterile soybeans. 1. Distribution of plant carbohydrate and nitrogen during development. **Plant Physiol.**, v.61, p.838-841, 1978.

WOLFF, A.B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H.; WERNER, D. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. **Biol. Fert. Soils**, v.12, p.170-176, 1991.

WOLYN, D.J.; ATTEWELL, J.; LUDDEN, D.W.; BLISS, F.A. Indirect measures of N_2 fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field conditions: the role of lateral root nodules. **Pl. Soil**, v.113, p.181-187, 1989.

ZAPATA, F.; DANSO, S.K.A.; HARDARSON, G.; FRIED, M. Nitrogen fixation and translocation in field-grown faba-bean. **Agron. J.**, v.79, p.505-509, 1987b.

ZAPATA, F.; DANSO, S.K.A.; HARDARSON, G.; FRIED, M. Time course of nitrogen fixation in field-grown soybean using nitrogen-15 methodology. **Agron. J.**, v.79, p.172-176, 1987a.

ZIMMERMANN, M.J.D.O.; TEIXEIRA, M.G. Origem e Evolução. In: ZIMMERMANN, M.J. DE O.; ROCHA, M.; YAMADA, T., ed., **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988. p.79-85.

CAPÍTULO 4

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM ESPÉCIES ARBÓREAS

Fátima M. S. Moreira[1]

4.1. Introdução

Espécies vegetais que formam simbiose com microrganismos fixadores de N_2 (EFN) podem dispensar total ou parcialmente a adubação nitrogenada e ainda contribuir para outras espécies consorciadas ou em sucessão, garantindo a auto-sustentabilidade do ecossistema com relação ao N. As EFN têm, em geral, maior concentração de N nos tecidos do que espécies não-fixadoras (**Tabela 4.1**). No caso das espécies arbóreas, a maior concentração de N associada à maior produção de biomassa (folhas, galhos, raízes, nódulos etc.) possibilita uma contribuição significativamente maior de matéria orgânica para o solo, com baixa relação C:N.

Além dos efeitos benéficos diretos da matéria orgânica sobre a fração mineral do solo (estabilização dos agregados, maior retenção de água etc.) evitando sua degradação, ocorre aumento da disponibilidadade de N no ecossistema que pode ser utilizado por diversas espécies de microrganismos e de plantas, aumentando a diversidade biológica (Parrota, 1992; Maschio et al., 1992). Por outro lado, a maior extensão do sistema radicular, tanto a nível horizontal como vertical, permite o retorno ao sistema produtivo de nutrientes perdidos através da lixiviação para camadas mais profundas do solo.

Entre as diversas espécies arbóreas fixadoras de N_2, existe ainda uma ampla variabilidade de utilização econômica, como: madeira, forragem, adubação verde, lenha, flora agrícola, gomas, celulose e papel, carvão, alimentação humana e animal, cercas vivas, produtos medicinais e aromáticos, substrato para produção de cogumelos comestíveis, quebra-ventos etc. (NAS, 1979; Nair et al., 1984; Sharma & Madan, 1993). Deve-se ressaltar também o enorme potencial ainda não explorado de várias espécies nativas. Todas estas características tornam as árvores que fixam N_2 através de simbioses em importantes componentes de sistemas naturais, agroflorestais, agrosilvipastoris, "alley cropping" etc.

A família *Leguminosae*, por exemplo, representa uma parcela significativa na composição florística de vários ecossistemas naturais, como a Floresta Amazônica (Ducke, 1949), o cerrado brasileiro (Kirkbride Júnior, 1984) e remanescentes da Mata Atlântica (Oliveira Filho et al., 1994). Vários gêneros e espécies nativas destes ecossistemas são capazes de formar simbiose com bactérias fixadoras de N_2 dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Allen & Allen, 1981; Faria et al., 1989; Moreira et al., 1992).

A biodiversidade das florestas nativas, principalmente das tropicais, pode ser considerada um recurso material de valor intestimável. Sua preservação garantirá a gerações futuras uma fonte de recursos genéticos para os mais diversos fins. Neste contexto, a crescente demanda mundial por celulose, papel, lenha, carvão e madeira não poderá mais ser suprida pelo extrativismo predatório, mas sim por reflorestamentos de acordo com os princípios do desenvolvimento sustentado. A produção de

[1]Professora Adjunta, Ph.D., Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Caixa Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG.

alimentos, principalmente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, não deverá mais seguir o modelo "monoculturas com altas doses de adubos e outros insumos". Vários resultados indicam que é possível passar da falácia para a prática. Árvores fixadoras de N_2 estão entre as importantes alternativas.

Tabela 4.1. Teor foliar de nitrogênio em espécies arbóreas que formam ou não simbioses fixadoras de nitrogênio.

Espécie fixadora de N_2	% N	**Referência**
Alnus glutinosa	3,84	Beching (1968)
Gliricidia sepium	3,74	Palm & Sanchez (1991)
Erythrina sp.	3,52	Palm & Sanchez (1991)
Albizia saman	3,20	Palm & Sanchez (1991)
Inga edulis	3,18	Palm & Sanchez (1991)
Leucaena leucocephalla	3,94	Palm & Sanchez (1991)
Sesbania rostrata	5,60	Ramani et al. (1990)
S. sesban	4,30	Ramani et al. (1990)
Média	3,92	
Espécie não-fixadora de N_2	% N	**Referência**
Brachystegia boehmii	1,84	Högberg (1986)
B. microphylla	2,24	Högberg (1986)
Julbernardia globiflora	2,04	Högberg (1986)
Diplorhynchus condylocarpum	1,30	Högberg (1986)
Eucalyptus saligna	0,71	Haag (1983)
Cordia trichotoma	1,75	Haag (1983)
Araucaria angustifolia	1,72	Haag (1983)
Pinus elliottii	1,23	Haag (1983)
Média	1,60	

4.2. Sistemas Fixadores de N_2 em Árvores

4.2.1. Simbiose de rizóbio com leguminosas

4.2.1.1. Introdução

Na família *Leguminosae* (ou *Fabaceae*) estão incluídos 650 gêneros e 18.000 espécies, o que a coloca entre as maiores famílias de angiospermas, sendo somente superada pelas *Compositae* e *Orchidaceae* (Polhil et al., 1981). A família compreende espécies de todos os tipos de hábitos de crescimento (árvores, arbustos, ervas e lianas) e também espécies de importância econômica em diversas áreas como a agricultura, a silvicultura e indústria, entre outras.

Segundo Tutin (1958), a freqüência de espécies lenhosas nas subfamílias *Mimosoideae* e *Caesalpinioideae* é bastante alta: 95% e 97%, respectivamente. Nas *Papilionoideae,* somente 38% das espécies são lenhosas. Até 1981, somente 15% das espécies da família haviam sido examinadas quanto à sua capacidade de nodular, isto é, de formar simbiose com bactérias fixadoras de N_2, aqui denominadas coletivamente por rizóbios (Allen & Allen, 1981). A grande maioria das espécies florestais, principalmente as tropicais, não havia sido pesquisada.

O Brasil tem a maior área de florestas tropicais do mundo, aproximadamente 3.574.800 km^2, que é quase três vezes superior à segunda maior área de florestas tropicais, a da Indonésia, com 1.138.950 km^2. A diversidade em espécies é uma característica marcante de florestas tropicais, podendo-se afirmar que estas, e em particular a Amazônia, representam o maior reservatório de espécies vegetais, animais e microbianas, muitas das quais ainda com potencial desconhecido ou não explorado. Nos últimos anos, levantamentos intensivos da capacidade de nodular de espécies florestais brasileiras forneceram informações sobre um número significativo da espécie e gêneros (**Tabelas 4.2** e **4.3**). Atualmente, a nível mundial, 20% das espécies e 57% dos gêneros foram examinados (Faria et al., 1989). Resultados obtidos sobre características intrínsecas dessas simbioses e suas relações ecológicas demonstraram um enorme potencial adaptativo a diferentes condições edafoclimáticas, assim como um amplo grau de variabilidade, que pode ser explorado em programas de melhoramento dessas espécies integrados à maximização da fixação biológica de N_2.

Tabela 4.2. Espécies de leguminosas florestais brasileiras examinadas recentemente quanto a capacidade de nodular*, de acordo com a subfamília.

Subfamília	Nº de espécies examinadas	Espécies com nódulos	
		Nº	%
Caesalpinioideae	123	27	22
Mimosoideae	107	78	73
Papilionoideae	158	107	68

* Vasconcelos & Almeida (1979); Sylvester-Bradley et al. (1980); Magalhães et al. (1982); Faria et al. (1984a, b); Magalhães & Fernandes (1984); Magalhães (1986); Matos (1986); Magalhães & Silva (1986/87); Faria et al. (1987); Moreira et al. (1992); Souza et al. (no prelo); Barberi & Moreira (1994).

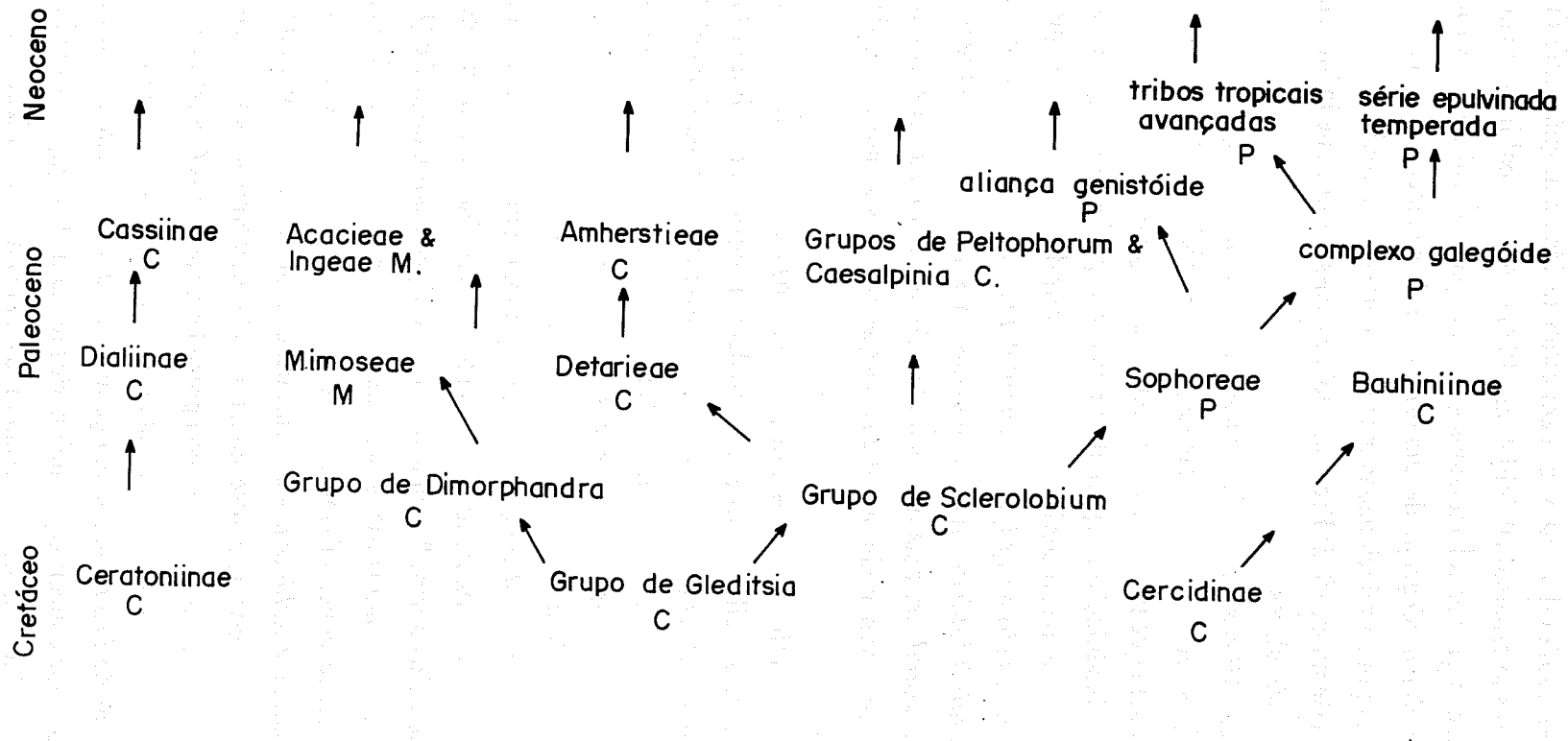
Tabela 4.3. Gêneros de leguminosas brasileiras examinados recentemente quanto à capacidade de nodular*.

Gênero nodulífero	Gênero não-nodulífero	Gênero com informações conflitantes
Abarema (M)	*Acrocarpus (C)*	*Acosmium (M)*
Affonsea (M)	*Aldina (P)*	*Brownea (C)*
Ateleia (P)	*Amburana (M)*	*Delonix (C)*
Bowdichia (P)	*Apuléia (C)*	*Dialium (C)*
Cadia (P)	*Bacoa (P)*	*Dicorynia (C)*
Cedrelinga (M)	*Cenostigma (C)*	*Hymenaea (C)*
Centrolobium (P)	*Dinizia (M)*	*Myrocarpus (P)*
Cyclolobium (P)	*Elizabetha (C)*	*Myroxilon (P)*
Dalhstedtia (P)	*Exostyles (M)*	*Phyllocarpus (C)*
Diplotropis(P)	*Heterostemon (C)*	*Schizolobium (C)*
Etaballia (P)	*Goniorrachis (C)*	*Zollernia (P)*
Gagnebina (M)	*Grazielodendron (P)*	
Marmaroxylon (M)	*Lecointea (P)*	
Melanoxylon (C)	*Luetzelburgia (P)*	
Moldenhaurea (C)	*Monopteryx (P)*	
Platyciamus (P)	*Poeppigia (C)*	
Plathymenia (M)	*Pterodon (P)*	
Plathypodium (P)	*Sweetia (P)*	
Poecilanthe (P)	*Taralea (P)*	
Pseudopiptadenia (M)	*Tetrapleura (M)*	
Pseudosamanea (M)	*Vatairea (P)*	
Vouacapoua (C)	*Vataireopsis (P)*	

* Sylvester-Bradley et al. (1980); Magalhães et al. (1982); Magalhães (1986); Faria et al. (1984b, c); Faria et al. (1987a); Moreira et al. (1992); Magalhães e Fernandes (1984); Bonetti et al. (1984); Souza et al. (submetido); Faria et al. (1989); Barberi e Moreira (1994).

4.2.1.2. Filogenia de *Leguminosae* e sua relação com as simbioses

Mais de 75% dos caracteres usados para delimitar gêneros em *Leguminosae* são reprodutivos e parecem ter evoluído mais rapidamente que os caracteres vegetativos (Small, 1989). Polhill et al. (1981) basearam-se principalmente em caracteres reprodutivos para estabelecer os principais grupos de divergência da família *Leguminosae* (**Figura 4.1**). Segundo estes autores, os gêneros mais arcaicos parecem ser os de espécies arbóreas extratropicais da *Caesalpinioideae - Gleditsia, Gymnocladus, Ceratonia, Zenia* e *Cercis*. Os quatro primeiros gêneros parecem incapazes de nodular e quanto ao último, ainda existem controvérsias. A capacidade de nodular da maior parte das espécies nas *Dialiinae* ainda não foi determinada. As informações sobre a nodulação nos gêneros *Dialium* e *Dycorinia* ainda são controvertidas. A capacidade de nodular em *Cassiinae* é mais freqüente.



C= Caesalpineoideae; P=Papilionoideae; e Mimosoideae

Figura 4.1. Suposta divergência dos principais grupos de *Leguminosae*, segundo Polhill et at. (1981); onde: C = *Caesalpineoideae*; P = *Papilionoideae*; e M = *Mimosoideae.*

As descobertas de fósseis ainda fornecem poucas evidências sobre os primórdios da evolução da família. Certamente, as três subfamílias estavam bem estabelecidas e amplamente dispersas no eoceno, mas registros anteriores são esparsos (Polhill et al., 1981). A principal irradiação da família pode ter surgido de dois pequenos grupos relacionados - o grupo pantropical de *Dimorphandra* e o grupo sul-americano de *Sclerolobium*. O grupo de *Dimorphandra* é reconhecidamente de transição e seus gêneros têm características pouco relacionadas mas que, juntas, se aproximam da organização característica de *Mimosoideae* (Benthan, 1865; Brenan, 1967; Steenis, 1975), que inclui, entre outros, o desenvolvimento de nódulos radiculares.

A evolução posterior em *Mimosoideae*, de *Mimoseae* a *Acacieae* e *Ingeae* está associada à evolução de várias características reprodutivas. Dois terços das espécies de *Mimosoideae* ocorrem nos gêneros *Inga*, *Mimosa* e *Acacia* que parecem ter seu centro de origem na região tropical úmida da América do Sul (Irwin, 1981). Nodulação é reportada em várias espécies desses gêneros.

O tipo de flor que pode ter sido característico dos ancestrais da parte restante, que constitui a maior parte da família, está preservado no grupo de *Sclerolobium*. Com poucas modificações, este tipo de flor ocorre nas *Caesalpinioideae* mais avançadas, nas *Detarieae, Amherstieae* e nas *Papilionoideae*. Como as *Mimosoideae*, mas diferente das *Caesalpinioideae* (exceto algumas), as *Papilionoideae* geralmente desenvolvem nódulos radiculares que, nas tribos mais avançadas, mostram vários graus de especialização.

Nas *Papilionoideae*, a subfamília com maior dispersão e uma das mais intensivamente estudadas, o modelo de divergência é mais fácil de se traçar. O modelo proposto por Polhill (1981) (**Figura 4.2**) é bastante aceito por outros autores (Irwin, 1981). As *Swartizeae* estão na linha divisória entre *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae*. Polhill et al. (1981) assinalam que a ocorrência de nódulos radiculares nas *Swartizeae*, além de outras características, indica que elas estão melhor enquadradas em *Papilionoideae* do que em *Caesalpinioideae*. Estima-se que 97% das *Papilionoideae* são capazes de nodular. A irradiação das *Papilionoideae* é complexa, existindo um reconhecimento geral dos vários componentes principais, com *Sophoreae* constituindo o grupo base da divergência, sendo o centro da subfamília dominado pelo enorme "complexo galegoide"(as tribos *Galegae* e *Dalbergieae*). As *Galegae* podem ser separadas em outras tribos herbáceas temperadas (*Loteae, Viceae, Trifolieae*, etc.) - a série apulvinada. A série restante, pulvinada, é predominantemente tropical e pode ser subdividida em um centro - *Tephrosieae* e *Robinieae* - e várias tribos mais avançadas, com uma tendência regional (exceto a pantropical *Phaseoleae*) em direção tanto ao Velho como ao Novo Mundo. Separada de todos esses grupos está a "Aliança genistóide", compreendendo as tribos *Genisteae* e *Podalyrieae*, divididas em várias tribos regionais centralizadas em áreas com clima mediterrâneo.

As supostas divergências de *Leguminosae* em geral e de *Papilionoideae* (Polhill et al., 1981; Polhill, 1981) não implicam em que conceitos evolucionários tenham alcançado o estágio de proposição de uma árvore filogenética. No entanto, representam os dados mais atualizados de divergência para a família e a subfamília como um todo.

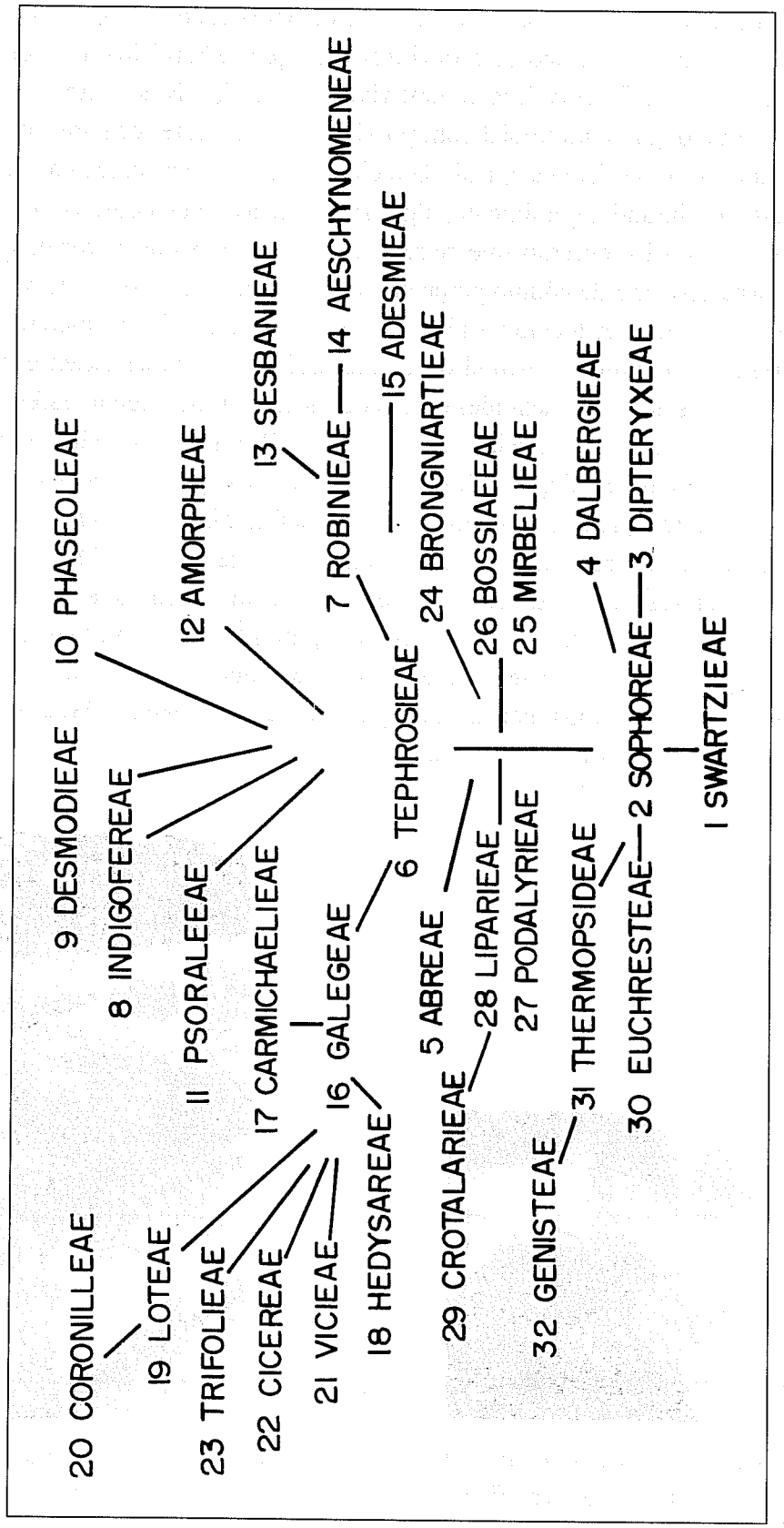


Figura 4.2. Suposta divergência dos principais grupos de *Papilionoideae*, segundo Polhill (1981).

4.2.1.3. Forma e anatomia dos nódulos

A forma dos nódulos é determinada pela posição e comportamento de seus meristemas, existindo basicamente dois tipos: os que não se ramificam e os que se ramificam. Nos primeiros, o meristema é esférico, circundando uma área central fixadora de N_2. Nos últimos, o meristema é apical, o que acarreta um alongamento inicial com possível divisão posterior para formar vários ramos, cada um com seu próprio meristema apical. O tecido onde ocorre a fixação de N_2 em todos os tipos de nódulo é efêmero, durando, geralmente, algumas semanas. Nos nódulos que se ramificam após sua senescência, o tecido é progressivamente reposto por um novo que se forma nas pontas das ramificações, o que torna este tipo de nódulo potencialmente perene. Já os tipos de nódulos que não se ramificam são efêmeros como seu tecido fixador. Corby (1988) denominou cinco tipos de nódulos em *Leguminosae*: aeschinomenóide, desmodióide, caesalpinóide (anteriormente astragalóide), crotalarióide e lupinóide. Os aeschinomenóides e desmodióides têm meristemas esféricos diferindo, principalmente, quanto à presença de lenticelas (desmodióide). Os outros tipos têm meristema apical, sendo o caesalpinióide o maior deles (**Figuras 4.3** e **4.4**). O tipo caesalpinióide ocorre em todas as três subfamílias, enquanto os outros quatro são predominantes na subfamília *Papilionoideae*. A distribuição dos tipos de nódulos que ocorrem em cada tribo no diagrama de Polhill (1981) para divergência em *Papilionoideae* é, com raras exceções, bastante relacionada com o modelo de evolução de formas de nódulos sugerido por Corby (1988), ou seja, o tipo caesalpinióide, considerado primitivo, é predominante nas tribos mais primitivas, enquanto os quatro tipos de nódulos supostamente mais avançados ocorrem predominantemente nas tribos mais avançadas. Faria et al. (1984a, 1987a) reportaram formas de nódulos encontradas em várias espécies nativas.

Figura 4.3. Nódulo de *Swartzia schomburgkii* coletado em floresta de terra firme na Amazônia.

Figura 4.4. Nódulos de *Cedreliga catenaeformis*, muda em viveiro.

4.2.1.4. Modos de infecção por rizóbio

Atualmente são conhecidos três modos pelos quais o rizóbio pode iniciar a infecção em leguminosas para formar nódulos: 1) via pêlos radiculares (o mais conhecido); 2) via feridas (geralmente causadas pela emergência de raízes laterais ou adventícias no caso de nódulos caulinares de *Sesbania* e *Aeschinomene*, por exemplo); e 3) via células da epiderme (intercelular). A infecção por pêlos radiculares, considerada um estádio mais avançado, é predominante nas espécies herbáceas, forrageiras e de grãos das tribos mais avançadas como *Trifolieae*, *Vicieae* e *Phaseoleae* (Sprent et al., 1989). Nas espécies arbóreas, os dois últimos tipos parecem predominar (Faria et al., 1987b; Sprent & Cordeiro, 1992).

O estádio posterior envolve a formação de cordões de infecção, exceto para algumas espécies como em *Arachis* e *Stylosanthes*, dos quais pode haver ou não liberação de rizóbio. Cordões de infecção persistentes, onde não ocorre liberação de rizóbio foram relatados em *Parasponia* spp. (*Ulmaceae*) (Trinick, 1979), as únicas espécies não leguminosas que formam simbiose com rizóbio, e foram consideradas uma resposta atípica de uma não leguminosa ao rizóbio. Posteriormente, foram encontrados, pela primeira vez em leguminosas arbóreas do gênero *Andira* (*Papilionoideae*) (Faria et al., 1986). Agora sua ocorrência já é conhecida nos grupos mais primitivos de leguminosas arbóreas nodulíferas, como *Dimorphandra* e *Sclerolobuim*, em outras *Caesalpinioideae* examinadas, dos gêneros *Campsiandra*, *Melanoxylon*, *Moldenhaurea*, *Tachigali* e *Chamaecrista*, e nas *Papilionoideae*, dos gêneros *Hymenolobium*, *Cyclolobium*, *Dahlstedtia* e *Poecilanthe* (Faria et al., 1987b; Sprent & Cordeiro, 1992). Porém, não foram encontradas em *Mimosoideae*, confirmando a maior afinidade filogenética entre as subfamílias *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae*.

4.2.1.5. Taxonomia do microsimbionte

Até 1974, a taxonomia das bactérias fixadoras de N_2 que formam nódulos em leguminosas era baseada, principalmente, na capacidade de nodular e fixar N_2 com determinadas espécies de leguminosas. As limitações desta classificação decorriam da promiscuidade simbiótica de várias estirpes de rizóbio e da insuficiência de dados sobre nodulação, pois só 8% a12% das espécies existentes na família *Leguminosae* haviam sido examinadas quanto à capacidade de nodular (Graham, 1976). Além disso, a maioria dos estudos sobre nodulação era direcionada quase que exclusivamente às culturas agrícolas importantes, entre outras, a soja, o feijão, a ervilha, a alfafa e o trevo, espécies estas restritas a poucos grupos de divergência da subfamília *Papilionoideae*.

A taxonomia atual de rizóbio, encontrada no Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey (Jordan, 1984), já não foi baseada somente nas características simbióticas e tentou considerar também as características intrínsecas da bactéria. Entretanto, esta classificação ainda está direcionada para as leguminosas de importância agrícola. Nela estão definidas três espécies de *Rhizobium*: *R. leguminosarum*, *R. meliloti* e *R. loti*, que abrangem as estirpes chamadas de "crescimento rápido". Outro gênero - *Bradyrhizobium* - foi criado para as estirpes chamadas de "crescimento lento". Neste gênero, a espécie B. japonicum está definida para as estirpes de crescimento lento que nodulam a soja. Os demais grupos de crescimento lento no gênero *Bradyrhizobium*, a chamada "miscelânea caupi", não estão definidos em nível de espécie, existindo atualmente a tendência de se colocar neste grupo qualquer rizóbio de crescimento lento, não identificado, isolado de leguminosa tropical. A posição

taxonômica dos isolados de crescimento rápido da maioria das espécies arbóreas também não está definida; com exceção de algumas estirpes de crescimento rápido, isoladas de *Leucaena* e *Mimosa*, classificadas como *R. loti*. Isto dificulta o estudo e a obtenção de inoculantes específicos eficientes e a recomendação de inoculantes para espécies afins. Jordan (1987) assinalou que as estirpes da "miscelânea caupi" representam um grupo altamente heterogêneo e divergente de microrganismos, dentro do qual as relações taxonômicas não estão ainda bem definidas. é de se esperar, portanto, que todo o gênero *Bradyrhizobium* seja reorganizado nos próximos anos. Já em 1976, Graham chamava atenção ao fato de que a classificação de rizóbio, então vigente, seria gradualmente modificada à medida que um maior número de estirpes, principalmente aquelas provenientes do grande reservatório de leguminosas tropicais, fosse examinado.

Trabalhos posteriores à publicação da última edição do Manual de Bergey demonstraram, com o auxílio de técnicas mais sofisticadas e precisas, que mesmo a tribo *Papilionoideae* é uma fonte de rizóbio com grande variabilidade a ser explorada. Recentemente, um novo gênero e cinco novas espécies de *Rhizobium* foram descritas: *Azorhizobium caulinodans,* para rizóbio de crescimento lento, que forma nódulos no caule de *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988); *R. fredii,* para rizóbio de crescimento rápido, que nodula eficientemente variedades de soja selvagem da China (Scholla & Elkan, 1984; Chen et al., 1988); *R.huakuii* (Chen et al., 1991); *R. galegae,* para rizóbio de crescimento rápido, isolado de *Galega* spp. (Lindström, 1989); e *R. tropici* e *R. etli,* para estirpes isoladas de *Phaseolus vulgaris* em áreas tropicais (Martinez-Romero et al., 1991; Segovia et al., 1993). Está sendo proposto, ainda, um novo gênero - *Photorhizobium* - com uma única espécie - *P. thompsonianum* - o primeiro rizóbio fotossintético, isolado de nódulos caulinares de *Aeschynomene indica* (Eaglesham et al., 1990) e uma nova espécie de *Bradyrhizobium* - *B. elkanii* - para estirpes isoladas de soja (Kuykendall et al., 1992).

Através dos levantamentos da capacidade de nodular e/ou fixar nitrogênio de espécies de leguminosas florestais da região amazônica, realizados pelo SMS/DCA/INPA[2], e da Mata Atlântica, realizados pelo CNPAB/EMBRAPA[3], acumulou-se uma coleção de estirpes de rizóbio isoladas de uma ampla variedade de gêneros e grupos de divergência de *Leguminosae*. Numa tentativa de definir a posição taxonômica dessas estirpes foram estudadas suas características culturais, seus padrões de proteína celular total, obtidos por SDS-PAGE, e a relação entre essas características e a filogenia de *Leguminosae*, comparando-as às espécies e gêneros de rizóbio já descritos na literatura (Moreira, 1991; Moreira et al., 1993). Os resultados demonstraram uma ampla diversidade de tipos culturais entre a maioria dos gêneros e grupos de divergência de *Leguminosae*, em relação ao tempo de crescimento, modificação do pH do meio de cultura e quantidade de goma produzida. Em todos os grupos das três subfamílias houve predominância de estirpes de crescimento lento (CL), ocorrendo em menor proporção as estirpes de crescimento rápido (CR), intermediário (CI) ou muito lento (CML). Com relação à análise numérica computadorizada dos padrões de proteína celular total de 171 estirpes, comparadas a espécies atualmente descritas, foram obtidos 23 grupos com níveis de similaridade iguais ou maiores a 86%, e 30 estirpes com padrões de similaridade inferiores a 86% (**Tabela 4.4**). Cinco destes grupos consistiam exclusivamente de estirpes tipo e referência de : *R. leguminosarum*, *R.*

[2]Seção de Microbiologia do Solo/Departamento de Ciências Ambientais/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
[3]Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

loti, *R. meliloti*, *R. tropici* e *A. caulinodans*. Quatro grupos foram similares a espécies de rizóbio conhecidas. Um deles, o grupo 12, composto por 92 estirpes, foi similar à estirpe tipo ATCC10324 *Bradyrhizobium japonicum*. O grupo 2, com seis estirpes, foi similar a *R.loti*. O grupo 18, contendo três estirpes de *Leucaena,* foi similar a *R. fredii* e uma estirpe de *Leucaena* se agrupou com *R. galegae* (grupo 8). Os outros 14 grupos podem representar novas espécies ou biovares e devem ser estudados posteriormente.

Tabela 4.4. Grupos eletroforéticos (SDS-PAGE), tipos culturais e origem de 171 estirpes isoladas de espécies florestais nativas da Amazônia e Mata Atlântica e de estirpes tipo e referência de espécies de rizóbio atualmente descritas. Modificado de Moreira et al. (1993).

Grupo	Nº de estirpes	Origem*	Características culturais**	Estirpes tipo e/ou referência (Origem*)
1	2	P2	CR, ácido	-
2	6	C3, M2	CR ou I, ácido ou neutro	*R. loti* (P11)
3	2	M2, M3	CR, ácido ou neutro	-
4	-	-	-	*R. loti* (P11)
5	3	M2, P1	CR, ácido	-
6	-	-	CR, ácido	*R. tropici* (P7)
7	6	M2, M3, P4, P6	CR, ácido	-
8	1	M2	CR, ácido	*R. galegae* (P10)
9	-	-	CR, ácido	*A. caulinodans* (P6)
10	-	-	CL, alcalino CR, ácido	*R. leguminosarum* (P7, P9, P12)
11	2	P7	-	-
12	92	C1, C2, C3, C4, M1, M2, M3, P1, P2, P4, P5	CR,ácido CL, CML Alcalino ou ácido	*B. japonicum* (M3,P7)
13	4	P7	(Só 2 estirpes)	-
14	2	M3, P4, P7	CL, alcalino	-
15	6	P6, C4, M2, M3, P3	CI, alcalino	-
16	2	-	alcalino	-
17	2	M3	CL, alcalino	-
18	3	P7	CL, alcalino	*R. fredii* (P7)
19	-	M2	CR, ácido	*R. meliloti* (P9)
20	2	-	CR, ácido	-
21	2	P1, P5	CML, alcalino	-
22	2	M2, M3	CR, ácido	-
23	2	M1, P5, C2	CL, alcalino	

* Grupos de divergência em *Leguminosae* de acordo com Polhill (1981) e Polhill et al. (1981): C1 = grupo de *Dimorphandra*; C2 = grupo de M3 = *Acacieae* e *Ingeae*; P1 = *Swartzieae*; P2 = *Dalbergieae*; P3 = *Albreae*; P4 = *Milletieae*; P5 = *Sophoreae*; P6 = *Robinieae*; P7 = *Phaseoleae*; P8 = *Aeschynomeneae*; P9 = *Trifolieae*; P10 = *Galegeae*; P11 = *Loteae*; P12 = *Viceae*.

** Em meio YMA (Vincent, 1970); sendo:CR = crescimento rápido; CL = crescimento lento; CI = crescimento intermediário entre CR e CL; CML = crescimento muito lento; alcalino = alcaliniza o meio de cultura; ácido = acidifica o meio de cultura; neutro = não modifica o pH do meio.

Nota: 30 outros grupos foram formados por uma única estirpe. Estas foram isoladas de C1, C2, C4, M2, M3, P1, P2, P4, P5 e P7.

As estirpes CL e CML formaram um conjunto com padrões de proteína celular total menos heterogêneo do que o das estirpes CR e CI. Estirpes do grupo XII, composto predominantemente por estirpes de CL alcalinizantes, ocorreram em todos os grupos de *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae* estudados, desde os mais primitivos até os mais avançados, e também em quase todos os grupos de *Papilionoideae* abrangidos por este estudo. Isto indica que este grupo parece ser o tronco ancestral de onde se derivaram as demais espécies de rizóbio, confirmando a hipótese de Norris (1965). Os resultados deste trabalho, abrangendo vários grupos de divergência das três subfamílias de *Leguminosae,* estenderam para toda a família as observações de outros autores para *Papilionoideae* (Young & Johnston, 1989), de que, aparentemente, não existe relação entre as filogenias atuais de rizóbio e de *Leguminosae.*

Grande diversidade entre rizóbios isolados de espécies arbóreas foi também demonstrada por Zhang et al. (1991), Lajudie et al. (1992) e Dupuy et al. (1992). Com a diversidade existente entre isolados de espécies arbóreas e também indicações de variabilidade nas espécies já descritas, ou entre isolados de espécies herbáceas, é previsto um número considerável de proposições de novas espécies e gêneros nos próximos anos. Essas proposições deverão seguir regras mais rígidas para evitar, por exemplo, descrições inadequadas ou casos em que estirpes tipo não estejam disponíveis (Graham et al., 1991).

4.2.1.6. Especificidade, efetividade e eficiência

As diferentes espécies de leguminosas hospedeiras apresentam diversos graus de especificidade. Esta característica foi examinada num número relativamente pequeno de espécies arbóreas e mesmo nessas espécies, poucas estirpes de rizóbio foram testadas. Por isso, é impossível fazer generalizações para o grupo como um todo. Com base nos resultados já obtidos (**Tabela 4.5**), pode-se afirmar que existe alta variabilidade quanto a especificidade entre rizóbio e espécies arbóreas. Algumas espécies apresentam um grau relativamente alto de promiscuidade, como *Acacia seyal* e *A. farnesiana*, enquanto outras, como *Sesbania marginata* e *Pithecellobuim edwallii,* parecem ser altamente específicas, existindo entre estes dois grupos um gradiente de especificidade ou promiscuidade.

Na maior parte dos testes houve variação da efetividade das estirpes sobre o crescimento das plantas hospedeiras. Para algumas espécies, estirpes homólogas foram efetivas, mas para outras foram pouco efetivas ou até mesmo ineficazes. A efetividade de estirpes isoladas e inoculadas em espécies do mesmo gênero também pode apresentar variabilidade, e algumas estirpes podem até mesmo não induzir nodulação, dependendo da espécie, como em *Acacia* (Dreyfus & Dommergues, 1981) e *Aeschinomene* (Alazard, 1985).

Vários gêneros de leguminosas arbóreas, nas três subfamílias, podem ser nodulados por estirpes CR ou CL, como *Dimorphandra, Chamaecrista, Campsiandra, Anadenanthera, Leucaena, Piptadenia, Plathymenia, Prosopis, Acacia, Albizia, Calliandra, Enterolobium, Inga, Pithecellobium, Swartzia, Andira, Centrolobium, Dalbergia, Machaerum, Derris, Lonchocarpus, Sesbania* e *Clitoria* (Lim & Ng, 1977; Pankhurst, 1977; Dreyfus & Dommergues, 1981; Lawrie, 1983; Padmanabhan et al., 1990; Moreira, 1991). Para algumas espécies, a nodulação por estirpes CR e CL mostrou-se efetiva e em outras só um grupo nodulou efetivamente (Jenkins et al., 1987). Estes resultados indicam grande potencial para respostas à inoculação com estirpes selecionadas de rizóbio.

Tabela 4.5. Especificidade ou promiscuidade na nodulação de leguminosas arbóreas por diferentes estirpes de *Rhizobium* spp.

Espécies testadas	Estirpes inoculadas			Estirpes nodulíferas			Referência**
	Hospedeiros						
	Nº total	Nº gêneros	Nº espécies	Nº total	%	Efetividade*	
Pithecellobium edwalii	39	15	21	1	3	nd	Ribeiro et al. (1987)
Sesbania marginata	18	11	12	1	6	nd	Campelo (1976)
Aeschynomene vilosa	15	1	7	2	13	E	Alazard (1985)
Albizia lebbeck	39	15	21	13	33	nd	Ribeiro et al. (1987)
Acacia albida	39	15	21	13	33	nd	Dreyfus & Domergues (1981)
Aeschynomene sensitiva	6	2	6	3	50	E, e	Dupuy et al. (1992)
Acacia albida	15	3	8	8	53	I	Lajudie et al. (1992)
Acacia senegal	15	3	7	8	53	E, e, I	Lajudie et al. (1992)
Sesbania grandiflora	15	3	8	9	60	E, e, I	Lajudie et al. (1992)
Aeschynomene pratensis	15	1	7	10	67	E, I	Alazard (1985)
Aeschynomene afraspera	6	2	6	4	67	E, I	Dupuy et al. (1992)
Sesbania rostrata	15	3	8	10	67	E, e, I	Lajudie et al. (1992)
Acacia molíssima	18	11	12	12	67	nd	Campelo (1976)
Leucaena leucocephalla	46	nd	4	43	93	E, e, I	Trinick (1980)
Acacia seyal	15	3	8	14	93	E, e, I	Lajudie et al. (1992)
Acacia farnesiana	17	nd	4	16	94	E, e, I	Trinick (1980)
Acacia seyal	10	3	7	10	100	E, e, I	Dreyfus & Dommergues (1981)

* Grau(s) de efetividade encontrado(s) entre as estirpes nodulíferas; onde: E = efetivo; e = pouco efetivo; I = inefectivo; nd = não determinado.
** Embora outras espécies tenham sido estudadas por estes autores, selecionaram-se, em cada trabalho, as espécies relativamente mais promíscuas e mais específicas.

A eficiência relativa de nódulos (Schubert & Evans, 1976) de *Prosopis glandulosa* foi maior para isolados CR (> 0,50) do que CL (< 0,80) conforme Jenkins et al. (1987), e não se correlacionou com a efetividade simbiótica medida pela concentração total de N na parte aérea (Jenkins et al., 1987; Virginia et al., 1984). Diferenças estatisticamente significativas (> 22%) no conteúdo de N e acúmulo de matéria seca foram observadas entre plantas de *Sesbania* sp. inoculadas com estirpes Hup^+ e plantas inoculadas com estirpes Hup^- (Saini et al., 1987). Os efeitos do metabolismo de hidrogênio no crescimento de leguminosas de grãos podem ser separados em duas classes: ausente ou significante (Neves & Hungria, 1987). Para espécies arbóreas é necessário que se realizem mais testes (espécies vegetais e estirpes simbiontes) de modo a obter dados mais conclusivos.

Faria et al. (1984a) avaliaram a eficiência de estirpes de rizóbio em simbiose com seis espécies arbóreas através da relação entre o conteúdo de N na planta e peso de nódulos. Estirpes em simbiose com plantas de N total acima da média foram consideradas eficientes. Estirpes induzindo N total acima da média e peso de nódulos abaixo da média foram consideradas de eficiência superior e só foram obtidas para quatro espécies (uma para cada espécie). Plantas em simbiose com a maior parte destas estirpes consideradas eficientes tiveram cerca da metade do N total das plantas que receberam adubação nitrogenada, o que pode indicar um baixo potencial do nitrogênio obtido do ar (FBN) nestas espécies ou condições inadequadas para que todo o potencial se expresse.

4.2.1.7. Fatores que limitam a FBN em leguminosas arbóreas

Ausência de nodulação ou nodulação ineficaz em determinada espécie, sob determinadas condições ambientais, é decorrente de fatores limitantes ao estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento da simbiose. Estes fatores podem ser:

1 Características intrínsecas da espécie hospedeira que a tornam incapaz de nodular ou fixar N_2 em baixas taxas;
2) Ausência de estirpes microsimbiontes específicas ou efetivas;
3) Edáficos (pH, toxicidade de alumínio; deficiência de nutrientes, especialmente fósforo, nitrogênio combinado etc.); e
4) Climáticos (extremos de temperatura e umidade etc.).

Já foi dito que existem informações sobre a capacidade de nodular de uma boa parte de espécies arbóreas. Caso a espécie não possua nenhuma referência na literatura, com relação a esta característica, o melhor método é cultivá-la em condições de viveiro, em substrato naturalmente fértil ou com adubação adequada, evitando adubação nitrogenada e excesso de matéria orgânica que podem inibir a nodulação. Também pode ser feita uma inoculação com mistura de estirpes oriundas de outras espécies arbóreas (Magalhães et al., 1982; Faria et al., 1984a, 1987a; Moreira et al., 1992). Vários trabalhos de levantamento têm sido realizados em condições de viveiro, pois nos ecossistemas florestais em clímax a nodulação é geralmente ausente ou pouco freqüente devido às condições de equilíbrio no ambiente quanto ao nitrogênio, ou seja, os "inputs" de N através da decomposição da matéria orgânica ou mesmo da água da chuva são suficientes para suprir as baixas demandas. De modo geral, as análises do sistema radicular podem ser feitas de quatro a seis meses após o plantio, porém algumas espécies *(Andira* spp., por exemplo), podem necessitar de um tempo maior para o aparecimento de nódulos.

A ausência de estirpes específicas no solo ou a presença de populações de rizóbio ineficazes tornam necessária a inoculação com estirpes selecionadas quanto à eficiência e adaptação às condições climáticas e edáficas locais. Diversos métodos têm sido descritos com este propósito (Vincent, 1982), porém, para as espécies arbóreas nativas de solos ácidos tropicais, ainda é necessário um ajuste dessas metodologias que foram, em sua maioria, desenvolvidas para espécies herbáceas de áreas temperadas.

Há indicações que existem diferenças com relação ao potencial de fixação de N_2 entre espécies arbóreas (Sanginga, 1992). *Leucaena leucocephala* e *Gliricidia sepium* podem fixar de 200 kg a 300 kg de N, enquanto *Faidherbia (Acacia) albida* apenas 20 kg a 30 kg de N. Este mesmo autor assinala

que podem ter efeito na quantidade e proporção do N_2 fixado: espécie e genótipo da planta; microsimbionte; idade da planta; e manejo de fatores ambientais.

Sanginga (1992) relata variações entre 20% e 68% no nitrogênio obtido do ar (FBN) entre plantas de *Gliricidia sepium*, de diferentes procedências, enquanto que para plantas de *Leucaena leucocephala* e *Acacia albida*, a variação encontrada foi respectivamente 37% a 74% e 6% a 37%, de acordo com a procedência (Sanginga et al., 1990a).

A acidez e toxicidade de alumínio, fatores comumente associados aos solos tropicais, podem afetar as simbioses de leguminosas herbáceas (Carvalho, 1978; Munns & Franco, 1981). Para as simbioses de rizóbio com leguminosas arbóreas foi observada uma alta freqüência de estirpes de rizóbio tolerantes a pH ácido (Silva & Franco, 1984; Souza et al., 1984; Moreira, 1991; Lesueur et al., 1993). Alguns resultados demonstraram tolerância a até 100 mM de Al ($Al_2(SO_4)_2$), quando os testes são realizados em meio sólido (Silva & Franco, 1984; Lesueur et al., 1993), enquanto em meio líquido algumas estirpes apresentaram tolerância e outras foram extremamente sensíveis (Lesueur et al., 1993).

Silva & Franco (1984) observaram maior freqüência de estirpes tolerantes à acidez (pH 4,5) nas *Caesalpinioideae* (85,7%) e menor freqüência nas *Papilionoideae* (28,8%). As *Mimosoideae* apresentaram 48,8% de estirpes tolerantes. Estirpes CR são geralmente consideradas menos tolerantes à acidez do que estirpes CL. Porém, a procedência da estirpe pode ser mais importante na sua relação de tolerância do que a característica do crescimento (Silva & Franco, 1984). Estirpes nativas de solos ácidos se mostram mais adaptadas a estas condições do que estirpes isoladas de pH mais elevado (**Figura 4.5**).

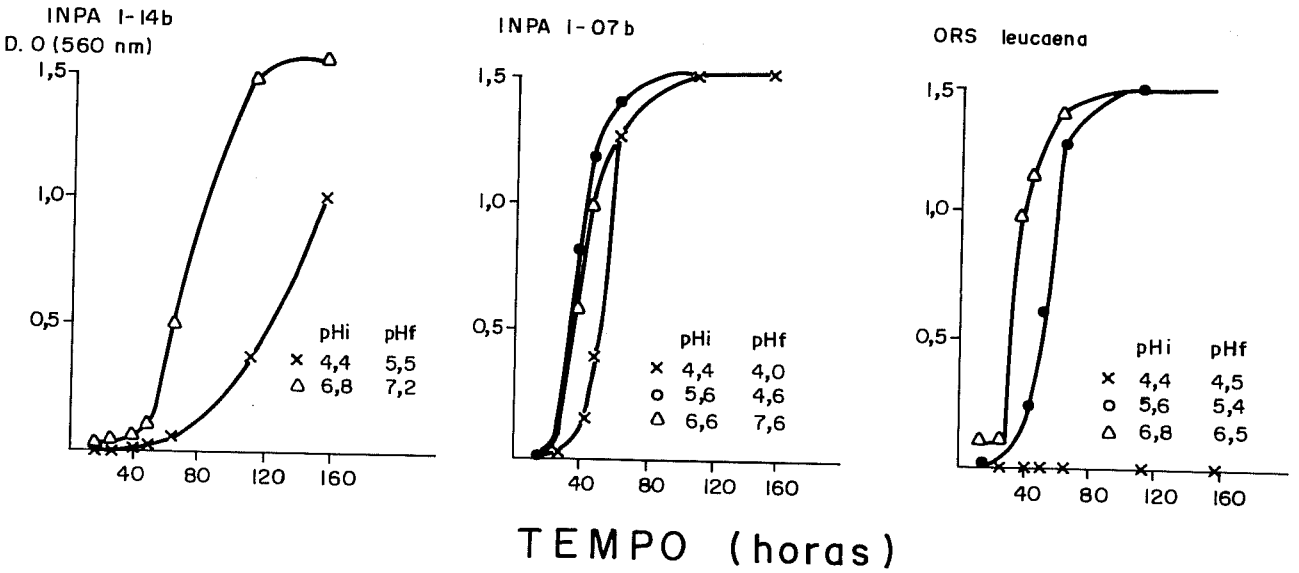


Figura 4.5. Crescimento de estirpes de rizóbio em meios líquidos diferindo quanto ao pH (pHi = pH inicial do meio; e pHf = pH final).
INPA 14B isolada de *Clitoria racemosa* CL, alc. INPA 07B e ORS *Leucaena* isoladas de *Leucaena* sp. CR, ácido. Estirpes INPA 14B e INPA 07B isoladas de solos ácidos da Amazônia (pH ≅ 4,0) e estirpe ORS *Leucaena* isolada de solo do Senegal, com pH próximo à neutralidade.

O hospedeiro parece ser mais afetado pela acidez do que o rizóbio. *Acacia mangium*, *Faidherbia* (*Acacia*) *albida* e *Leucaena* spp. são afetadas pela acidez do meio (pH = 4,5), podendo existir diferenças significativas entre as procedências de uma mesma espécie com relação a esta suscetibilidade (Lesueur et al., 1993; Hutton, 1984). Estas espécies, porém, são originárias de solos com pH mais elevado. Em florestas tropicais, e particularmente na Amazônia, diversas leguminosas arbóreas crescem e nodulam em condições naturais, em valores de pH extremamente baixos (pH < 4,0) (Magalhães & Blum, 1984; Moreira et al., 1992). Franco (1984) assinala que a acidez gerada pela FBN na rizosfera dessas plantas pode ser benéfica, aumentando a disponibilidade de P para as plantas através da solubilização de rochas fosfatadas.

Fósforo

A deficiência de fósforo é um dos principais fatores limitantes do crescimento de plantas nos solos tropicais, principalmente devido à imobilização por fixação nos óxidos de Al e Fe. Simbioses mutualísticas com fungos micorrízicos ocorrem em várias leguminosas permitindo que estas espécies tenham bom desenvolvimento e nodulação em solos com baixos teores de nutrientes, especialmente o P (Jasper et al., 1989; Herrera et al., 1993). De Faria et al. (1993) observaram que o crescimento e nodulação de espécies arbóreas foram estimulados pela inoculação com MVA, e que baixos teores de P foram suficientes para obter os maiores incrementos, indicando que estas espécies têm baixo requerimento de P. A resposta a P também pode variar entre genótipos de espécies arbóreas (Sun et al., 1992).

Temperatura

Uma das simbioses mais sensíveis a temperaturas altas é a do feijoeiro. Resultados recentes demonstraram que estirpes isoladas de leguminosas florestais tolerantes a altas temperaturas e eficientes na nodulação do feijoeiro podem ser uma valiosa fonte de recursos genéticos para aumentar o potencial da FBN nesta cultura (Hungria et al., 1993). A temperatura crítica para FBN em *Cyamopsis tetregonoloba*, por exemplo, situou-se entre 37°C e 40°C e acima de 40°C no caso de plantas dependentes de N mineral (Arayangkoon et al., 1990). Estirpes tolerantes a altas temperaturas podem formar simbioses altamente eficientes com leguminosas arbóreas, como por exemplo em *Mimosa flocculosa* (Cunha et al., 1994).

Umidade

Simbioses de leguminosas com rizóbio podem se estabelecer em condições extremas de seca, como diversas espécies de *Acacia* no Sahel africano, ou em condições de longos períodos de inundação, como várias espécies nativas da Amazônia, demonstrando uma ampla versatilidade adaptativa. Em regiões semi-áridas (zona ecoclimática do Sahel), importantes populações de *Bradyrhizobium* vivem em solo sob vegetação de *Acacia albida* até 34 m de profundidade ao nível do lençol freático (Dupuy et al., 1992). No deserto de Sonoran (Estados Unidos), populações maiores que $5,9 \times 10^3$ células.g^{-1} de solo foram encontradas a 6 m de profundidade ao nível do lençol freático sob *Prosopis glandulosa* (Jenkins et al., 1987).

Na Amazônia, as margens dos rios são inundadas periodicamente, podendo os períodos de inundação se estender a até cinco meses. Quando o nível das águas desce abaixo do nível do solo é possível observar, em muitas espécies de leguminosas, uma massa abundante de nódulos aflorando na superfície do solo. A nodulação nos ecossistemas periodicamente inundados é significativamente maior que nos de terra firme (Moreira et al., 1992). Muitas leguminosas frutificam no período de inundação, utilizando a hidrocória como estratégia para dispersão de suas sementes (Moreira & Moreira, submetido).

A inoculação com fungos micorrízicos também pode conferir maior tolerância à seca em leguminosas arbóreas nodulíferas (Osonubi et al., 1991).

N combinado

Espécies arbóreas podem ser mais afetadas pelo N combinado do que culturas anuais porque ocorre ampla variação da FBN em virtude da idade e redistribuição do N na planta e no perfil do solo, devido à mineralização da liteira (Sanginga, 1992).

A aplicação de 40 a 80 kg de N pode reduzir em 50% a FBN em *Leucaena leucocephala* (Sanginga et al., 1989). O grau de inibição pode variar de acordo com a fonte de N aplicada. Baixos níveis de nitrato diminuiram mais a produção de nódulos em *Acacia auriculiformis* do que baixos níveis de amônio (Goi et al., 1992). Por outro lado, pequenas doses de N podem beneficiar a FBN. Em *Cyamopyis tetragonoloba*, a quantidade de N fixado duplicou em resposta à aplicação de uma dose "starter"de N mineral (Arayangkoon et al., 1990).

As respostas de diferentes procedências de uma mesma espécie ao N combinado também podem variar. Sanginga (1992) sugeriu dois modos de aumentar a FBN em espécies arbóreas na presença de N combinado: desenvolver parcerias rizóbio/hospedeiro mais tolerantes ou explorar diferenças genéticas entre árvores para fixar N_2 na presença de altos níveis de N no solo.

4.2.2. Simbioses com *Frankia*

4.2.2.1. Introdução

Actinomicetos fixadores de N_2 do gênero *Frankia* estabelecem simbiose, com formação de nódulos radiculares, em cerca de 279 espécies de angiospermas, a maioria de porte arbustivo ou arbóreo (Baker & Mullin, 1992). O número de espécies vegetais actinorrízicas (i.e., que formam simbiose com *Frankia*) é bem inferior ao das simbioses de rizóbio com leguminosas (**Tabela 4.6**). No entanto, são de extrema importância, pois:

- a capacidade de formar simbiose com *Frankia* se estende a oito famílias botânicas, indicando maior versatilidade simbiótica deste microsimbionte;
- muitas espécies actinorrízicas são colonizadoras agressivas e capazes de crescer em solos degradados;
- muitas espécies são produtoras de madeira, lenha e carvão ou têm outros usos com potencial econômico e ecológico.

Contudo, existe um enorme potencial para descoberta de novas espécies actinorrízicas, dado que trabalhos intensivos de levantamento em muitos ecossistemas não foram realizados (Gauthier et al., 1984). Na Amazônia, por exemplo, não ocorrem os gêneros até agora reportados, como actinorrízicos, mas algumas famílias botânicas às quais pertencem são representadas por outros gêneros.

Tabela 4.6. Características simbióticas e culturais de rizóbio e *Frankia*.

Características	Rizóbio	Frankia	Referência
Simbióticas			
Famílias botânicas com as quais pode estabelecer simbiose	*Leguminosae* *Ulmaceae*	*Casuarinaceae* *Myricaceae* *Batulaceae* *Elaegnaceae* *Rhamnaceae* *Coriariaceae* *Rosaceae* *Datiscaceae*	Trinick, 1979 Bond & Wheeler (1980) Becking (1982)
Número de espécies hospedeiras conhecidas atualmente*	≅ 300	279	Vários
Tipo de infecção	pêlos radiculares, epiderme, feridas	pêlos radiculares, epiderme	Baker & Mullin (1992)
Origem do nódulo	córtex da raiz	periciclo da raiz	Sprent (1989) Miller & Barker (1986)
Localização do tecido vascular	externo às células onde estão os bacteróides	no centro do nódulo	-
Presença de hemoglobina	+	+	Appleby et al. (1983) Tjepkema (1984)
Culturais			
Temperatura ótima	25° C - 30° C	25° C - 35° C	Jordan (1984) Zhongze et al. (1986)
pH ótimo	6,0 - 7,0	6,3 - 6,7	Jordan (1984) Zhongze et al. (1986)
Tempo de geração	1,4 - 44,1 h	24 - 48 h	Hernandez & Focht (1984) Zhongze et al. (1986)
Inibição da FBN por N-combinado**	+	+	Jordan (1984) Zhongze et al. (1986)
Crescimento sob N_2**	+	+	Jordan (1984) Zhongze et at. (1986)

* Incluindo também espécies herbáceas e lianas.
** Considerando resultados de algumas estirpes.

Comparando-se com as simbioses de rizóbio com leguminosas, observa-se que existem poucos resultados sobre as simbioses com *Frankia*. Um dos motivos é relacionado à dificuldade de isolamento do endófito. O primeiro isolamento de *Frankia* foi realizado quase 100 anos após o primeiro isolamento de rizóbio (Beijerinck, 1888) de nódulos de *Comptonia peregrina* (Syn *Myrica asplenifolia*) (Callaham et al., 1978). As principais limitações para o isolamento de *Frankia* são devidas a anatomia dos nódulos, que dificulta a eliminação de contaminantes, e à sua baixa taxa de crescimento em meios de cultura, considerados ainda não seletivos (**Tabela 4.6**).

Casuarina e *Alnus* são os gêneros de importância econômica mais estudados. Estimativas da FBN em espécies destes gêneros se situam entre 40 kg e 300 kg de $N.ha^{-1}ano^{-1}$ (Becking, 1973), indicando grande potencial em sistemas sustentados.

4.2.2.2. Morfologia, taxonomia e diversidade do microsimbionte

Quatro estruturas morfológicas de *Frankia* podem ser encontradas no interior dos nódulos: filamentos de hifa, vesículas, esporângios e esporos (Mansour & Torrey, 1991). Esporângios podem ocorrer também em micélios externos ao nódulo (Cusato & Tortosa, 1993). Embora todas as estirpes de Frankia testadas possuam a capacidade genética de formar esporângios in vitro, no interior dos nódulos só foram observados esporos em 16 espécies de nove gêneros: *Alnus, Casuarina, Ceanothus, Comptonia, Dryas, Elaegnus, Hippophae, Myrica* e *Purshia* (Torrey, 1987). Dois tipos distintos de estirpes podem ser facilmente reconhecidos $Sp.^+$ (esporulantes no interior de nódulos) e $Sp.^-$ (não esporulantes), que parecem diferir em sua capacidade infectiva, na efetividade e competição para formação de nódulos (Kurdali et al., 1990).

A formação de vesículas parece associada à atividade da FBN, pois há evidências de que as vesículas são o sítio da N_2ase, protegendo-a dos efeitos do O_2 (Meesters et al., 1987). Embora *Frankia* em simbiose com *Casuarina* só produza hifas no interior de nódulos que fixam N_2 ativamente (Zhang & Torrey, 1985), isolados de *Casuarina* formaram vesículas *in vitro* e tiveram atividade da nitrogenase, podendo ambas as características ser simultaneamente inibidas por N combinado (Zhang et al., 1984; Zhongze et al., 1986).

Nos últimos anos, apesar das dificuldades (Baker & O'Keefe, 1984), muitas estirpes de *Frankia* foram isoladas em culturas puras de hospedeiros dos gêneros *Comptonia, Alnus, Elaegnus, Casuarina, Ceanothus, Colletia, Discaria, Retanilla* e *Trevoa* (Carú, 1993). Todos os isolados de nódulos foram atribuídos ao gênero *Frankia* com base em:

1) Características morfológicas tais como: formação de esporângios e vesículas em culturas líquidas;
2) Composição química de certos constituintes celulares, como: parede celular tipo III, fosfolipídeo tipo PI e presença de 2-0-metil-manose;
3) Habilidade de fixar nitrogênio e nodular plantas (Lechevalier, 1984).

Em nível de gênero, existe uma razoável homogeneidade, enquanto em categorias taxonômicas inferiores foi observado um grau considerável de heterogeneidade (Lechevalier & Ruan, 1984). Métodos moleculares de análise do perfil de restrição do DNA genômico por endonucleases, determinação da composição de bases do DNA e homologia DNA/DNA também demonstraram diversidade genética entre estirpes de *Frankia*, pois só foram encontrados baixos níveis de homologia (Akkermans et al., 1991).

Como os nódulos de *Frankia* geralmente apresentam coloração interna branca, por muitos anos se pensou que eles não contivessem hemoglobina. Resultados recentes, utilizando novos procedimentos, confirmaram a presença de hemoglobina em nódulos de *Casuarina* (Appleby et al., 1983; Tjepkema, 1984; Sellstedt et al., 1994).

4.2.2.3. Relações simbióticas

Devido às dificuldades para isolamento de *Frankia*, vários experimentos de inoculação em hospedeiros utilizaram suspensão de nódulos macerados como fonte de inóculo. Estudos comparando esta fonte de inóculo ao inóculo procedente de culturas puras mostraram diferenças significativas nas respostas obtidas (Gauthier et al., 1984; Mirza et al., 1994). Estas diferenças podem ser atribuídas à presença de mais de uma estirpe no nódulo, devido à sua infecção múltipla. Assim, embora a infecção de um único pêlo radicular seja necessária para formação do nódulo, geralmente a infecção de vários pêlos radiculares próximos leva à formação de um único nódulo. Desta forma, culturas puras oferecem respostas mais consistentes sobre propriedades simbióticas das estirpes, embora os resultados até agora obtidos forneçam um quadro ainda confuso.

A existência de especificidade intergenérica na família *Casuarinaceae* já foi sugerida (Gauthier et al., 1984). Contudo, várias estirpes isoladas de *Casuarina* spp. falharam na nodulação de espécies do mesmo gênero (Zhang et al., 1984). A estirpe EuI1, isolada de *Elaegnus umbellata*, também não nodula o hospedeiro do qual foi isolada, mas nodula outras espécies de *Alnus, Myrica* e *Comptonia* (Baker et al., 1980). A estirpe ORS021001, isolada de *Casuarina junghuhniana*, não nodula espécies de gêneros da mesma família (*Alloocasuarina* e *Gymnospoma*). Entretanto, várias estirpes isoladas de *Casuarina* nodulam membros de *Elaegnaceae*, como *Hippophae* e *Elaegnus*, sendo, por isso, sugerido que membros dessa família são hospedeiros promíscuos (Zhang et al., 1984). No entanto, a estirpe AvCI1spp, isolada de *Alnus*, não nodula espécies daquela família (Baker & Torrey, 1980). *Alnus* spp. (*Betulaceae*) e *Myrica* (*Myricaceae*) foram noduladas efetivamente pela mesma estirpe (Baker & Torrey, 1980; Huss-Danell, 1991). No trabalho em que foi testado o maior número de estirpes de *Frankia* (50) em cultura pura (Baker, 1987), estas foram divididas em quatro grupos de especificidade hospedeira: 1) estirpes que nodulam *Alnus* e *Myrica*; 2) estirpes que nodulam *Casuarina*; 3) estirpes que nodulam somente *Elaegnaceae* e *Myrica* e 4) estirpes que só nodulam *Elaegnaceae*. Entre os hospedeiros, *Myrica cerifera* foi a que apresentou maior promiscuidade simbiótica. A falta de estirpes que nodulem espécies das famílias *Coriariaceae, Datiscaceae, Rhamnaceae* e *Rosaceae* e de resultados sobre um maior número de inoculações cruzadas entre isolados já obtidos e várias espécies de hospedeiros resulta num quadro ainda incompleto sobre as propriedades simbióticas de *Frankia*.

Atribuem-se três funções à atividade da hidrogenase: proteger a nitrogenase do O_2, prevenir a inibição da N_2ase por H_2 e recapturar a energia que poderia ser perdida como H_2. A maioria das simbioses de *Frankia* estudadas apresentou atividade da hidrogenase (Sellstedt et al., 1994). Nos nódulos de *Casuarina*, onde as vesículas não estão presentes, a atividade da H_2ase é particularmente importante, conferindo proteção à N_2ase contra o O_2 (Sellstedt & Winship, 1987). Valores altos de eficiência relativa (RE) da nitrogenase (0,81-1,00) foram encontrados em simbioses de *Casuarina* spp. com a estirpe HFPCcI3, dando suporte a esta hipótese.

4.2.2.4. Fatores limitantes

Mesmo em áreas de distribuição natural, algumas espécies actinorrízicas podem não apresentar nodulação e, fora de sua área de distribuição, a ocorrência de nódulos é rara (Gauthier et al., 1984). Nestes casos, a inoculação com estirpes adequadas é necessária. Inóculos comerciais de *Frankia* ainda não são disponíveis devido a problemas de isolamento e cultivo já mencionados. O melhor método, quando culturas puras não forem disponíveis, é a inoculação dos "seedlings" com nódulos ativos (redução de acetileno), isolados da própria espécie, macerados. Diversos resultados têm demonstrado efeitos positivos da inoculação com *Frankia* no desenvolvimento de plantas, tanto via culturas puras como por nódulos macerados (Torrey, 1982; Weber et al., 1987).

O genótipo da planta também pode influenciar o potencial da FBN. A porcentagem de N derivado da FBN (% Ndfa) variou de 14% a 76%, entre diferentes procedências de *Casuarina cunninghamiana,* e de 25% a 75% para *C. equisetifolia* (Sanginga et al., 1990b). Em clones da mesma espécie de *Alnus* spp., obtidos a partir de culturas de tecidos, observou-se alta variação na fixação, tendo os melhores clones excedido em 51% até 76% o crescimento de "seedlings". Estes resultados indicam que podem-se obter ganhos genéticos a curto prazo através de melhoramento do hospedeiro. A inoculação dos clones com *Frankia* resultou também em aumentos significativos de 25% a 33% na produção de biomassa (Hendrickson et al., 1993).

4. 2.3. Outras simbioses

Dentre as simbioses de espécies arbóreas com microrganismos fixadores de N_2, as de rizóbio e *Frankia* se destacam por sua importância econômica e ecológica. No entanto, são reportadas outras simbioses para espécies arbóreas. Por exemplo, *Ardisia* e *Psychotria*, gêneros das famílias *Myrsinaceae* e *Rubiaceae*, respectivamente, são nodulados nas folhas por uma bactéria não identificada (Miller & Donelley, 1987; Miller et al., 1983). *Cycas* e *Macrozamia* (*Gymnospermae*) são noduladas nas raízes por cianobactérias de gênero *Nostoc* (Siqueira & Franco, 1988). Poucos resultados são disponíveis para estas simbioses.

4.3. Referências Bibliográficas

AKKERMANS, A.D.L.; HAHN, D.; MIRZA,S. Molecular ecology of *Frankia*: advantages and disavantages of the use of DNA probes. **Pl. Soil**, v.137, p.49-54, 1991.

ALAZARD, D. Stem and root nodulation in Aeschynomene spp. **Appl. Environ.Microbiol.**, v.50, n.3, p.732-734, 1985.

ALLEN, O.N.; ALLEN, E. **The Leguminosae a source book of characteristics, uses and nodulation**. Madison: The University of Wisconsin Press, 1981. 812p.

APPLEBY, C.A.; TJEPKEMA, J.D.; TRINICK, M.J. Hemoglobin in non-leguminous plant, Parasponia: possible genetic origin and function in nitrogen fixation. **Science**, v.220, p.951-953, 1983.

ARAYANGKOON, T.; SCHOMBERG, H.H.; WEAVER, R.W. Nodulation and N_2 fixation of guar at high root temperature. **Pl.Soil**, v.126, p.209-213, 1990.

BAKER,D.D. Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. **Physiol. Plantarum**, 70:245-248, 1987.

BAKER, D; O'KEEFE, D. A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples. **Pl.Soil**, v.78, p.23-28, 1984.

BAKER, D.; TORREY, J.G. Characterization of an effective actinorhizal microsymbiont, *Frankia* sp. AvcI1 (Actinomycetales). **Can. J. Microbiol.**, v.26, n.9, p.1066-1071, 1980.

BAKER, D.; MULLIN, B.C. Actinorhizal symbiosis. In: STACEY, G.; BURRIS, R.; EVANS, H.J. ed., **The Biology of Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.259-292.

BAKER, D.; NEWCOMB, W.; TORREY, J.G. Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont, *Frankia* sp. EuI1 (Actinomycetales). **Can. J. Microbiol.**, v.26, n.9, p.1072-1089, 1980.

BARBERI, A.; MOREIRA, F.M.S. Simbiose de rizóbio com leguminosas florestais no sul de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, Londrina, 1993. **Resumos.** Londrina: IAPAR, 1993. p.27.

BECKING, J.H. Nitrogen fixation by non-leguminous plants. **Dutch Nitrogenous Fertiliziers Review Stikstof-Industry**, The Hague, The Netherlands, v.12, p.47-74, 1968.

BECKING, J.H. Global impacts of applied microbiology. GIAM IV. Fourth International Conference, São Paulo, 1973, 40p.

BECKING, J.H. N2-fixing tropical non-legumes. In: DOMMERGUES, Y.R.; DIEM, H.G. ed., **Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity**. The Hague: Martinus Nijhoff, 1982. p.109-146.

BEIJERINCK, M.W. Die Bacterien der Papilionaceen-knöllchen. **Bot. Ztg.**, v.46, p.725-735, p.741-750, p.757-771, p.781-790, p.797-804, 1888.

BENTHAM, C. "Genera Plantarum". In: BENTHAM, C.; HOOKER, S.D. ed., London: **Lovell Reeve**, v.1, n.2, 1865.

BOND, G.; WHEELER, C.T. Non-legume nodule systems. In: BERGERSEN, F.J. ed., **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation.** Chichester: John Wiley and Sons, 1980. p.185-211.

BONNETTI, R.; OLIVEIRA, L.A.; MAGALHãES, F.M.M. *Rhizobium* spp. populations and mycorrhizal associations in some plantations of forest tree species. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.137-142, 1984.

BRENAN, J.P.M. Flora tropical East Africa, Leguminosae subfamily Mimosoidae, London: Crown Agents, 1967.

CALLAHAM, D.; DEL-TREDICI, P; TORREY, J.G. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. **Science**, v.199, p.899-902, 1978.

CAMPELLO, A.B. **Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp de leguminosas florestais.** Rio de Janeiro: UFRRJ, 1976. 122p. (Tese de Mestrado).

CARVALHO, M.M. **A comparative study of response of six Stylosanthes species to acid soil factors with particular reference to Al**. Quensland: University of Quesland, 1978. (Tese de Doutorado).

CARÚ, M. Characterization of native Frankia strains isolated from chilean shrubs (Rhamnaceae). **Pl. Soil**, v.157, p.137-145, 1993.

CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.38, n.4, p.392-397, 1988.

CHEN, W.X.; LI, G.S.; QI, Y.L.; WANG, E.T.; YUAN, H.L.; LI, J.L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.41, p.275-280, 1991.

CORBY, H.D.L. Types of rhizobial nodules and their distribution among the Leguminosae. **Kirkia**, v.3, n.1, p.53-123,1988.

CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; VANDERLEYDEN, J. Complementation for nitrogen fixation of an innefective Phaseolus bean hipernodulating *Rhizobium strain*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, Londrina, 1993. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1993. p.38.

CUSATO, M.S.; TORTOSA, R.D. Presence of sporangia of *Frankia* in the rhizosfere of Discaria (Rhamnaceae). **Pl. Soil**, v.148, p.285-288, 1993.

DE FARIA, M.P.; VALE DO, F.R.; SIQUEIRA, J.O.; CURI, N. Crescimento inicial de Albizia lebbeck sob a influência de doses de P e fungos micorrízicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 24, Goiânia, 1993. **Resumos**. Goiânia: SBCS, 1993. p.359-360.

DREYFUS, B.L.; DOMMERGUES, Y.R. Nodulation of Acacia species by fast - and slow-growing tropical strains of Rhizobium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.41, n.1, p.97-99, 1981.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. nov.. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **Int. J. of Syst. Bacteriol.**, v.38, p.89-98, 1988.

DUCKE, A. Notas sobre a flora neotrópica - II. As leguminosa da Amazônia Brasileira. **IAN boletim técnico**, 18, Belém, 1949, 248p.

DUPUY,N.; LORQUIN,J.; N'DIAYE,S.; ALAZARD,D.; GILLIS,M. & DREYFUS,B. Les *Bradyrhizobium d'Acacia albida et d'Aeschynomene* sp. bacteries photosynthetiques et non photosynthetiques. In: Interactions Plantes Microorganismes. **Fondation Internationale pour la Science**, Senegal, 1992, p.371-381.

EAGLESHAM,A.R.J.; ELLIS,J.M.; EVANS,W.R.; FLEISCHMAN,D.E.; HUNGRIA,M.; HARDY,R.W.F. The first photosynthetic N_2-fixing *Rhizobium*: Characteristics. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L. E.; STACEY, G.; NEWTON, W. E. ed. **Nitrogen fixation: achievements and objectives.** New York: Chapman and Hall, 1990. p.805-811.

FARIA, S.M.; McINROY, S.G.; SPRENT, J.I. The occurrence of infected cells, with persistent infection threads, in legume root nodules. **Can. J. Bot.**, v.65, p.553-558, 1987a.

FARIA, S.M.; MOREIRA, V.C.G.; FRANCO, A.A. Selection of *Rhizobium* spp. for forest legumes. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.175-179, 1984.

FARIA, S.M.; LEWIS, G.P.; SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M. Ocurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytol.**, v.111, p.607-619, 1989.

FARIA, S.M.; SUTHERLAND, J.M.; SPRENT, J.I. A new type of infected cell in root nodules of Andira spp. (Leguminosae). **Plant Sci.**, v.45, p.143-147, 1986a.

FARIA, S.M.; LIMA, H.C.; FRANCO, A.A.; MUCCI, E.S.F.; SPRENT, J.I. Nodulation of legume trees from SE Brazil. **Pl. Soil**, v.99, p.347-356, 1987.

FARIA, S.M.; FRANCO, A.A.; MENANDRO, M.S.; JESUS, R.M. DE; BAITELLO, J.B.; AGUIAR, O.T. DE; D.BEREINER, J. Survey on nodulation of indigenous legume trees in southeast Brazil. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.143-153, 1984b.

FARIA, S.M.; FRANCO, A.A.; DE JESUS , R.M.; MENANDRO, M.S.; BAITELLO, J.B.; MUCCI, E.S.F.; D.BEREINER, J.; SPRENT, J.I. New nodulating legume trees from South-East Brazil. **New Phytol.**, v.98, p.317-328, 1984a.

FRANCO, A.A. Fixação de nitrogênio em árvores e fertilidade do solo. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.253-261, 1984.

GAUTHIER, D.L.; DIEM, H.G.; DOMMERGUES, Y.R. Tropical and subtropical actinorhizal plants. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.119-136, 1984.

GOI, S.R.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K.; JACOB-NETO, J. Influence of nitrogen form and concentration on the nitrogen fixation of *Acacia auriculiformis*. **Symbiosis**, v.14, p.115-122, 1992.

GRAHAM,P.H. Identification and classification of root nodule bacteria. In: NUTMAN,P.S. (ed.) **Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants**. Cambridge University, Cambridge, 1976, p99-112. (IBP, 7)

GRAHAM, P.H.; SADOWSKY, M.J.; KEYSER, H.H.; BARNET, Y.M.; BRADLEY, R.S.; COOPER, J.E.; DE LEY, D.J.; JARVIS, B.D.W.; ROSLYCKY, E.B.; STRIJDOM, B.W. & YOUNG, J.P.W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.41, n.4, p.582-587, 1991.

HAAG, H.P. **Nutrição Mineral de *Eucaliptus, Pinus, Araucaria* e *Gmelina* no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 202p.

HENDRICKSON, O.Q.; BURGESS, D.; PERINET, P.; TREMBLAY, F.; CHATATPAUL, L. Effects of *Frankia* on field perfomance of *Alnus* clones and seedlings. **Pl. Soil**, v.150, p.295-302, 1993.

HERNANDEZ, B.S.; FOCHT, D.D. Invalidity of the concept of slow growth and alkali production in cowpea rhizobia. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.48, n.1, p.206-210, 1984.

HERRERA, M.A.; SALAMANCA, C.P.; BAREA, J.M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified mediterranean ecosystems. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, n.1, p.129-133, 1993.

H.GBERG, P. Nitrogen-fixation and nutrient relations in savanna woodland trees (Tanzania). **J. of Appl. Ecol.**, v.23, p.675-688, 1986.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A.; SPRENT, J.I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Pl.Soil**, v.149, p.103-109, 1993.

HUSS-DANELL, K. Influence of host (*Alnus* and *Myrica*) genotype on infectivity, N_2 fixation, spore formation and hydrogenase activity in *Frankia*. **New Phytol.**, v.119, p.121-127, 1991.

HUTTON, E.M. Melhoramento e seleção de *Leucaena* para solos tropicais ácidos. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.263-274, 1984.

IRWIN, H.S. Preface. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. ed., **Advances in Legume Systematics**. Part I. Kew: Royal Botanical Gardens, 1981.

JASPER, D.A.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. *Acacias* respond to additions of phosphorus and to inoculation with VA mycorhizal fungi in soils stockpiled during mineral sand mining. **Pl. Soil**, v.115, p.99-108, 1989.

JENKINS, M.B.; VIRGINIA, R.A.; JARREL, W.M. Rhizobial ecology of the woody legume mesquite (*Prosopis glandulosa*) in the Sonoran desert. **Appl Environ.Microbiol.**, v.53, n.1, p.36-40, 1987.

JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.D. ed., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p.234-244.

JORDAN, D.C. Taxonomy of the *Rhizobiaceae* - an overview, 1987.

KIRKBRIDE-JÚNIOR, J.H. Legumes of cerrado. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.23-46, 1984.

KURDALI, F.; RINAUDO, G.; MOIROUD, A.; DOMENACH, A.M. Competition for nodulation and $^{15}N_2$-fixation between a Sp^+ and a Sp^- *Frankia* strain in *Alnus incana*. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, n.1, p.57-64, 1990.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL,S. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Can.J. Microbiol.**, v.38, n.6, p.501-505, 1992.

LAJUDIE, P. DE; LORTET, G.; NEYRA, M.; BADJI, S.; NDOYE, I.; BOIVIN, C.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Etude taxonomique des *Rhizobium* sp. d'*Acacia* et de *Sesbania*. In: **Interactions Plantes Microorganismes**. Dakar: Fondation Internationale pour la Science, 1992. p238-245.

LAWRIE, A.C. **Relationships among Rhizobia from native Australian legumes**. v.45, n.6, p.1822-1828, 1983.

LECHEVALIER, M.P. Taxonomy of the genus *Frankia*. In: AKKERMANS, A.D.L.; BAKER, D.; HUSS-DANELL, K.; TJPKEMA, J.D. ed., ***Frankia* symbiosis and actinorhizal plants**. The Hague: Nijhoff/Junk Publishers, 1984. p.1-6.

LECHEVALIER, M.P.; RUAN, J-S. Physiology and chemical diversity of *Frankia* spp. isolated from nodules of *Comptonia peregrina* (L.) Coult and *Ceanothus americanus* L. **Pl.Soil**, v.78, p.15-22, 1984.

LESUEUR, D.; DIEM, H.G; DIANDA, M.; LE ROUX, C. Selection of *Bradyrhizobium* strains and provenances of *Acacia mangium* and *Faidherbia albida*: Relationship with their tolerance to acidity and aluminium. **Pl.Soil**, v.149, p.159-166, 1993.

LIM, G.; NG, H.L. Root nodules of some tropical legumes in Singapore. **Pl.Soil**, v.46, p.317-327, 1977.

LINDSTRÖM, K *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. **Int.J.Syst. Bacteriol.**, v.39, n.3, p.365-367, 1989.

MAGALHÃES, F.M.M. Present state of knowledge on biological nitrogen fixation in Amazonia. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1, Belém,1986, **Anais**, Vol. 1, Belém: EMBRAPA/CPATU, 1986, p499-512.

MAGALHÃES, F.M.M.; SILVA, M.F. Associações *Rhyzobium* - leguminosas no estado de Rondônia. **Acta Amazon.**, v.16/17, sup :7-17, 1986/87.

MAGALHÃES, F.M.M.; MAGALHÃES, L.M.S.; OLIVEIRA, L.A.; D.BEREINER, J. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme nativas da região de Manaus-AM. **Acta Amazon.**, v.12, p.509-514, 1982.

MAGALHÃES, L.M.S.; BLUM, W.E.H. Nodulação e crescimento de *Cedrelinga catenaeformis* Ducke em plantios experimentais na região de Manaus, AM. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.159-164, 1984.

MAGALHÃES, L.M.S.; FERNANDES, N.P. Experimental stands of leguminous forests in the Manaus region. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.75-79, 1984.

MANSOUR, S.R.; TORREY, J.G. *Frankia* spores of strain $HFPCg^{14}$ inoculum for seedlings of *Casuarina glauca.* **Can. J. Bot.**, v.69, p.1251-1256, 1991.

MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.B.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a new species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp. trees. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.41, n.3, p.417-426, 1991.

MASCHIO, L.M.A.; SCALZO, M.S.; GAIAD, S.; GRIGOLETTI-JúNIOR, A. Bracatinga (*Mimosa scabrella*), eucalipto *(Eucalyptus viminalis*) e pinus (*Pinus taeda*) na recuperação da biodiversidade, a nível microbiológico, de solos degradados. In: CONGRESSO NACIONAL DE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2, Manaus, 1992. **Anais**. Manaus: INPA, 1992. p.457-462.

MATOS, A.O. Ocorrência de nodulação espontânea em leguminosas florestais nativas de Capitão Poço-PA. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO,1, Belém, 1986. **Anais**, Vol.1. Belém: EMBRAPA/CPATU, 1986. p.287-294.

MEESTERS, T.M.; VAN VLIET, W.M.; AKKERMANS, D.L. Nitrogenase is restricted to the vesicles in *Frankia* strain EAN1pec. **Physiol. Plant.**, v.70, p.267-271, 1987.

MILLER, I.M.; BAKER, D. Nodulation of actinorhizal plants by *Frankia* strains capable of both root hair infection and intercellular penetration. **Protoplasma**, v.131, p.82-91, 1986.

MILLER, I.M.; DONELLY, A.E. Location and distribution of symbiotic bacteria during floral development in *Ardisia crispa.* **Pl. Cell Environ.**, v.10, n.9, p.715-724, 1987.

MILLER, I.M.; SCOTT, A.; GARDNER, I.C. Leaf nodule development in *Physichotria kirkii*, Rubiaceae. **Ann. Bot.**, v.52, n.6, p.791-802, 1983.

MIRZA, M.S.; AKKERMANS, W.M.; AKKERMANS, A.D.L. PCR-amplified 16S rRNA sequence analysis to confirm nodulation of *Datisca cannabina* L. by the endophyte of *Coriaria nepalensis* Wall. **Pl.Soil**, v.160, p.147-152, 1994.

MOREIRA, F.M.S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de *Leguminosae* introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica.** UFRRJ Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, 1991, 160p.

MOREIRA, F.M.S.; MOREIRA, F.W. Características da germinação natural de sementes de plântulas de 56 espécies de leguminosas florestais nativas da Amazônia em condição de viveiro. Submetido a Acta Amazônica.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, M.F.; FARIA, S.M. Ocurrence of nodulation in legume species in the Amazon Region of Brazil. **New Phytol.**, v.121, p.563-570, 1992.

MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical *Leguminosae* by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.16, p.135-146, 1993.

MUNNS, D.N.; FRANCO, A.A. Soil constraints to legume production. In: GRAHAM,P.H.; HARRIS, S.C. ed., **Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture.** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1981. p.133-152.

NAIR, P.K.R.; FERNANDES, E.C.M.; WANBUGU, P.N. Multipurpose leguminous trees and shrubs for agroforestry. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.295-313, 1984.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES **Tropical legumes, resources for the future**. Washington, 1979. 331p.

NEVES, M.C.P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.6, n.3, p.267-321, 1987.

NORRIS, D.O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Pl. Soil**, v.22,n.2, p.143-166, 1965.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; VILELA, E.A.; GAVILANES, M.L.; CARVALHO, D.A. Woody flora and soils of six areas of semideciduous montane forest in Southern Minas Gerais, Brazil. Submetido ao Edinburgh Journal of Botany, 1994.

OSONUBI, O; MULONGOY, K.; AWOTOYE, O.O.; ATAYESE, M.O.; OKALI, D.U.U. Effects of ectomycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on drought tolerance of four leguminous woody seedlings. **Pl. Soil**, v.136, p.131-143, 1991.

PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhyzobium* sp. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, n.1, p.23-28, 1990.

PALM, C.A.; SANCHEZ, P.A. Nitrogen release from the leaves of some tropical legumes as affected by their lignin and polyphenolic contents. **Soil Biol.Biochem.**,v.23, n.1, p.83-88, 1991.

PANKHURST, C.E. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating Lotus species. **Can. J. Microbiol.**, v.23, p.1026-1033, 1977.

PARROTTA, J.A. The role of plantation forests in rehabilitating degraded tropical ecosystems. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.41, p.115-133, 1992.

PAULA , M.A. DE **Germinação de esporos e crescimento de hifas de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares em cultura com células vegetais micropropagadas *in vitro*.** ESAL Projeto de Pesquisa, 1986, 29p.

POLHILL, R.M. *Papilionoideae*. In: POLHILL,R.M.; RAVEN, P.H. ed., **Advances in Legume Systematics**. Part 1. Kew: Royal Botanical Gardens, 1981.

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.; STIRTON, C.H. Evolution and systematics of the *Leguminosae*. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. ed., **Advances in Legume Systematics.** Part 1. Kew: Royal Botanical Gardens, 1981.

RAMANI, S.; SHAIKH, M.S.; JOSHUA, D.C. Nodulation, biomass and nitrogen content in *Sesbania* species. **Pl.Soil**, v.128, p.221-223, 1990.

RIBEIRO-JÚNIOR, W.Q.; LOPES, E.S.; FRANCO, A.A. Eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. para quatro leguminosas arbóreas e competitividade das estirpes em *Albizia lebbeck* em latossolo ácido. **R. bras. Ci. Solo**, v.11, p.275-282, 1987.

SAINI, I.; DOGRA, C.; NAGPAL, P. Uptake hydrogenase in fast-growing strains of *Rhizobium* sp. (*Sesbania*) in relation to nitrogen fixation. **J. Appl. Bacteriol.**, v.62, p.449-452, 1987.

SANGINGA, N. Nitrogen fixation by trees and its contribution to the nitrogen status of soils or associated crops. In: **Interactions Plantes Microorganismes**. Dakar: Fondation Internationale pour la Science, 1992. p.14-32.

SANGINGA, N.; BOWEN, G.D.; DANSO, S.K.A. Assessement of genetic variability for N_2 fixation between and within provenances of *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* estimated by ^{15}N labelling techniques. **Pl. Soil**, 127:169-178, 1990a.

SANGINGA,N.; BOWEN,G.D. & DANSO,S.K.A. Genetic variability in symbiotic nitrogen fixation within and between provenances of two casuarina species using the ^{15}N-labeling methods. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, n.4, p.539-547, 1990b.

SANGINGA, N.; MULONGOY, K.; AYANABA, A. Effectivity of indigenous rhizobia for nodulation and early nitrogen fixation with *Leucaena leucocephala* grown in Nigerian soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.21, n.2, p.231-235, 1989c.

SCHOLLA, M.H.; ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.34, p.484-486, 1984.

SCHUBERT, K.R.; EVANS, H.J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.73, p.1207, 1976.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.43, n.2, p.374-377, 1993.

SELLSTEDT, A.; WINSHIP, L.J. Hydrogen metabolism of *Casuarina* root nodules: A comparison of two inoculum sources. **Physiol. Plant.**, v.70, p.367-372, 1987.

SELLSTEDT, A.; ROSBROOK, P.A.; KANG, L.; REDDELL, P. Effect of carbon on growth, nitrogenase and uptake hydrogenase activities of *Frankia* isolates from *Casuarina* sp. **Pl. Soil**, v.158, p.63-68, 1994.

SHARMA, S.; MADAN, S. Microbial protein from leguminous and non-leguminous substrates. **Acta Biotechnol.**, v.13, n.2, p.131-139, 1993.

SILVA, G.G.; FRANCO, A.A. Selection of *Rhizobium* spp. strains in culture medium for acid soil. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.169-173, 1984.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo** - Fundamentos e Perspectivas. Brasília: MEC/ABEAS/ESAL/FAEPE,1988. 236p.

SMALL, E. The evolution of genera in the *Leguminosae*. In: STIRTON, C.H.; ZARUCHI, J.L. ed., **Advances in Legume Biology.**, 1989. p467-486.

SOUZA, L.A.G.; MAGALHãES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A. Avaliação do crescimento de *Rhizobium* de leguminosas florestais tropicais em diferentes meios de cultura. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.165-168, 1984.

SOUZA, L.A.G.; SILVA, M.F.; MOREIRA, F.W. Capacidade de nodulação de cem leguminosas da região amazônica. Submetido a Acta Amazônica.

SPRENT, J.I. Which steps are essential for the formation of functional legume nodulesâ. **New Phytol.**, v.111, p.129-153, 1989.

SPRENT, J.I.; CORDEIRO, L. Nodulated legume trees in the cerrado: taxonomic distribution, infection process and nodule morphology. **Ci. Cult.**, v.44, n.5, p.336-338, 1992.

SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M.; FARIA, S.M. Structure and function of root nodule from woody legumes. In: STIRTON, C.H.; ZARUCHI, J.L. ed., **Advances in legume biology.** 1989. p.559-578.

STEENIS, C.G.; VAN, G.J. A review of the genus *Sympetalandra* Stapf and ist position in Caesalpinioideae. **Blumea**, v.22, p.159-167, 1975.

SUN, J.S.; SIMPSON, R.J.; SANDS, R. Nitrogenase activity of two genotypes of *Acacia mangium*, as affected by phosphorus nutrition. **Pl. Soil,** v.144, p.51-58, 1992.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; OLIVEIRA, L.A. DE; PODESTA-FILHO, J.A.; ST. JOHN, T.V. Nodulation of legumes, nitrogenase activity of roots and ocurrence of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. in representative soils of central Amazonia. **Agro Ecosyst.**, v.6, p.249-266, 1980.

TJEPKEMA, J.D. Physiology of actinorrizas. In: VEEGER, C.; NEWTON, W.E. ed., **Advances in N_2 fixation research.** The Hague: Martinus Nijhoff, 1984.

TORREY, J.G. *Casuarina*: actinorhizal nitrogen fixing tree in the tropics. In: GRAHAM, P.H.; HARRIS, S.C. ed., **Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture.** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. p.427-439.

TORREY, J.G. Endophyte sporulation in root nodules of actinorhizal plants. **Physiol. Plant.**, v.70, p.279-288, 1987.

TRINICK, M.J. Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii* plant. **Can. J. Microbiol.**, v.25, p.565-578, 1979.

TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus, Leucaena leucocephala, Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. **J. Appl. Bacteriol.**, v.49, p.39-53, 1980.

TUTIN, T.G. Classification of the legumes. In: HALLSWORTH, E.G. ed., **Nutrition of the legumes.** New York: Academic Press, 1958. p.3-14.

VASCONCELOS, J.I.P.; ALMEIDA, R.T. DE. **Fixação biológica de nitrogênio em plantas de interesse econômico do nordeste.** Fundação Cearense de Pesquisa e Cultura, Relatórios técnicos I, II e III, 1979, 80p.

VINCENT, J.M. **A manual for practical study of the root-nodule bacteria.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.

VINCENT, J.M. ed., **Nitrogen fixation in legumes.** New York: Academic Press, 1982. 288p

VIRGINIA, R.A.; BAIR, L.M.; LA FAVRE, J.S.; JARREL, W.M.; BRYAN, B.A.; SHEARER, G. Nitrogen fixation efficiency natural ^{15}N abundance and morphology of mesquite (*Prosopis glandulosa*) root nodules. **Pl. Soil**, v.79, p.273-284, 1984.

WEBER,A.; NURMIAHO-LASSILA,E.L. & SUNDMAN,V. Features of the intrageneric *Alnus-Frankia* specificity. **Physiol. Plant**., v. 70, p.289-296, 1987.

YOUNG,J.P.W. & JOHNSTON,A.W.B. The evolution of specificity in the legume-rhizobium simbiosis. **Tree,** v.4, n. 11, p.341-349, 1989.

ZHANG,X.; HARPER,R.; KARSISTO,M. & LINDSTR.M,K. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 41, n. 1, p. 104-113, 1991.

ZHANG,Z. & TORREY,J.G. Studies of an effective strain of *Frankia* from *Allocasuarina lehmanniana* of the Casuarinaceae. **Pl. Soil**, v. 87, p. 1-6, 1985.

ZHANG,Z.; LOPEZ,M.F. & TORREY,J.G. A comparison of cultured characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from nodules of *Casuarina* species. **Pl. Soil**, v. 78, p. 79-90, 1984.

ZHONGZE,Z.; MURRY,M.A. & TORREY,J.G. Culture conditions influencing growth and nitrogen fixation in *Frankia* sp. HFPCc13 isolated from casuarina. **Pl. Soil**, v. 9, p. 13-15, 1986.

CAPÍTULO 5

MICORRIZAS ARBUSCULARES

José Oswaldo Siqueira[1]

5.1. Introdução

Micorrizas são associações simbióticas mutualistas formadas entre certos fungos do solo e raízes da maioria das espécies vegetais, constituindo-se no estado natural das raízes da maioria das plantas. Elas têm sido objeto de estudo desde o século passado, quando, em 1885, o botânico alemão Albert Bernard Frank usou o termo micorriza para descrever este fenômeno de ocorrência generalizada na terra e especulou sobre seus efeitos benéficos para a nutrição e crescimento das plantas, posição contrária aos estudiosos da época, que as consideravam de natureza parasítica (Trappe & Berch, 1985). Mais tarde, o próprio Frank demonstrou experimentalmente a natureza mutualista das micorrizas, considerando-as "um órgão morfologicamente independente, mas com dependência fisiológica íntima e recíproca". Os fatos e considerações feitos por ele foram confirmados pelos pesquisadores atuais e serviram de base para a micorrizalogia, que ocupa hoje posição de destaque no mundo todo.

As micorrizas existem desde há 400 milhões de anos, e o caráter mutualista das mesmas contribui para sobrevivência e evolução das plantas terrestres e dos fungos (Harley & Smith, 1983), pois o fungo simbionte aumenta a capacidade da planta de absorver nutrientes do solo, favorecendo sua nutrição, enquanto a planta fornece fotossintatos para o fungo que é incapaz de realizar fotossíntese. O mutualismo entre o fungo e as raízes é favorecido pela: a) existência de uma fase biotrófica persistente; b) compatibilidade estrutural e fisiológica entre os parceiros; e c) pela habilidade dos simbiontes de atuarem de maneira regulável.

Baseando-se na morfoanatomia das raízes colonizadas (**Figura 5.1**), as micorrizas são agrupadas em ectomicorrizas, ectendomicorrizas e endomicorrizas (**Tabela 5.1**), diferindo substancialmente em relação a outras características funcionais e ecológicas. As ectomicorrizas são caracterizadas pela penetração apenas intercelular do córtex pelo micélio fúngico e formação da "rede de Hartig" em substituição à lamela média e do manto que recobre a superfície da raiz. A micorrização ocorre apenas nas raízes laterais ou absorventes, as quais sofrem modificações morfológicas muito acentuadas e visíveis a olho desarmado. As ectendomicorrizas são geralmente ectomicorrizas com penetração intracelular, havendo diferenças anatômicas de acordo com a planta hospedeira como em subgrupos das coníferas e de espécies das *Ericales*, como nos gêneros *Arbutos* e *Monotropa*. As endomicorrizas caracterizam-se pela ausência de manto externo, alterações morfológicas visuais e pela penetração inter e intracelular do fungo no córtex. Elas são de ocorrência generalizada e subdivididas em Ericóides (ordem *Ericales* x Ascomicetos), *Orquidóides* (*Orchidaceae* x *Rhizoctonia*) e Vesículo-arbusculares

[1]Professor, Ph.D., Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Caixa Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG.

Vesículo-arbusculares ou Arbusculares (maioria das espécies x Zigomicetos da ordem *Glomales*). As endomicorrizas ericóides e orquidóides, bem como os outros dois tipos, são de ocorrência restrita a certos ecossistemas, de pouco interesse agronômico e não serão abordadas neste capítulo. Aspectos básicos e aplicados destes tipos de micorrizas, podem ser encontrados em Marks & Kozlowski (1973), Harley & Smith (1983) e Allen (1992), dentre outros.

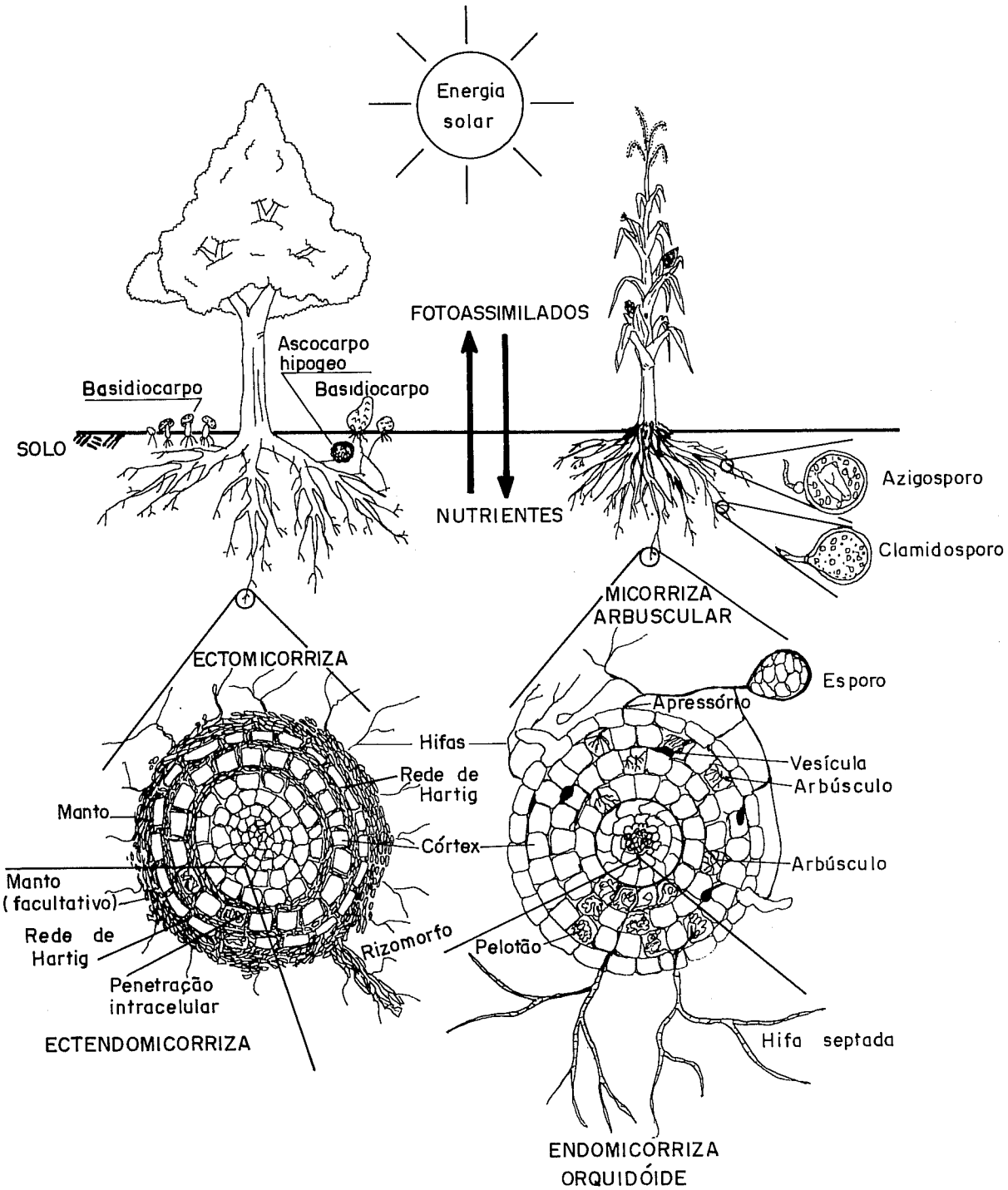


Figura 5.1. Sistemas micorrízicos e suas características anatômicas.

Tabela 5.1. Características diferenciais dos diversos tipos de micorrizas.

Tipo de micorriza	Principais características
Arbuscular ou vesículo-arbuscular	• Ocorre na maioria das plantas vasculares (± 300 mil espécies). • Zigomicetos da ordem *Glomales* (± 140 espécies). • Cosmopolita, mas tipo predominante nos trópicos. • Penetração inter e intracelular (arbúsculos). • Vesículas em certas espécies e esporos característicos. • Fungo asseptado e biotrófico obrigatório. • Sem evidência de especificidade hospedeira.
Ectomicorriza	• Árvores e arbustos especialmente as de clima temperado • Maioria Basidiomicetos e poucos Ascomicetos (± 5000 espécies). • Predominante em clima temperado e menos comum nos trópicos. • Penetração apenas intercelular (rede de Hartig). Formação do manto e alteração morfológica visível a olho desarmado. • Apresenta certa especificidade hospedeira.
Ericóide	• Membros das *Ericales* com raízes finas como *Calluna* e *Vaccinium.* • Ocorrência muito reduzida, restrita a certos ecossistemas. • Ascomicetos (septados) com penetração inter e intracelular(hifas enroladas). • Elevada especificidade hospedeira.
Orquidóide	• Membros da família *Orchidaceae* com estirpes de *Rhizoctonia* (septado). • Ocorre nas florestas tropicais e temperadas. • Penetração inter e intracelular (pelotões). • Alta especificidade hospedeira.
Ectendomicorriza	• Membros das *Ericales* como *Arbutos* e *Monotropa.* • Basidiomicetos, muitos dos quais são ectomicorrízicos. • Penetração inter e intracelular, manto (facultativo) com rede de Hartig. • Acentuada modificação morfológica na raiz. • Elevada especificidade hospedeira.

As micorrizas arbusculares (MAs) parecem ter evoluído nos trópicos (Pirozynski, 1981), apresentam pouca ou nenhuma especificidade na relação fungo-hospedeiro e ocorrem de modo generalizado na maioria das espécies e ecossistemas, sendo consideradas uma simbiose universal (Nicholson, 1967). Exceções notáveis à condição não-micorrízica, incluem membros das famílias *Brassicaceae*, *Comelinaceae*, *Juncaceae*, *Proteaceae*, *Cyperaceae*, *Chenopodiaceae* e outras. Das espécies de interesse agronômico, 87% das Crucíferas (nabo, canola, mostarda, repolho), 61% das *Chenopodiaceae* (beterraba), 37% das *Poligonaceae* ("buckwheat"), 4% das leguminosas (tremoço) e membros da *Amarantaceae* não formam MAs (Thompson, 1994). As razões para a resistência das plantas à micorrização parecem ser de natureza evolucionária e não são conhecidas com exatidão. No entanto, a condição não-micorrízica pode resultar do seguinte: a) produção e acúmulo no córtex de compostos fungistáticos, como certos compostos aromáticos em leguminosas, como tremoços, e glicosinolatos nas crucíferas; b) quantidade insuficiente de exsudatos ou de certos constituintes destes; c) ausência de fatores químicos estimulantes que atuariam como sinais moleculares ou mediadores nutricionais; e d) outras razões, como ausência de reconhecimento e aderência do fungo ao hospedeiro e barreira física ou química na parede celular. Mecanismos distintos podem atuar nas diferentes espécies não-micorrízicas. Estima-se que as MAs ocorrem em quase 300 mil espécies e são tão velhas quanto as plantas terrestres (Jeffries, 1987). Devido a essa ocorrência generalizada e aos benefícios para a planta hospedeira e para o funcionamento do ecossistema, elas são de grande significância ecológica e agrícola e têm sido objeto de grande volume de pesquisa básica e aplicada (Allen, 1992; Janos, 1983; Jeffries, 1987). As MAs são de interesse especial para as regiões tropicais e subtropicais, especialmente para o Brasil devido: a) baixa fertilidade dos solos e elevado requerimento de nutrientes pela maioria das culturas; b) condições ambientais estressantes; c) alta proporção de minifundiários com pequeno poder aquisitivo; d) suprimento limitado de fertilizantes em certas áreas; e) alto custo dos financiamentos agrícolas; f) possível exaustão dos depósitos de fosfatos; e g) preocupação crescente com a qualidade ambiental, visando minimizar os impactos da poluição do solo e água e do desmatamento sobre o ambiente.

Assim, as MAs são componentes importantes dos ecossistemas e desempenham papel crucial para sua funcionalidade e sustentabilidade. A biologia, ecologia, efeitos no crescimento das plantas e aplicações dos fungos formadores das MAs são abordados nos tópicos seguintes deste capítulo.

5.2. Formação e Funcionamento da Simbiose

As MAs resultam de uma seqüência complexa de interações entre a hifa fúngica e células das raízes que estabelecem uma relação simbiótica representada por um estado dinâmico com perfeita integração morfológica, fisiológica e funcional. Embora algumas etapas fenológicas do estabelecimento desta simbiose sejam bem caracterizadas, muito pouco se conhece dos mecanismos bioquímicos e moleculares da interação fungo-planta. Ao contrário do que se verifica em outros sistemas simbióticos entre plantas e microrganismos, não existe evidência de especificidade na relação fungo-planta nas MAs, no que refere à colonização, mas existe, no entanto, um alto grau de "compatibilidade funcional" que determina a efetividade simbiótica da relação (Gianinazzi, 1991; Koide & Schreiner, 1992).

As expressões fenotípicas nas MAs são determinadas pelo genoma do fungo e da planta, dos quais quase nada é conhecido até o presente. A capacidade de formar MAs é restrita a um grupo de fungos pertencentes a três famílias da ordem *Glomales* dos Zigomicetos (ver item **5.3.1.**), das quais são conhecidas em torno de 140 espécies, distribuídas em apenas seis gêneros. Estes fungos são simbiontes obrigatórios, com reprodução assexuada e ainda não foram cultivados em meios de cultura

na ausência de raízes vivas. O caráter de biotrófico obrigatório dificulta os estudos básicos da biologia destes fungos, bem como limita sua aplicação em larga escala. Ainda não são conhecidos os genes e os fatores genéticos que controlam o ciclo de vida, a infectividade (ou virulência) e eficiência simbiótica destes fungos e os aspectos moleculares da sua relação com a planta hospedeira. O ciclo de vida dos fungos MAs envolve etapas distintas (**Tabela 5.2**) na ausência e presença de raízes vivas. Estruturas reprodutivas, como esporos (**Figuras 5.2** e **5.3**), hifas e micélio, sobrevivem como propágulos na ausência de raízes e, quando na presença destas, colonizam o córtex radicular e estabelecem relação simbiótica, que garante a produção de novos propágulos e também de um ciclo policíclico (Wilson & Tommerup, 1992). Na rizosfera, os esporos germinam, produzem micélio, hifas infectivas e apressório, através do qual penetram a raiz, onde se estabelece e coloniza parte do córtex, e diferencia formando os arbúsculos (estruturas intracelulares), que são os pontos de troca de metabólitos entre os parceiros da simbiose. Formados os arbúsculos, ocorre a integração morfológica, fisiológica, bioquímica e funcional e o estabelecimento do "mutualismo", resultando no micotrofismo (absorção de nutrientes, via fungo), que favorece o crescimento da planta e o biotrofismo (fluxo de fotossintatos do hospedeiro para o fungo), e garante a propagação e sobrevivência do fungo (Siqueira, 1991). Os principais componentes e fases do ciclo dos fungos e MAs, bem como os eventos biológicos e fatores envolvidos no estabelecimento e funcionamento das MAs, são bem discutidos em Brundrett (1991) e Abbott & Robson (1991) e encontram-se resumidos na **Tabela 5.2**. Siqueira (1991) e Koide & Schreiner (1992) discutem as fases e os principais aspectos da relação fungo-planta, os quais estão resumidos a seguir:

a) Germinação dos esporos - pode ser favorecida na rizosfera, mas não sofre influência específica da presença da raiz, exsudatos ou seus componentes.
b) Crescimento assimbiótico na rizosfera e na superfície das raízes - é estimulado por fatores nutricionais produzidos e liberados pelo hospedeiro, os quais induzem a melhor utilização de reservas endógenas do esporo ou atuam como ativadores de genes de crescimento. Alguns compostos voláteis, CO_2 e flavonóides podem atuar como agentes estimulantes.
c) Reconhecimento e formação de apressório - é uma etapa ainda pouco conhecida, mas pode envolver a indução de genes específicos que controlam o caráter simbiótico do fungo e a resistência do hospedeiro à invasão. Por ser um sistema não-patogênico, a planta não apresenta respostas típicas como aquelas verificadas na relação patógeno-hospedeiro. Compostos orgânicos presentes nos exsudatos, como os flavonóides, podem facilitar o contacto célula-célula entre os simbiontes e facilitar a colonização micorrízica. As indicações do envolvimento de genes do desenvolvimento das MAs no hospedeiro, como os genes "Myc específicos", "Myc repressores" e "Myc facilitadores", são evidências do mecanismo preciso de controle desta simbiose (S.E.Smith, Comunicação pessoal).
d) Penetração da raiz e colonização do córtex - parecem estar sujeitas a uma regulação funcional resultante do alto grau de compatibilidade fungo-planta, envolvendo respostas fisiológicas como a produção de enzimas e hormônios. A presença de enzimas específicas "micorrizinas" indica o envolvimento de mecanismos genéticos e a perfeita integração bioquímica entre os parceiros.
e) Formação de arbúsculos e estabelecimento da relação simbiótica - resultam de mecanismos ainda desconhecidos que podem envolver uma complementaridade genética da relação fungo-planta, adquirida durante os milhões de anos da co-evolução. Estas podem ser mediadas por mecanismos táticos ou sinais moleculares, os quais estão sob controle genético (letra d) e são modulados pelo ambiente.

f) Funcionamento do mutualismo - a planta fornece fotossintatos que servem como fonte de energia e possivelmente fatores de crescimento, enquanto o fungo absorve e transfere nutrientes minerais como o fósforo. Mecanismos de ajustes fisiológicos na planta compensam o dreno energético causado pelo fungo na raiz.

Em termos práticos, o estabelecimento das MAs é determinado pela densidade de propágulos, que determina o potencial de inóculo ou infectividade, e pelas características do hospedeiro, como sua própria suscetibilidade à micorrização e crescimento das raízes, considerando que a chamada "hifa infectiva" intercepta uma raiz suscetível por acaso. Não há atração específica ou direcionada do crescimento micelial na rizosfera (Ver Allen, 1992, capítulo 1).

Tabela 5.2. Principais fases e eventos do ciclo dos fungos e das micorrizas arbusculares. Adaptado de Brundrett (1991).

Fase ou componente do ciclo	**Evento, mecanismo e fatores**
Propágulos fúngicos (esporos,hifas, raízes)	• Sobrevivência, dispersão, dormência, ativação, crescimento micelial.
Raízes do hospedeiro	• Suscetibilidade, raízes novas, nutrição, taxa de crescimento e exsudação.
Hifa na superfície da raiz	• Proliferação, reconhecimento do hospedeiro, hifa infectiva, apressório.
Penetração da raiz e colonização do córtex	• Compatibilidade com hospedeiro e alteração morfológica do fungo.
Sítios de troca	• Penetração celular, ramificação (arbúsculos) e resposta do hospedeiro.
Processos de troca ativa	• Duração limitada e regulada pela relação fungo-planta-ambiente.
Hifa ativa no solo	• Absorção de nutrientes, exploração do solo, colonização secundária e terciária.
Senescência das estruturas fúngicas	• Degeneração dos arbúsculos, armazenamento nas vesículas.
Formação de propágulos	• Esporos, micélio e raízes colonizadas.
Senescência da raiz	• Perda do córtex (morte e parasitismo) e reciclagem dos nutrientes.

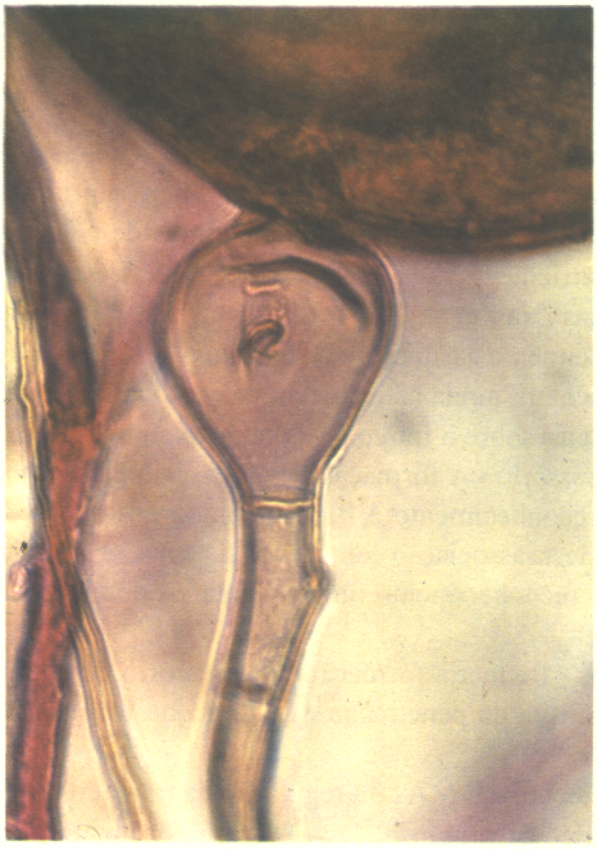


Figura 5.2. Esporo do tipo azigosporo, com hifa de sustentação, pertencente ao gênero *Scutellospora*, espécie não descrita, coletado em solo de cerrado, com diâmetro médio = 150 µ.

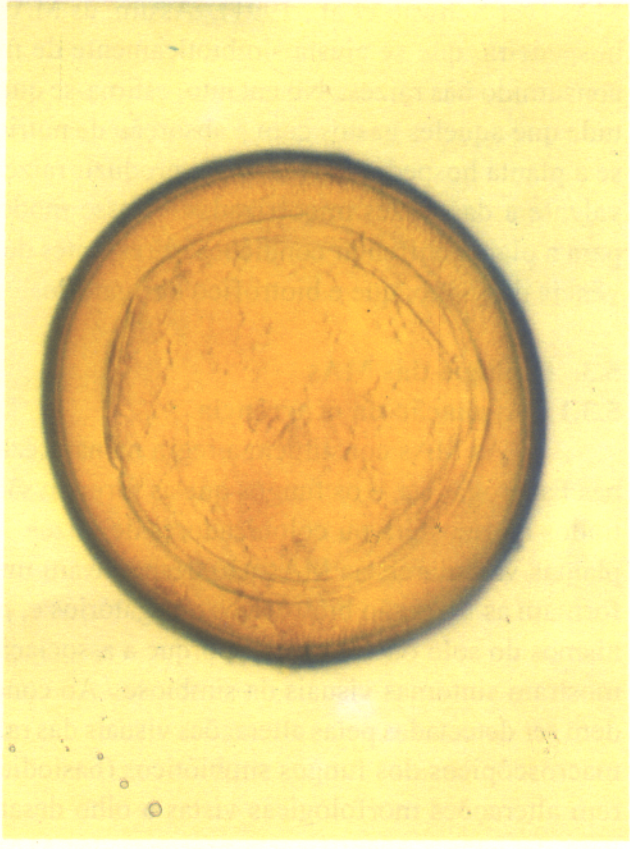


Figura 5.3. Esporo sem hifa de sustentação (sessil), do gênero *Entrophospora*, com diâmetro médio = 100 µ.

Embora algum avanço tenha ocorrido nos últimos cinco anos, muito pouco se conhece sobre as bases moleculares do estabelecimento das MAs. Siqueira (1991) discute três aspectos importantes deste tópico:

a) Sinais moleculares - Plantas de trevo deficientes em fósforo produzem exsudatos radiculares capazes de promover grande estímulo no crescimento do fungo, ao contrário daquelas bem supridas em fósforo (Elias & Safir, 1987). Respostas semelhantes são verificadas para culturas de células de planta hospedeira crescendo em meio pobre em nutrientes (Paula & Siqueira, 1990). Várias substâncias foram isoladas e identificadas nestas plantas (Nair et al., 1991; Rhlid et al., 1993). Amostras autênticas destes compostos estimulam o crescimento assimbiótico de fungos MAs e a colonização micorrízica. Apesar das evidências experimentais, ainda não existem provas qualificativas e definição dos mecanismos de ação destas substâncias sobre o fungo e sua relação com a planta.
b) Mecanismo de reconhecimento e formação de apressório - A formação de apressório é um evento fenotípico bem definido, mas o mecanismo de reconhecimento é fundamentado em evidências circunstanciais nas MAs, baseando-se em analogia desta associação com outros sistemas simbióticos. é necessário conseguir evidências bioquímicas do reconhecimento fungo-planta. A descoberta de mutantes Myc$^-$ representa grande avanço nesta área.
c) Penetração, colonização e formação de arbúsculos - Requer a formação de apressório e atividade enzimática bem balanceada. Mecanismos de controle da penetração e indução da formação de arbúsculos precisam ser elucidados.

Um quarto aspecto importante do estabelecimento das MAs é a regulação da transferência de metabólitos entre o fungo e a planta e o custo energético da simbiose. Diversos estudos apontam que plantas micorrizadas translocam entre 5% a 15% mais carbono fixado para as raízes que plantas sem MAs (ver Schwab et al., 1991). Assim, as MAs representam elevado custo energético para a planta hospedeira, que se ajusta simbioticamente de modo a compensar este dreno extra de energia que é consumido nas raízes. No entanto, estima-se que os custos para manter as MAs são da mesma magnitude que aqueles gastos com a absorção de nutrientes "per se" e, seguramente, muito menores do que se a planta hospedeira tivesse que produzir raízes suficientes para atingir atividade de absorção equivalente a das raízes micorrizadas. Desse modo, esta simbiose representa uma estratégia vantajosa para a planta enfrentar condições estressantes de crescimento e, certamente, uma garantia de sobrevivência do fungo, que é biotrófico obrigatório.

5.3. Ecologia das MAs

5.3.1. Avaliação da ocorrência

As MAs constituem a regra na natureza, e não a exceção, sendo de ocorrência generalizada nas Fanerógamas, e os fungos que as formam são predominantes dentre aqueles normalmente encontrados na rizosfera ou colonizadores de raízes. Apesar de ser o tipo de micorriza predominante nas plantas vasculares, as MAs não despertavam muita atenção até pouco tempo, porque os fungos que formam as MAs são biotróficos obrigatórios e, portanto, não aparecem nos isolamentos de microrganismos do solo ou de raízes e porque a associação é tão bem balanceada que raízes micorrizadas não mostram sintomas visuais da simbiose. Ao contrário do que se verifica nas ectomicorrizas, que podem ser detectadas pelas alterações visuais das raízes colonizadas e presença dos corpos de frutificação macroscópicos dos fungos simbióticos (basiodicarpos e ascocarpos, na maioria), nas MAs não ocorrem alterações morfológicas vistas a olho desarmado e os fungos são microscópicos (**Figura 5.2**). Para detectar e quantificar a presença das MAs, são necessários procedimentos específicos, quais

sejam: a) observação e avaliação microscópica das raízes quanto à presença do fungo e estruturas típicas como arbúsculos, vesículas e esporos; b) extração e separação dos esporos do solo, cuja presença é indicativo da ocorrência da associação no ecossistema; e c) bioensaio para determinação da infectividade do solo e do número mais provável (NMP) de propágulos no solo. As diversas alternativas operacionais para a avaliação da ocorrência das MAs e suas relações ecológicas acham-se resumidas na **Figura 5.4**.

Amostras de raízes lavadas podem ser observadas diretamente pela presença de estruturas fúngicas usando microscopia de fluorescência, mas isto requer muita experiência do observador e tem aplicação muito limitada a certas espécies vegetais. O procedimento mais seguro e amplamente empregado consiste na clarificação e alvejamento das raízes com produtos químicos e posterior coloração com corantes, como azul de trípano e fucsina ácida, os quais evidenciam com muita segurança as estruturas microscópicas do fungo na raiz. O procedimento laboratorial é relativamente simples, existindo diversas alternativas conforme descrito em Dalpé (1993). Os resultados obtidos para colonização micorrízica dependem do procedimento adotado, podendo ser expressos de diversas maneiras como, por exemplo, porcentagem dos segmentos colonizados, porcentagem do comprimento de raiz colonizada, intensidade da colonização e porcentagem de colonização arbuscular. Dois aspectos importantes na avaliação da colonização são a amostragem e a identificação das estruturas fúngicas nas raízes. Deve-se selecionar apenas as raízes finas (< 2mm de diâmetro) e tomar o cuidado de distinguir as estruturas dos fungos Glomelianos daquelas dos saprófitas ou parasitas, normalmente também associados às raízes. Os fungos MAs (*Glomales*) são asseptados (hifas cenocíticas, sem septos) enquanto os outros, na grande maioria, são septados e podem ser distinguidos mesmo com baixa ampliação microscópica. Os fungos das MAs são caracterizados microscopicamente pela presença de hifas não-septadas e/ou estruturas típicas inter e intracelular no córtex e micélio externo (extra-radicular), também asseptado. Os arbúsculos são formados dentro das células enquanto as vesículas, que só ocorrem em certas espécies de FMAs, podem ser formadas entre ou no interior das células. Algumas espécies de fungos formam também esporos dentro das raízes, como espécies clamidospóricas do gênero *Glomus* (Ex. *Glomus intraradices*). Neste caso, distinguem-se esporos intra-radiculares das vesículas, pela espessura e estrutura das paredes. Esporos têm paredes muito espessas (que podem ser laminadas) enquanto as vesículas têm paredes finas.

Outra maneira de avaliar a ocorrência das MAs é o isolamento e extração dos esporos dos FMAs do solo, para contagem do número de esporos, e a determinação da densidade de propágulos e infectividade do solo, pelo método do número mais provável (NMP). Os diversos procedimentos encontram-se também descritos em Dalpé (1993). Entre estes, o mais eficiente e simples é o peneiramento via úmida, que consiste em fazer uma suspensão do solo em água e o peneiramento através de uma série de peneiras com malhas, variando de 0,35 mm a 0,45 mm de abertura. Os materiais retidos nas peneiras intermediárias e na mais fina são retirados e centrifugados em água e sacarose (1M), em centrífugas com rotor horizontal com tubos balançantes. Os esporos ficam no sobrenadante dos tubos e são lavados com água corrente e transferidos para placas para observação e contagem em microscópio estereoscópico, em baixa ampliação. Grupos homogêneos de esporos são montados em lâminas, contendo fixadores como PVL (álcool polivinil em lactofenol), para caracterização microscópica detalhada (100-1000 vezes de aumento) e posterior classificação taxonômica (Schenck & Perez, 1987).

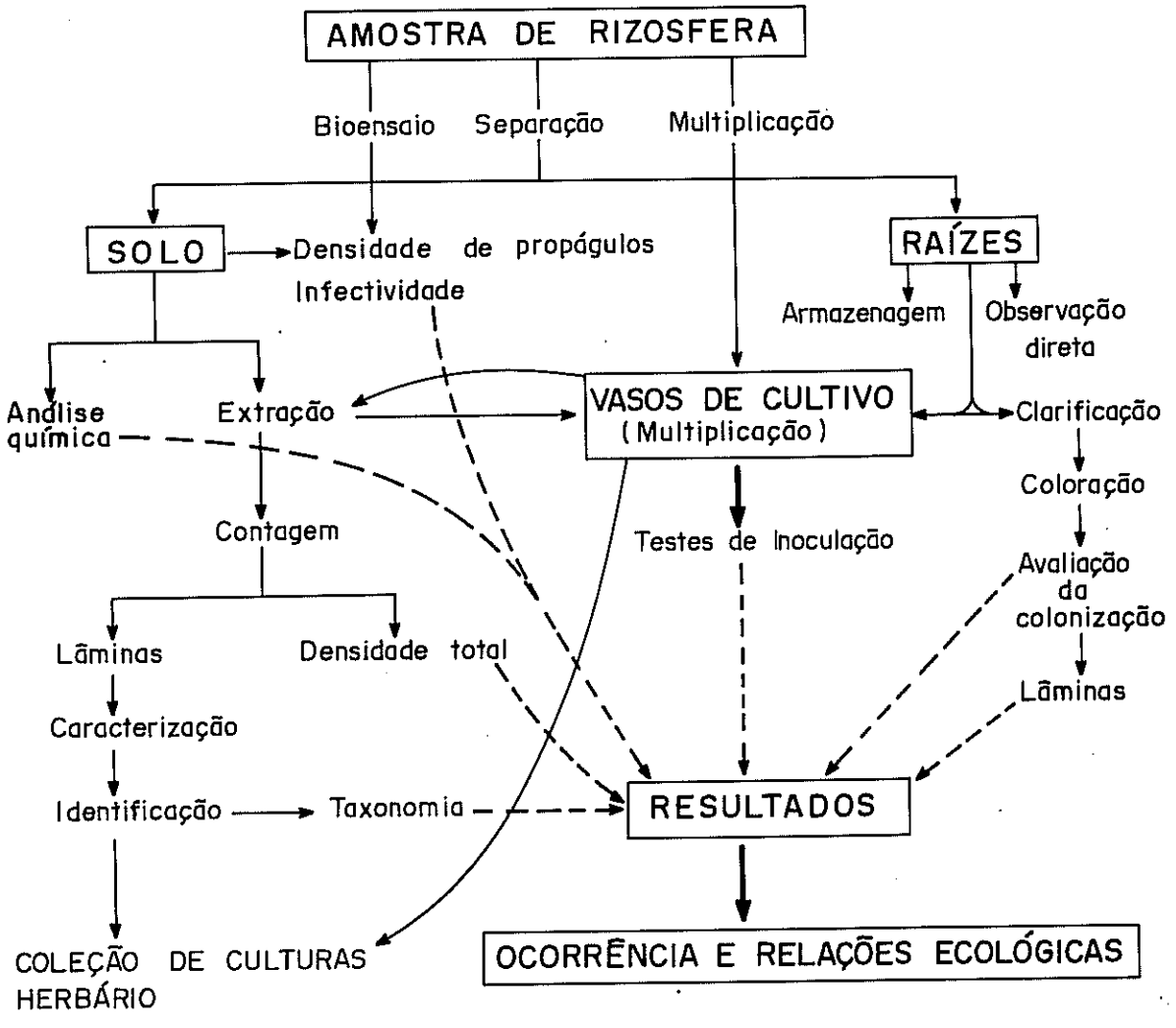


Figura 5.4. Seqüência operacional para avaliação da ocorrência e relações ecológicas das MAs.

Os fungos que formam as MAs pertencem à classe Zigomicetina, ordem *Glomales*, que têm apenas as famílias *Glomaceae*, *Acaulosporaceae* e *Gigasporaceae*, cada uma com apenas dois gêneros, cujas principais características encontram-se na **Tabela 5.3**. A taxonomia destes fungos é baseada essencialmente em características fenotípicas dos esporos, que são assexuados e apresentam elevada diversidade de cor, tamanho, forma (**Figuras 5.2** e **5.3**) e características da parede (espessura, arranjamento e número), dentre outras (Morton & Benny, 1990). São conhecidas atualmente cerca de 140 espécies descritas, as quais ocorrem nos diversos ecossistemas terrestres, sendo o gênero *Glomus* o que apresenta maior número de espécies (em torno de 70) seguido por *Acaulospora* e *Scutellospora*.

As espécies vegetais diferem quanto à suscetibilidade à micorrização, existindo espécies que não formam micorrizas de tipo algum. Considerando as informações disponíveis para as plantas tropicais, Trappe (1987) relata que 13,4% das espécies são não-micorrízicas, 70,9% formam MAs e 15,7% formam outros tipos de simbiose radicular com os fungos. Grandes diferenças intra-específicas e em nível de ecotipo, clone e cultivar quanto à micorrização podem ocorrer, principalmente em espécies cultivadas submetidas a intenso programa de melhoramento genético, que pode, ao longo do tempo, selecionar indivíduos pouco suscetíveis ou até mesmo resistentes à micorrização (Hetrick et al. 1992; Johnson & Pfleger, 1992).

Tabela 5.3. Famílias, gêneros e principais características dos fungos MAs (Morton & Benny, 1990; Morton, 1988).

Família	Gênero	Tipo de esporo	Diâmetro médio(μ)	Nº de paredes	Hifa de sustentação	Células auxiliares	Esporo-carpo	Vesículas
Acaulosporaceae	*Acaulospora*	Azigosporo	100-300	2-5	sessil	não	não/sim	sim
Acaulosporaceae	*Entrophospora*	Azigosporo	< 100	2-5	sessil	não	não	sim
Gigasporaceae	*Scutellospora*	Azigosporo	> 300	3-6	bulboso	sim	não	não
Gigasporaceae	*Gigaspora*	Azigosporo	> 200	1-2	bulboso	sim	não	não
Glomaceae	*Glomus*	Chlamidosporo	< 200	1-3	forma funil	não	sim/não	sim
Glomaceae	*Sclerocystis*	Chlamidosporo	< 100	1	forma funil	não	sim	sim

A ocorrência das MAs é então determinada pela vegetação e pelo ambiente do ecossistema (Johnson et al., 1992b). Trufem & Bononi (1985) propuseram a existência de quatro padrões de ocorrência de fungos MAs em ecossistema não-alterado do Estado de São Paulo, que são:

a) Espécies que ocorrem na maioria dos hospedeiros durante todo o ano;
b) Espécies que ocorrem em grande densidade no solo, mas são restritas a certos hospedeiros e épocas do ano;
c) Espécies com baixa densidade, mas sem restrição de hospedeiros ou época do ano; e
d) Espécies com baixa densidade em poucos hospedeiros e em épocas restritas.

Os esporos acham-se presentes em quase todos os solos, sendo extremamente reduzidos ou inexistentes naqueles fumigados, severamente perturbados pela erosão, mineração, construção civil e longos períodos de pousio ou inundação (Abbott & Robson, 1991; Brundrett, 1991). A dispersão dos propágulos ocorre por disseminação ativa, através do crescimento do micélio e raízes colonizadas, e por dispersão passiva, pelo vento, micofagia, oligoquetas, pássaros, insetos, água, transporte de solo e de mudas de plantas. A diversidade fúngica varia muito em virtude do ecossistema (**Tabela 5.4**), sendo encontradas de duas a 33 espécies por ecossistema (Brundrett, 1991).

Tabela 5.4. Ocorrência e diversidade relativas de fungos MAs em diferentes ecossistemas/ agrossistemas.

Ecossistema /Agrossistema (Exemplo)	**Fungos MAs**	
	Ocorrência	**Diversidade**
Não-alterado (cerrado, mata)	Baixa	Alta
Agro-baixo insumo (rotação de cultura)	Alta	Média/Baixa
Agro-manejo intensivo (hortaliças, irrigação)	Baixa	Muito baixa
Altamente alterado (área de mineração)	Muito baixa	Baixa

5.3.2. Fatores que afetam a ocorrência

As MAs são reguladas pelas características da planta, do fungo e pelos fatores ambientais (solo e clima). O conhecimento das relações ecológicas no sistema micorrízico é essencial para programar o uso efetivo desta simbiose na agricultura comercial e para conhecer e avaliar a atividade destes fungos e sua simbiose como um componente funcional dos ecossistemas. Grande volume de informações acha-se disponível sobre os efeitos dos diversos fatores que afetam a formação, função e ocorrência das MAs, conforme listados na **Tabela 5.5.** As condições ou fatores que geralmente reduzem a ocorrência das MAs encontram-se na **Tabela 5.6**.

Tabela 5.5. Principais fatores que afetam a formação e ocorrência das MAs, conforme o componente.

Componente	Principais fatores
Solo	Disponibilidade de nutrientes, pH, elementos tóxicos, salinidade, textura, estrutura e agregação, densidade, umidade, organismos.
Planta	Espécies, variedade, cobertura vegetal, nutrição, idade, ciclo e taxa de crescimento, alelopatia, sistema radicular, exsudação, senescência.
Ambiente	Intensidade luminosa, temperatura, estação do ano, precipitação, poluição atmosférica e do solo.
Manejo	Histórico da área, tipo de cultivo, erosão, irrigação, fertilizantes e corretivos, controle de ervas daninhas, pastejo e uso de biocidas.

Tabela 5.6. Condições e fatores que reduzem a ocorrência das MAs (Johnson & Pfleger, 1992; Thompson, 1994; Abbott & Robson, 1991).

Condição	Mecanismo ou processo
Eliminação da vegetação	Desmatamento, fogo, pastejo intensivo, poluição atmosférica.
Perda da camada arável do solo	Erosão, decaptação do solo, compactação.
Cultivo intensivo	Quebra da macroestrutura contendo micélio.
Sistema de produção	Monocultura prolongada, cultivo de espécie não-hospedeira, pousio prolongado.
Melhoramento vegetal	Seleção inadvertida para genótipos não-micorrízicos.
Uso de fertilizantes	Quantidades elevadas ou desbalanceadas.
Uso de pesticidas	Produtos sistêmicos e fumigantes.
Inundação e empilhamento do solo	Reduz a viabilidade dos propágulos e a colonização.

A relação entre a colonização micorrízica e densidade de esporos com as propriedades físicas e químicas do solo variam consideravelmente. Em geral, a incidência das MAs é maior quando as condições de crescimento estão abaixo do ótimo para a espécie hospedeira. Colonização e esporulação são máximas em solos de baixa fertilidade, sendo a disponibilidade de N e P os fatores que comumente exercem maior influência (**Figura 5.5a**). Os níveis de P no solo interferem na colonização e na esporulação dos fungos MAs (**Figura 5.5b** e **5.5c**), sendo os efeitos deste nutriente na colonização diferentes entre espécies, pois atuam via nutrição da planta e, por isto, a quantidade de nutriente requerida para inibir a colonização depende da capacidade de absorção e translocação da espécie vegetal. O cultivo dos solos pobres do cerrado, com conseqüente aplicação de calcário e fertilizantes, favorece a micorrização das culturas (Siqueira et al., 1989). A presença de metais, como o Zn, Cu e Mn, em concentrações elevadas, inibe a germinação dos esporos e pode reduzir a colonização micorrízica. Os fatores físicos, como inundação, compactação e alta umidade (má aeração), reduzem a micorrização e a ocorrência das MAs. As condições biológicas do solo são também de grande importância. Existem vários predadores de hifas, como os colêmbolos, hiperparasitas e antagonistas, que reduzem a viabilidade dos esporos no solo. Mas, existem também organismos sinergistas com os fungos MAs, como o caso de bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas que facilitam a penetração das raízes pelo fungo, sendo conhecidas como "helpers". Outros microrganismos, como rizóbio, solubilizadores de fosfato e diazotróficos de vida livre, geralmente têm relações sinergistas com as MAs (Linderman, 1992).

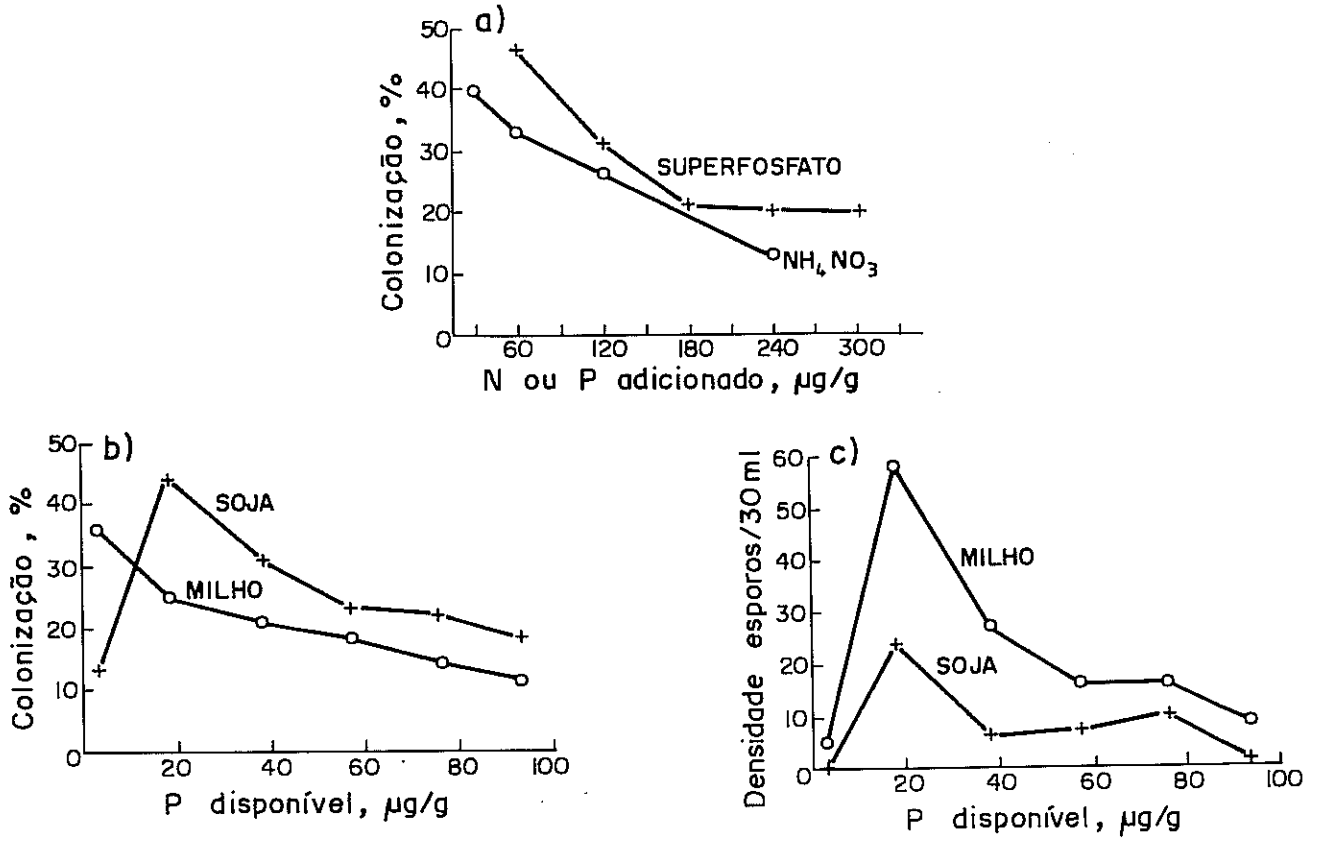


Figura 5.5. Efeitos da adição de N e P na colonização micorrízica da soja (**a**) e do P disponível no solo, na colonização (**b**) e esporulação (**c**) do milho e soja, inoculados com *G. macrocarpum* (Paula & Siqueira, 1987a; Fernandes et al., 1987).

A camada arável do solo é o principal reservatório de propágulos de fungos MAs (Bellgard, 1993) e qualquer fator que exerça impacto sobre esta exercerá grande influência na ecologia das MAs (Habte et al., 1988). Estes incluem o cultivo intensivo, erosão, contaminação, decaptação do solo, fogo intenso, pousio, desmatamento e compactação. Os aspectos de manejo do solo serão comentados mais adiante.

Dentre as características da planta que afetam as MAs, destacam-se as variações inter e intra-específicas, o estado nutricional, ciclo e taxa de crescimento e a produção de substâncias alelopáticas. Mesmo dentro de famílias tipicamente micorrízicas, existem espécies que resistem à colonização, como o caso das leguminosas que são altamente micotróficas, mas o gênero *Lupinus* e outros não formam MAs. Os efeitos dos aleloquímicos sobre as micorrizas ainda não são bem conhecidos (ver Siqueira et al., 1991a), mas existem evidências da atividade destes químicos naturais sobre as MAs. Os aleloquímicos podem atuar como inibidores ou estimulantes da micorrização e interferem na ocorrência dos fungos MAs. Compostos aromáticos comumente encontrados no solo, como os ácidos fenólicos, quercetina e escopoletina, quando aplicados em concentrações de 0,2 mM, estimulam a colonização micorrízica do trevo (Fries, s.d.). Em solos com monocultura de aspargos, em Michigan, Estados Unidos, a quantidade de fenólicos em extratos aquosos aumentou em 70%, em relação ao solo adjacente sem aspargos, atingindo 63μg de fenólicos . g^{-1} de solo (Pedersen et al., citados em Siqueira et al. 1991a). Os principais ácidos fenólicos encontrados neste sistema inibem o crescimento micelial e a colonização micorrízica.

Os efeitos dos pesticidas dependem basicamente do modo de ação do produto e da taxa e freqüência de aplicação. Os herbicidas geralmente não têm efeitos inibitórios e alguns podem até mesmo estimular a colonização. Os nematicidas e inseticidas geralmente também não exercem efeitos adversos quando aplicados nas dosagens recomendadas. Já os fungicidas têm efeito muito variado devido ao modo de ação. Os benzimidazoles são os mais prejudiciais, enquanto o Fosetyl-Al e metalaxyl estimulam a micorrização. Os fumigantes de solo têm efeitos devastadores, pois eliminam os propágulos e a colonização. Os efeitos da aplicação dos pesticidas sobre as MAs são muitas vezes difíceis de serem avaliados, pois atuam diretamente sobre os fungos MAs, ou indiretamente sobre a planta hospedeira e sobre aspectos químicos do solo ou sua biota. Mesmo os produtos que não atuam adversamente sobre as MAs podem causar alterações quantitativas e qualitativas sobre esta simbiose, pois quando usados continuamente podem provocar alterações na vegetação e no equilíbrio biológico do solo.

Em estudo sobre a ocorrência das MAs em Minas Gerais, verificou-se em amostras de 165 locais que a colonização variou de 0 a 91%, e a densidade total de esporos de 0 a 277 esporos.50 cc^{-1} de solo (Siqueira et al., 1989). Nos ecossistemas não-alterados, a colonização média foi de 13%, enquanto nos agrossistemas esta foi de 38%. Valores médios de colonização e densidade de esporos no solo para ecossistemas selecionados (**Tabela 5.7**) revelam enorme variação quantitativa entre os ecossistemas, refletindo suas condições químicas e biológicas. Neste mesmo estudo, verificaram-se também variações qualitativas na distribuição das espécies fúngicas. Foram encontradas 33 espécies identificadas, além de várias outras não descritas, sendo a diversidade média de espécies por ecossistema igual a 19 e 12 para ecossistemas naturais e agrossistemas, respectivamente. Comparando-se os ecossistemas quanto à ocorrência de espécies com índice de ocorrência maior ou igual do que 4%, verifica-se maior ocorrência de certas espécies de *Glomus* e *Acaulospora* nos agrossistemas, e de *Scutellospora*, *Entrophosphora* e *Gigaspora* nos ecossistemas não-alterados. Outro aspecto interessante verificado neste estudo foi a alteração na composição das espécies dominantes, consideradas aquelas com índice de ocorrência superior a 50% da ocorrência máxima. Nas amostras de cerrado

natural havia oito espécies predominantes contra apenas três, em média, nos agrossistemas estudados. O cultivo destes solos aumenta a população de fungos MAs, mas reduz a diversidade de espécies, tornando o sistema biológico mais vulnerável a alterações. As modificações na composição de espécies refletem alterações nas características químicas do solo, resultantes das práticas de cultivo como aração, gradagem, calagem e adubação. No entanto, tem sido difícil correlacionar a ocorrência das espécies com características químicas do solo (Siqueira et al., 1989; Fernandes & Siqueira, 1989; Schenck et al, 1989) mas, pelo menos para algumas espécies e variáveis, certas tendências são bastante claras (**Tabela 5.8**). Por exemplo, *A. morrowae*, *A. spinosa* e *E. colombiana* têm incidência reduzida em solos com pH mais elevado, ao contrário do que se verifica para o *G. etunicatum*. Outras tendências são verificadas para os níveis de Al^{+3} e P no solo.

Tabela 5.7. Valores médios para colonização micorrizica e densidade de esporos no solo em ecossistemas do Estado de Minas Gerais (Siqueira et al., 1989).

Ecossistema	**Raízes colonizadas** (%)	**Densidade de esporos** (N^{o} . 50 cc^{-1})
Arroz	33	67
Milho	36	84
Soja	18	61
Algodão	17	99
Mandioca	20	90
Cana-de-açúcar	19	62
Citros	53	120
Eucaliptos (adultos)	2	37
Pastagem braquiária	33	52
Cafeeiro	35	20
Gramíneas nativas	36	23
Leguminosas forrageiras	62	98
Cerrado (natural)	14	46

As alterações no pH são fatores de grande importância para a ecologia e distribuição dos fungos MAs. Quando populações fúngicas originadas de solos com pHs diferentes foram multiplicadas em solo ácido, com e sem calcário, verificaram-se diferenças muito acentuadas na composição das espécies e que estas modificações dependem da composição inicial da população (**Figura 5.6**). *Glomus occultum/diaphanum* e *Gigaspora margarita* dominavam (em proporção de esporos) no solo ácido e

foram substituídas de modo diferenciado por *Glomus etunicatum*, quando o solo recebeu calagem. O mesmo não ocorreu no solo muito ácido, cuja população era dominada por *Acaulospora scrobiculata*. Baseando-se nestes resultados e nos obtidos por Sierverding (1991), algumas generalizações podem ser feitas com relação à interação pH-fungos MAs nos solos tropicais, havendo espécies com preferência ou tolerância a certas condições.

a) Predominam em condições de elevada acidez - *Glomus diaphanum*, *Glomus occultum*, *Entrophospora colombiana*, *Scutellospora* sp., *Gigaspora margarita*, *Acaulospora laevis*.
b) Preferem solos pouco ácidos ou neutros - *Glomus mosseae*, *Glomus clarum*, *Sclerocystis* sp., *Glomus fasciculatum*, *Glomus etunicatum*.
c) São indiferentes à acidez do solo - *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora morrowae*, *Glomus agregatum*.

Tabela 5.8. Incidência relativa das principais espécies fúngicas encontradas em Minas Gerais, em relação a classes de pH, Al e P no solo. Adaptado de Siqueira et al. (1989).

Fator edáfico (classe)	**Espécies fúngicas***								
	Asc	Amo	Asp	Ame	Ssp	Spel	Get	Gdi	Ecol
pH	**% de incidência dentro da classe**								
< 50	33	43	14	6	29	10	0	10	12
5-6	39	36	18	5	17	12	13	14	0
> 6,5	29	14	14	8	14	14	29	12	0
Al^{+3}									
< 0,5	38	32	13	4	17	6	12	12	9
0,5 - 1,0	22	30	17	12	17	19	9	12	14
> 1,0	24	29	19	14	9	5	0	10	18
P (Mehlich)									
< 6,0	20	31	17	12	21	13	8	12	18
6 - 12	50	45	15	0	10	10	5	15	10
> 12	47	27	13	2	14	9	18	5	4

* Asc = *A.scrobiculata*; Amo = *A. morrowae*; Asp = *A.spinosa*; Ame = *A.mellea*; Ssp = *Scutellospora sp*; Spel = *S. pellucida*; Get = *Glomus etunicatum*; Gdi = *G.diaphanum*; e Ecol = *Entrophospora colombiana*.

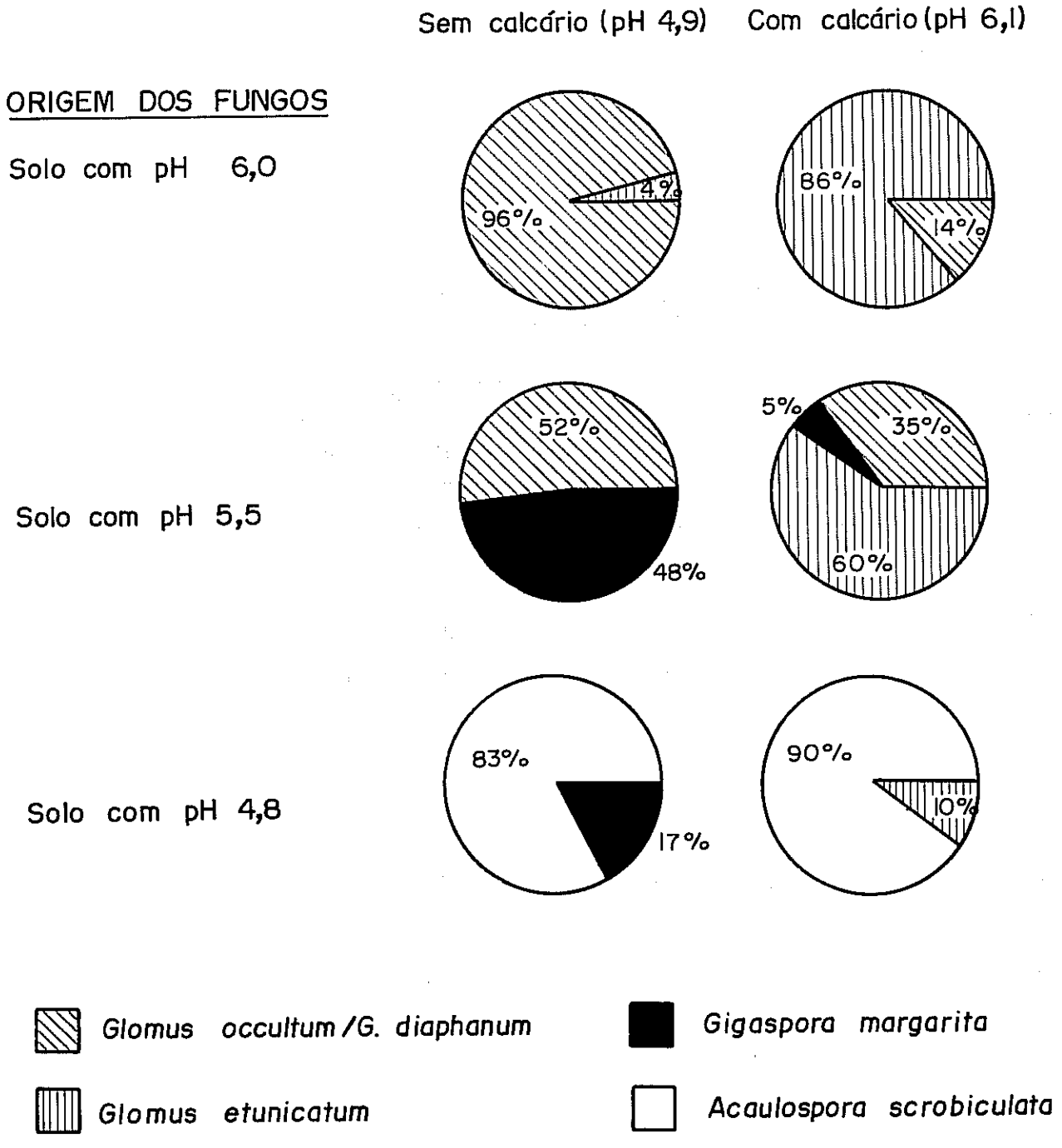


Figura 5.6. Efeito da calagem de solo ácido na esporulação de fungos MAs de diferentes origens (Siqueira et al., 1990).

Embora os fungos MAs sejam considerados generalistas, existem diferenças causadas pelo tipo ou seqüência de cultura na composição de espécies. Estudos recentes em solos cultivados do meio oeste americano (Johnson et al., 1992a) revelam resultados surpreendentes, relacionando alterações na população de fungos MAs com o efeito da rotação na produtividade das culturas. A monocultura prolongada com milho favorece a população de *Glomus occultum*, que se correlaciona negativamente com a produtividade desta cultura, porém correlaciona-se positivamente com a produtividade da soja em rotação. A monocultura da soja favorece *Glomus microcarpum*, que se correlaciona negativamente com a nutrição e produtividade da soja, mas mostra-se benéfica para o milho. Estes estudos indicam que a monocultura prolongada seleciona fungos de rápido crescimento e esporulação, sendo portanto uma seleção para sobrevivência e não para efetividade ou eficiência. Isto pode resultar na seleção de espécies inefetivas ou parasíticas para a cultura, contribuindo para o chamado "declínio da monocultura". Praticando-se a rotação de culturas, pode-se reverter este processo, favorecendo as espécies efetivas que contribuirão para a nutrição e produção da cultura em rotação. Este é, portanto, um modelo desenvolvido com base nos resultados obtidos na rotação milho-soja nos Estados Unidos, sendo sua validade para outras condições ainda sujeita a evidências experimentais. Contudo, verifica-se que na monocultura do cafeeiro no Brasil, predominam na rizosfera espécies de *Acaulospora*, principalmente *A. scrobiculata* que é pouco efetiva para esta cultura. A comunidade fúngica é controlada pelo solo e pela cultura (Johnson et al., 1991; 1992b). Na mesma cultura, o número total de espécies, densidade de esporos e espécies fúngicas varia muito entre locais (**Tabela 5.9**), indicando a grande influência do ambiente sobre a ecologia das MAs. Comparando-se as espécies predominantes em cafeeiros no sudeste brasileiro (Fernandes & Siqueira, 1989; Oliveira et al., 1990; Lopes et al., 1983), tem-se, em ordem decrescente de ocorrência:

- *A. scrobiculata*, *A. morrowae*, *A. mellea*, *A. apendicula*, *Glomus etunicatum* (Sul de Minas).
- *A. scrobiculata*, *A. morrowae*, *Entrophospora colombiana*, *A. spinosa*, *Glomus etunicatum* (Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro).
- *Glomus fasciculatum*, *A. scrobiculata*, *A. laevis*, *Scutellospora pellucida* e *Gigaspora gigantea* (São Paulo).

Além da monocultura, o pousio prolongado, o cultivo com espécies não-micorrízicas, a erosão do solo e o cultivo extensivo exercem enorme efeito negativo na ocorrência das MAs (Thompson, 1994; Brundrett, 1991). Diversos estudos mostram que a alteração dos solos agrícolas reduz o desenvolvimento das MAs em até 80% e isto tem conseqüências para a nutrição, produtividade e sustentabilidade das culturas, conforme resumido na **Figura 5.7**. A redução na colonização pode ter conseqüências drásticas a médio e longo prazo para a produção agrícola. Para compensar o efeito da alteração na queda de produtividade e diminuição dos efeitos benéficos das MAs, maiores quantidades de fertilizantes são geralmente aplicadas. Isto contribuirá para reduzir ainda mais a colonização das raízes. Desse modo, a redução da intensificação do cultivo, como a adoção do cultivo mínimo, contribuirá para a conservação da atividade das MAs no agrossistema. De fato, as MAs contribuem mais para a absorção de P pelo milho em solo com cultivo mínimo que em solo sob cultivo convencional (Kunishi et al., 1989).

É difícil fazer generalização ou predições sobre a ocorrência e diversidade dos fungos MAs, mas sua ocorrência é geralmente alta em sistemas cultivados com baixo input e muito baixa, e até mesmo inexistente, em condições muito alteradas como em solos degradados pela mineração, construção civil ou pela erosão. A diversidade, por outro lado, é alta nos ecossistemas em clímax, como no cerrado brasileiro, e baixo nos agrossistemas, principalmente na monocultura. As condições domi-

nantes nos ecossistemas manejados intensivamente e sem rotação de culturas reduzem a ocorrência e importância das MAs. Não obstante, as tendências de modificações para sistemas mais equilibrados biologicamente, como redução no uso de agroquímicos, cultivo mínimo e rotação de culturas, podem contribuir para aumentar a ocorrência e função das MAs nos sistemas agrícolas.

Tabela 5.9. Ocorrência de fungos MAs em lavouras de milho em diferentes locais (Siqueira et al., 1989; Maia & Trufem, 1990; Trufem & Bononi, 1985; Rich & Schenck, 1981).

Localização	**Nº de espécies**	**Colonização*** (%)	**Esporos*** ($Nº . g^{-1}$)	**Espécies predominantes**
Minas Gerais	10	17-67 (36)	0,3 - 4,3 (1,6)	*Glomus etunicatum*, *Acaulospora morrowae*, *Acaulospora scrobiculata*, *Entrephospora colombiana*, *Acaulospora spinosa*, *Scutellospora gilmorei*, *Acaulospora mellea*, *Gigaspora margarita*.
Pernambuco	16	6-34 (21)	0,2 - 2,6 (1,4)	*Acaulospora laevis*, *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora appendicula*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus occultum*, *Gigaspora heterogama*, *Sclerocystis sinousum*.
São Paulo	9	-	0,2 - 2,4 (1,0)	*Gigaspora heterogama*, *Scutellospora nigra*, *Scutellospora pellucida*, *Glomus macrocarpum*, *Glomus caledonicum*, *Scutellospora gilmorei*, *Glomus macrocarpum*.
Flórida	14	-	< 0,60	*Gigaspora margarita*, *Glomus macrocarpum*, *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Gigaspora heterogama*, *Glomus mossae*, *Glomus fasciculatum*.

* Amplitude e valor médio de todas as observações.

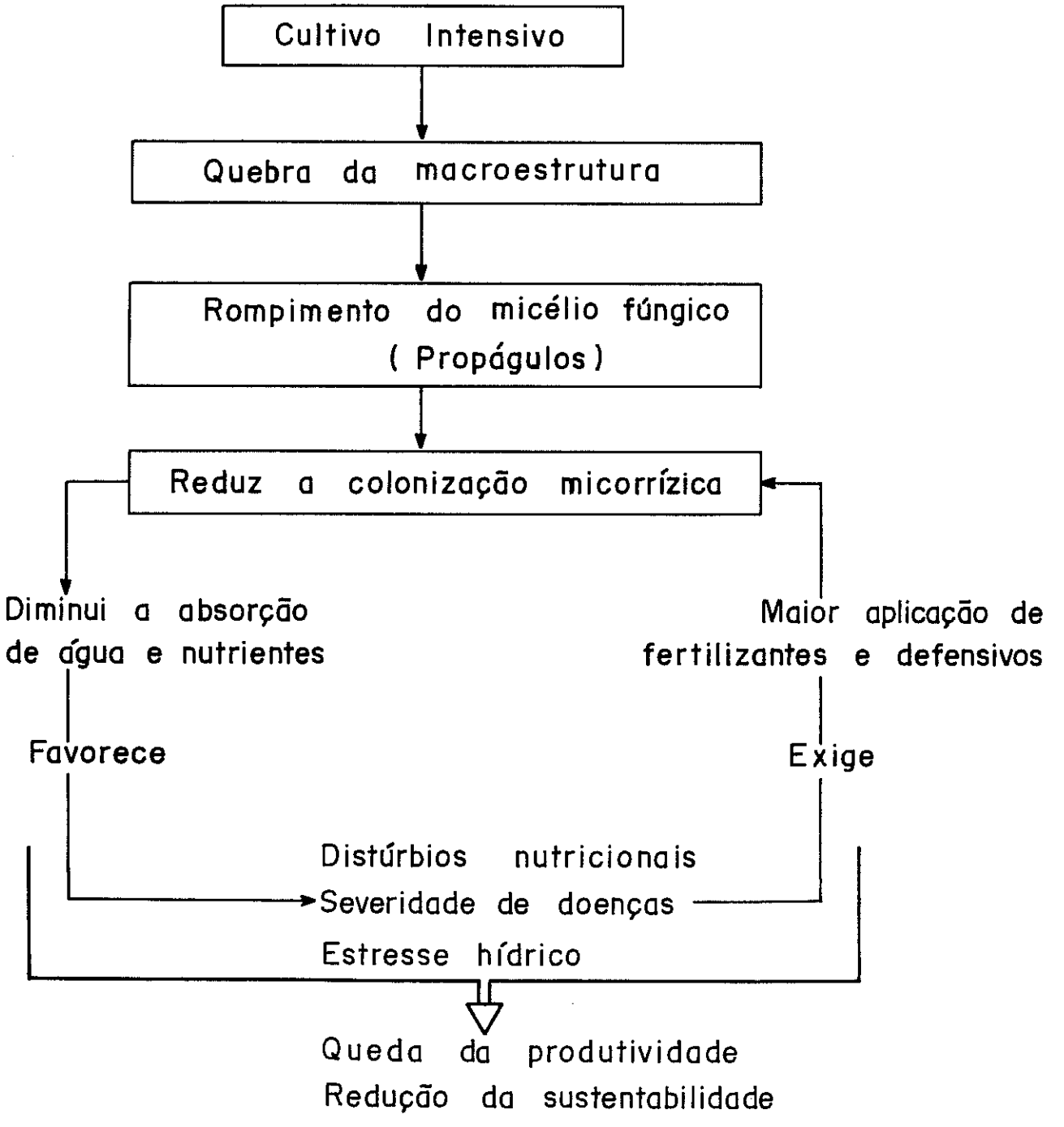


Figura 5.7. Conseqüências do cultivo (alteração) do solo na micorrização e produção agrícola.

5.4. Efeitos no Crescimento do Hospedeiro

Os efeitos das MAs no crescimento das plantas foram inicialmente detectados por Asai (1943), que relatou crescimento reduzido de certas espécies quando cresciam em solo esterilizado. Dez anos depois, Mosse (1953) demonstrou a formação das MAs e, em 1957, verificou que mudas de macieira inoculadas com esporocarpos de *Endogone* (hoje *Glomus*) cresceram mais e continham teores mais elevados de nutrientes. Na década de 60, vários outros estudos mostraram resultados semelhantes com milho e outras espécies (Gerdemann, 1968). No entanto, os efeitos estimulantes do crescimento

das plantas só ficaram mais evidentes, e mereceram mais atenção, após os problemas de crescimento reduzido de mudas de espécies frutíferas, cultivadas em viveiros com solo fumigado, terem sido atribuídos à eliminação dos propágulos de fungos MAs (Kleinschmidt & Gerdemann, 1972) e não à toxicidade residual do fumigante. Nesta mesma época, Ross (1971), demonstrou que, em solo infestado com propágulos de fungos MAs, a produção da soja era 122%, 67% e 12% maior do que em solo isento destes propágulos, em níveis de P baixo, médio e alto, respectivamente.

Estes estudos despertaram interesses por todo o mundo e a micorrizalogia tornou-se o assunto prioritário de pesquisa em diversas especialidades das ciências vegetais e do solo. Os efeitos das MAs no crescimento das plantas variam muito. Aumentos de produção de culturas anuais, devidos à inoculação, variam de 5% a 290%, enquanto que os benefícios para o crescimento ou produção de mudas pré-colonizadas e transplantadas variam de 50% a 8000% (Siqueira & Franco, 1988). Algumas espécies nem mesmo crescem na ausência de fungos MAs (**Figura 5.8**). Os efeitos benéficos são muito complexos e, em muitos casos, bastante inconsistentes, pois dependem de muitos fatores (**Tabela 5.10**) que atuam direta ou indiretamente sobre o sistema micorrízico e seus componentes. A capacidade do fungo de estimular o crescimento da planta é conhecida como "efetividade simbiótica", a qual é determinada pelas características dos componentes da simbiose, principalmente do fungo, que pode apresentar diferentes graus de efetividade, sendo até mesmo ineficaz ou parasítico. De modo similar, a planta hospedeira, pelas suas características, varia quanto ao grau de benefício da associação, conhecido como "dependência micorrízica", que é definida como o grau pelo qual ela depende das MAs para o crescimento normal em uma dada condição de crescimento. Quanto a esta característica, as plantas são classificadas em:

a) Altamente ou obrigatoriamente dependentes - por exemplo, mandioca, citros, algodão, leguminosas tropicais, cebola, cafeeiro, pimenta-do-reino, trema (**Figura 5.8**).
b) Dependentes - por exemplo, soja, milho, feijoeiro, braquiária, sorgo, tomateiro, trigo, seringueira, cacau.
c) Não-dependentes - plantas não-micorrízicas, como as crucíferas, beterraba, coníferas.

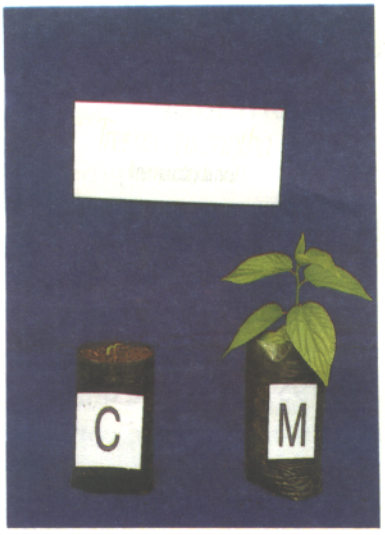


Figura 5.8. Efeito da micorrização no crescimento da trema (*Trema micrantha*); onde: C = não inoculada e M = inoculada com fungos MAs.

Tabela 5.10. Fatores determinantes de efetividade/eficiência simbiótica nas MAs.

Componente	Característica	Fatores principais
Planta	Sistema radicular	Tipo, ramificação, pêlo radicular, área de superfície, longevidade e taxa de crescimento.
	Requerimento nutricional	Taxa de absorção, concentração no tecido, demanda, distribuição, eficiência de uso, consumo de luxo e realocação.
	Outras	Tolerância a estresse, suscetibilidade a doenças, taxa fotossintética e de crescimento e ciclo vegetativo.
Fungo	Infectividade	Taxa de germinação e de colonização, colonização secundária, formação e duração dos arbúsculos.
	Hifa externa	Taxa de crescimento, capacidade de absorção e translocação, atividade metabólica e longevidade.
	Esporulação	Ontogenia, dormência, quiescência, crescimento micelial e intensidade de esporulação.
Relação fungo-planta	Interface	Dreno de fotossintatos (custo energético).
	Taxa metabólica	Transferência do P absorvido.
	Troca de metabolitos	Alterações fisiológicas.
	Regulação funcional	Integração funcional.

Os efeitos da inoculação em algumas espécies cultivadas, em condições de baixo e alto P no solo, encontram-se na **Tabela 5.11**. Verifica-se que as espécies respondem de modo diferenciado ao P e à micorrização. A espécie de fungo também influencia a resposta da planta (**Figura 5.9**). Neste exemplo, os fungos *A. scrobiculata* e *G. margarita* mostraram-se pouco efetivos para o algodoeiro, ao contrário dos demais estudados.

A magnitude dos benefícios da micorrização depende dos fluxos de nutrientes do fungo para a planta e de fotossintatos da planta para o fungo (estimados em 10% a 15% da fotossíntese total), sendo estes determinados pelas suas características (**Tabela 5.10**) e pelas condições de crescimento do meio (do solo, na maioria dos casos). Plantas micorrizadas geralmente apresentam teores mais elevados de certos nutrientes, principalmente daqueles com mobilidade reduzida no solo, como é o caso do P e Zn. Isto, associado ao fato de que os benefícios das MAs diminuem com a aplicação de nutrientes, evidencia que o principal mecanismo de estímulo no crescimento da planta é via nutrição, não sendo, contudo, o único. Desse modo, os benefícios das MAs para o crescimento da planta envolvem mecanismos nutricionais e não nutricionais, resumidos na **Tabela 5.12** e comentados a seguir.

Tabela 5.11. Efeitos das MAs no crescimento (matéria seca, g . planta^{-1}) de algumas espécies de plantas não-inoculadas (Ni) e inoculadas (M), em condições de alto e baixo P no solo (Sieverding, 1991).

Espécie	Baixo P (< 20) μ . g^{-1} solo			Alto P (> 100) μg . g^{-1} solo		
	Ni	M	Efeito*	Ni	M	Efeito*
Mandioca	0,3	4,3	14,3	0,5	16,4	32,8
Caupi	1,0	2,6	2,6	13,7	36,3	2,6
Estilosantes	0,1	1,3	13,0	2,7	12,2	4,5
Andropogon	0,2	1,3	6,5	34,2	32,2	0,9
Feijoeiro	1,1	3,1	2,8	8,3	25,0	3,0
Milho	1,2	4,8	4,0	59,4	53,7	0,9
Arroz	3,8	3,8	1,0	30,6	31,6	1,0
Soja	3,3	4,4	1,3	8,7	19,3	2,2
Cafeeiro	0,5	0,5	1,0	1,0	2,5	2,5

* Relação Ni/M.

5.4.1. Efeitos nutricionais

As alterações nutricionais (**Tabela 5.13**) são os efeitos mais consistentes das MAs. Plantas micorrizadas geralmente acumulam maiores quantidades de macro e micronutrientes, como também de Br, I, Cl, Al, Si e metais pesados. Já os teores de N, K, Ca, Mg e Na geralmente são menores, enquanto os de SO_4^{-2}, PO_4^{-3}, NO_3^-, e Cl^- são geralmente maiores nas plantas com MAs (Marschner & Dell, 1994; Siqueira & Saggin-Júnior, 1994). A diminuição nos teores resulta de efeitos de diluição provocados pelo maior crescimento das plantas micorrizadas. Isto, no entanto, depende da disponibilidade relativa de cada nutriente na solução do solo.

Aumento nos teores de P constitui o mecanismo principal de resposta das plantas em solos de baixa fertilidade, como os dominantes nos trópicos (Mosse, 1981). De fato, a efetividade simbiótica de populações indígenas de fungos de solo de cerrado correlaciona-se positivamente com aumentos na porcentagem de P na parte aérea da soja (Paula et al., 1988). Os fungos mais efetivos foram capazes de duplicar os teores de P na soja. De um modo geral, o efeito da micorrização diminui com a elevação do P no solo (Saggin-Júnior et al., 1994). Quando a planta é bem suprida, ela não depende da absorção via hifa (micotrofia), e a presença do fungo na raiz seria um investimento energético supérfluo ou sem retorno. Assim, a planta controla a colonização de acordo com sua necessidade, através de um balanço delicado existente entre nível de P no solo, desenvolvimento e atividade do fungo na raiz e resposta da planta, variando o efeito de micotrófico em níveis subótimos de P a efeitos parasíticos em condições supraótimas de P no solo. Plantas bem supridas em P não se tornam imunes à colonização (**Figura 5.5b**) e, mesmo em baixa colonização, o fungo ainda é capaz de representar dreno significativo de fotossintato e promover inibição de crescimento (Peng et al., 1993).

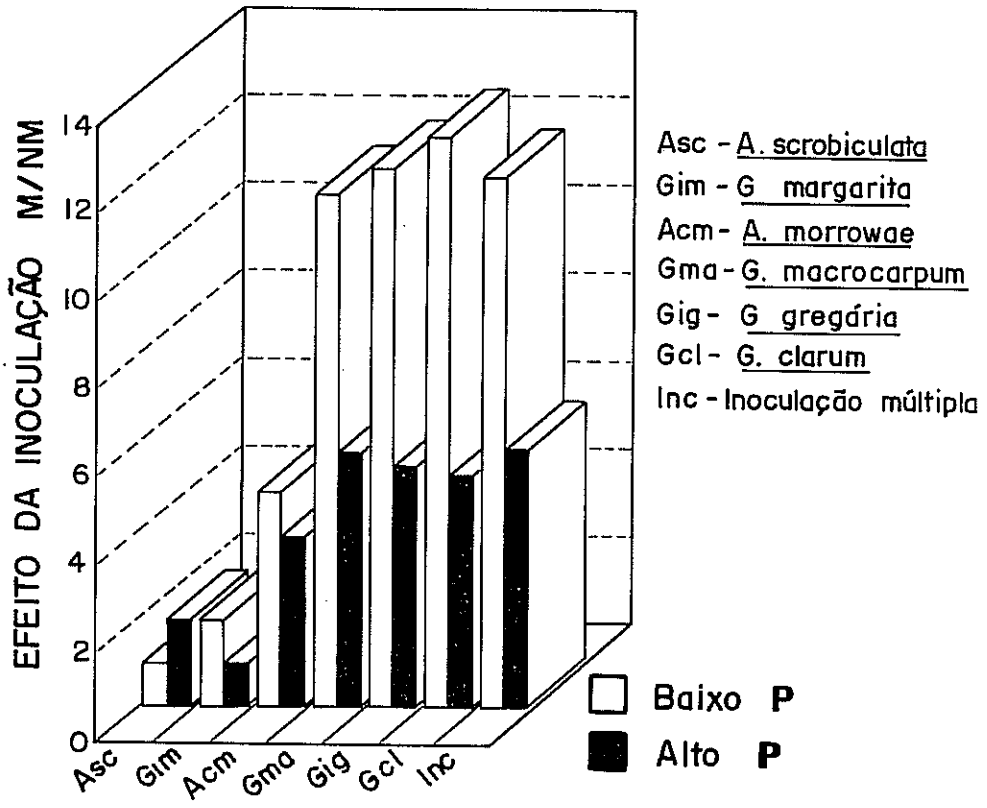


Figura 5.9. Efeito da inoculação, com diferentes fungos MAs, no crescimento do algodoeiro, em solo com diferentes níveis de P (Siqueira et al., 1986).

Tabela 5.12. Principais efeitos promotores do crescimento vegetal das MAs.

Efeitos nutricionais	**Efeitos não-nutricionais**
• Aumento na absorção de nutrientes.	• Favorecimento na relação água-planta.
• Utilização de algumas formas não disponíveis.	• Produção e acúmulo de substâncias de crescimento.
• Armazenamento temporário de nutrientes.	• Redução dos danos causados por patógenos.
• Favorecimento de microrganismos benéficos.	• Maior tolerância a estresses ambientais e fatores fitotóxicos.
• Aumento na nodulação e fixação de N_2.	
• Amenização dos efeitos adversos do pH, Al, Mn e outros na absorção de nutrientes.	• Melhoria da agregação do solo.

Tabela 5.13. Efeitos generalizados das MAs na nutrição da planta hospedeira.

Nutriente	Principal efeito e mecanismo
Nitrogênio	Concentração no tecido é reduzida e quantidade acumulada é aumentada. Altera absorção e fixação biológica.
Fósforo	Concentração e acúmulo nos tecidos são aumentados devido ao melhor aproveitamento de P do solo.
Manganês	Concentração geralmente reduzida devido menor absorção e efeitos de diluição.
Zinco e Cobre	Concentração e acúmulo aumentados devido maior absorção. Reduz efeito da deficiência induzida por alto P.
Cátions básicos e Enxofre	Efeitos na concentração dependem da disponibilidade e do balanço. Quantidade acumulada é geralmente aumentada. São efeitos secundários ou indiretos das MAs.

Os mecanismos pelos quais o P e outros nutrientes afetam a colonização ainda não são bem elucidados, existindo várias hipóteses (Siqueira, 1991; Koide, 1991), todas relacionadas aos efeitos do P na quantidade de exsudatos e no metabolismo de carboidratos da planta, sendo, portanto, efeitos indiretos, via nutrição da planta. Deve-se ressaltar que, em concentrações muito elevadas de P ou outros nutrientes, a germinação e crescimento micelial dos fungos MAs na rizosfera podem ser inibidos. Os níveis de P requeridos para inibir a colonização variam entre as espécies.

O favorecimento das MAs na absorção de nutrientes é muito complexo e resulta de mecanismos físicos, químicos, fisiológicos e microbiológicos, destacando-se:

a) Aumento na superfície de absorção e exploração do solo (efeito físico);
b) Aumento na capacidade de absorção da raiz (efeito fisiológico);
c) Modificações morfológicas e fisiológicas adicionais na planta, e espaciais e temporais nas raízes micorrizadas em relação às sem micorrizas;
d) Absorção de nutrientes disponíveis, não acessíveis às raízes não-micorrizadas diretamente pelas hifas ou, indiretamente, através de favorecimento no desenvolvimento de raízes;
e) Utilização de formas não disponíveis para as raízes não micorrizadas através da solubilização e mineralização, no caso das ectomicorrizas, e de modificações na dinâmica do equilíbrio do nutriente, entre a fase sólida e líquida do solo, no caso das MVA;
f) Armazenagem temporária de nutrientes na biomassa fúngica ou nas raízes, evitando sua imobilização química ou biológica e lixiviação;
g) Favorecimento de microrganismos mineralizadores e solubilizadores de nutrientes e diazotróficos na micorrizosfera;
h) Amenização dos efeitos adversos do pH, Al, Mn, metais pesados, salinidade, estresse hídrico e ataque de patógenos do sistema radicular, sobre a absorção de nutrientes.

Hifas e micélio externo crescem solo adentro e aumentam a exploração do solo, permitindo a absorção de nutrientes fora da zona de esgotamento. A exploração de microsítios ricos em nutrientes, inexplorados pelas raízes não-micorrizadas, resulta em grande eficiência no aproveitamento de P do solo e utilização pela planta (**Figura 5.10**). O fluxo de P via fungo é a base de funcionamento desta simbiose. O P é absorvido da solução do solo pelas hifas por um processo ativo, transformado em grânulos de polifosfato, os quais são transportados pela corrente citoplasmática até os arbúsculos, onde são hidrolisados pelas fosfatases, liberando Pi, que é transferido passivamente para o hospedeiro e translocado via xilema para as folhas onde atua de modo regulatório sobre a simbiose (ver Siqueira & Franco, 1988; Schwab et al., 1991). No sentido oposto ocorre o fluxo de fotossintatos que sustentam o crescimento e atividade metabólica do fungo na raiz e no solo.

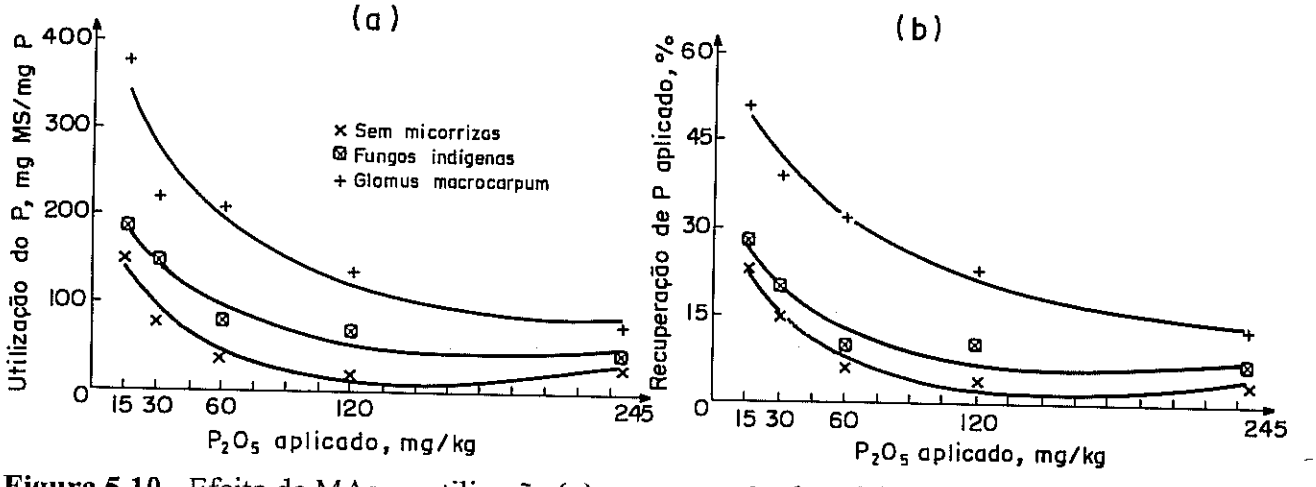


Figura 5.10. Efeito de MAs na utilização (**a**) e recuperação do P (**b**) aplicado em um latossolo pela cultura da soja (Siqueira & Paula, 1986).

Os estudos iniciais realizados com ^{32}P indicavam que plantas micorrizadas tinham acesso às mesmas formas de P no solo que aquelas sem MAs (Bolan, 1991) e, ainda, que as plantas com MAs eram capazes de explorar de modo mais eficiente o P do solo. No entanto, sabe-se hoje que as MAs são capazes de mobilizar P do solo através de modificações químicas na rizosfera, incluindo a mineralização do P orgânico (Jayachandran et al., 1992). De acordo com as revisões de Bolan (1991) e Siqueira (1991), a mobilização do P do solo resulta dos seguintes mecanismos:

a) Produção de ácidos orgânicos específicos eficazes na solubilização ou alteração da dinâmica das formas de P no solo;
b) Elevação dos teores de CO_2 na rizosfera pela maior atividade heterotrófica da micorriza comparada com raízes não-colonizadas;
c) Produção de quelantes e complexantes capazes de mobilizar principalmente P ligado a ferro; e
d) Maior população de microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fosfatos.

De fato, em estudo conduzido em laboratório da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), ficou evidenciado que a braquiária e o estilosantes são capazes de absorver P fixado ou retido no solo quando inoculados com fungos MAs (Alves, 1988). O fracionamento das formas de P no solo, após o cultivo das plantas, revelou menores quantidades de Al-PO_4 e Fe-PO_4 nos tratamentos com

MAs, indicando a capacidade das plantas micorrizadas de mobilizar o P retido. Isto, sem dúvida, se reveste de grande interesse para a produção agrícola nos trópicos, onde os solos apresentam elevada capacidade de retenção de fosfatos, como os latossolos brasileiros.

O influxo de nutrientes na planta é resultante da interação entre os fatores do solo e das raízes absorventes, em que as MAs participam ativamente. Quando plantas micorrizadas são tratadas com fungicidas que matam as hifas, o influxo de P na planta é reduzido drasticamente (Hale & Sanders, 1982), evidenciando a importância da absorção de P via micélio fúngico. Este efeito, no entanto, é reduzido em condições de elevado P na solução do solo. Conforme discutido em Siqueira & Franco (1988), o influxo pode ser descrito pela seguinte equação:

$$I = Imax \frac{C}{Km + C}$$

onde: Imax = influxo máximo; C = concentração na superfície da raiz; e Km = constante de Michaelis - Menten.

Verifica-se que I depende de C na superfície, a qual é controlada pela difusão do nutriente no solo até a superfície absorvente, e que a difusão é função do gradiente de concentração, ΔC, entre um ponto no solo e a superfície da raiz. ΔC é, então, expressa da seguinte maneira:

$$\Delta C = \frac{[\text{P-solo}] - [\text{P-raiz}]}{\Delta X}$$

sendo: [P-solo] = concentração P no solo; [P-raiz] = concentração de P na superfície da raiz; e ΔX = distância do P até a superfície de absorção.

Baseando-se nestes modelos simplistas, tem-se que o influxo (I) de P nas plantas cultivadas em solos de baixa fertilidade pode ser aumentado através:

a) Do aumento de P na solução do solo, que eleva [P-solo] e aumenta ΔC e C - o que é possível pela adição de fertilizantes;
b) Da diminuição do Δx, que aumenta ΔC e, conseqüentemente, a difusão e o influxo - que pode ser conseguido através da seleção de genótipos e manejo do solo para maior produção de raízes, e através das MAs, que aumentam a eficiência de absorção em termos espaciais e temporais;
c) De alterações fisiológicas na absorção como redução do km. As MAs podem atuar neste mecanismo.

A importância das MAs é, portanto, maior na absorção de nutrientes que apresentam difusão reduzida no solo. De fato, elas podem ser responsáveis pela absorção de até 80% do P, 60% do Cu, 25% do N, 25% do Zn e 10% do K da planta (Marschner & Dell, 1994). Apesar das alterações fisiológicas, a absorção é feita principalmente pelo micélio externo, que aumenta a área de absorção.

O'Keefe & Sylvia (1991), usando modelos de absorção e considerando diâmetro médio de 8 μm e 250 μm para hifa e raízes, respectivamente, estimaram que o aumento de área de superfície devido as MAs pode atingir 1800%, e que o influxo de P pode ser aumentado em 477% para um aumento de apenas 3% na área de superfície. Estes valores, embora estimados, indicam a magnitude dos efeitos nutricionais das MAs.

A quantidade de hifa ou micélio extra-radicular correlaciona-se com efetividade simbiótica e varia enormemente, em conseqüência do fungo, da planta e do ambiente, alcançando valores de até 32cm de hifa . cm^{-1} de raiz colonizada ou 26m de hifa . g^{-1} de solo. O'Keefe & Sylvia (1991) salientam também que, além da elevada capacidade de absorção das hifas, elas apresentam taxa de extensão 823 vezes maior que a das raízes. No entanto, as hifas extra-radiculares são inibidas por alto P e Cu, consumidas pelos colêmbolos e inativadas por biocidas, como o benomyl (Ver Allen, 1992, capítulos 4, 7 e 10).

A presença de MAs exerce enorme influência no requerimento externo de P das culturas (Yost & Fox, 1979). Em estudo em Latossolo Roxo da região de Lavras, o requerimento externo de P foi reduzido em 34% e 56% para o milho e soja, respectivamente, pela presença do fungo *Glomus macrocarpum* (Fernandes et al., 1987). A avaliação do requerimento externo de P para algumas espécies pode ser superestimada em até 100 vezes, se realizada na ausência de MAs (Howeler et al., 1987), como se verifica com a mandioca, estilosantes e citros. Os aspectos biológicos, relacionados ao déficit de P na planta e resposta à micorrização são bem discutidos em Koide (1991). A resposta da planta depende da sua eficiência de utilização do P absorvido, sendo controlada pelas características morfológicas, fisiológicas e fenológicas que determinam sua demanda, pela capacidade de absorção e pelo déficit de P (**Figura 5.11**), cujos valores delimitam o grau de micotrofismo da planta. Segundo Koide (1991), as MAs beneficiam a planta pela redução do déficit de P, que resulta do maior suprimento deste nutriente (**Figura 5.11**). Assim, quanto maior for a demanda de P, maior é o déficit e maior é o benefício ou dependência da planta (Manjunath & Habte, 1991) e menor é sua eficiência de utilização de P na ausência de micorriza (Baon et al., 1993). De fato, os estudos deste laboratório comprovam esta relação (Siqueira, 1990). O efeito equivalente estimado da inoculação com fungos MAs foi de 20, 30, 60, 120 e 200 kg de P . ha^{-1}, respectivamente para a braquiária, milho, soja, cafeeiro e estilosantes, que apresentam dependência micorrízica e demanda de P crescentes e eficiência de utilização de P do solo decrescente.

A absorção de outros nutrientes é também influenciada pelas MAs e está envolvida nas respostas em crescimento. Micronutrientes que apresentam baixa mobilidade têm baixa difusão no solo e as MAs aumentam sua absorção (Marschner & Dell, 1994). Isto é o caso de Zn e Cu, cuja presença de MA pode aliviar deficiência pelo aumento na absorção, tal como se verifica para o P. Em milho crescendo em solo calcário, as MAs foram responsáveis pela absorção de 16% a 25% do Zn, e 52% a 62% do Cu (Li et al., 1991). As MAs também aliviam os efeitos de deficiência destes nutrientes induzidas por altos níveis de P (Siqueira & Saggin-Júnior, 1994). Em contraste, os teores de Mn são geralmente menores em plantas micorrizadas, e isto parece ser devido a efeitos indiretos, resultantes de alterações microbiológicas induzidas pelas MAs na rizosfera, principalmente diminuição na população de bactérias redutoras de Mn (Marschner & Dell, 1994). Isto, contudo, não exclui outros mecanismos, como absorção seletiva pelas hifas dos fungos MAs. Resultados semelhantes são também relatados para alguns metais pesados, podendo as MAs contribuirem para maior tolerância das plantas à toxicidade destes elementos.

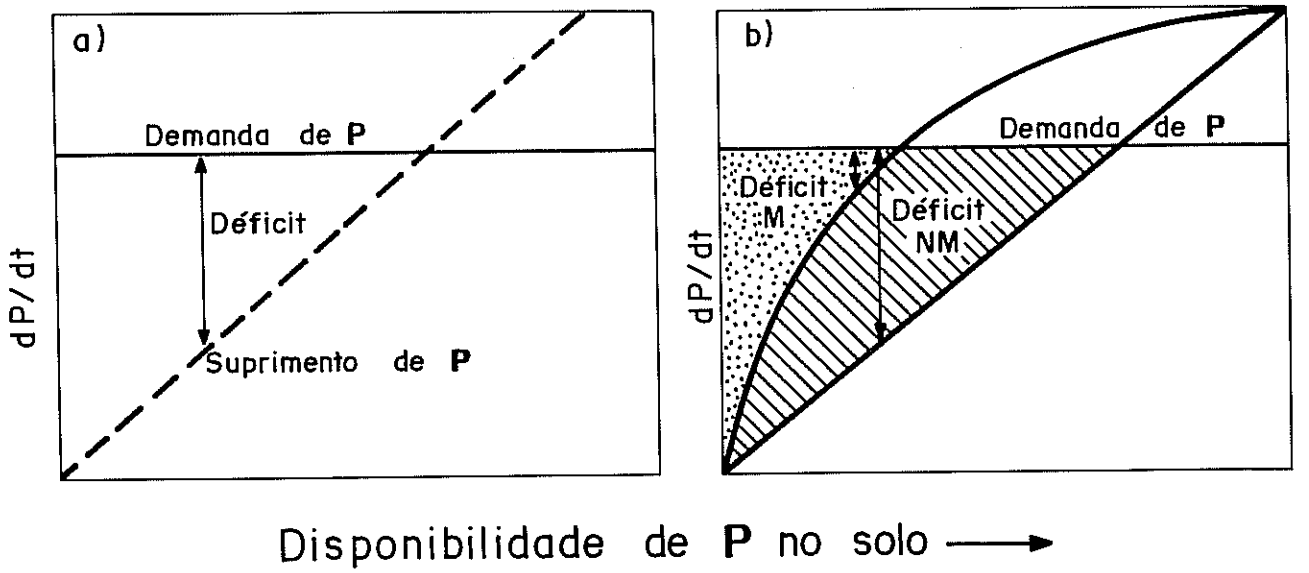


Figura 5.11. Deficiência de P na planta (**a**) e sua redução pela presença de MAs (**b**); onde: M e NM = plantas com e sem MAs e dP/dt = suprimento de P para a planta. Adaptado de Koide (1991).

As MAs também interferem direta ou indiretamente na aquisição de N pelas plantas. Hifas fúngicas são capazes de absorver N nas formas orgânica e inorgânica, transferindo-as para a planta (Ames et al., 1983). Estudos em fase de conclusão, em laboratório da ESAL, indicam que certas espécies arbóreas só respondem a N-mineral quando são micorrizadas, fato também verificado para plantas de batata-doce obtidas por micropropagação (Paula et al., 1991). Plantas micorrizadas apresentam maior assimilação de NH_4, produção de glutamina e translocação de N via xilema (Cliquet & Stewart, 1993), mas não há evidências de alterações na rota metabólica do N na planta. Se os efeitos das MAs na absorção de N pelas plantas forem tão generalizados quanto aqueles verificados para o P, o papel das MAs na funcionalidade do ecossistema será maior do que se pensa atualmente (Barea, 1991). Por mecanismo indireto, as MAs favorecem a aquisição de N através de relações sinergistas com microrganismos e sistemas fixadores de N_2 atmosférico, principalmente com rizóbio (Linderman, 1992; Allen, 1992). No caso da simbiose rizóbio-leguminosas, que é muito limitada por P nos solos tropicais, os benefícios das MAs parecem resultar da melhoria na absorção de P, que aumenta a produção de raízes e a fotossíntese. Isto resulta em maior nodulação e fixação do N_2 (Barea, 1991). A capacidade fixadora de N_2, medida pela atividade da nitrogenase (N_2ase), é também maior em plantas micorrizadas, aparentemente devido ao fluxo mais constante de P nos nódulos, favorecendo assim os mecanismos energéticos e bioquímicos da fixação. Em estudo em solo de cerrado, a aplicação de P (120 kg de P_2O_5 . ha^{-1}) e a inoculação com *G. macrocarpum* dobraram a quantidade de N acumulada na parte aérea da soja, em relação ao tratamento sem MA (Paula & Siqueira, 1987a). A relação rizóbio-MA é de grande interesse nos trópicos, onde os solos são extremamente deficientes em N e P. Algumas leguminosas nem mesmo nodulam na ausência das MAs (Mosse, 1981). Outros efeitos nutricionais das MAs, como a absorção de K e de micronutrientes e alterações na relação água-planta, podem também interferir na fixação simbiótica do N_2.

Mais recentemente, a transferência de nutrientes entre as raízes da mesma planta e entre plantas, mediadas pelas hifas fúngicas que atuam como canais de ligação, tem ganho muita evidência (Francis & Read, 1994). Este fenômeno é de grande importância nos ecossistemas não-alterados e também nos agrossistemas baseados em consorciação de culturas envolvendo gramíneas e leguminosas fixadoras de N_2, os quais apresentam elevada sustentabilidade (Peoples & Herridge, 1990). A presença das interconexões de hifa contribui para maximizar a transferência de N e outros nutrientes entre as culturas consorciadas (Hamel et al., 1991). Não obstante, a significância disto, em condições de campo, ainda requer evidências experimentais.

5.4.2. Efeitos não-nutricionais

Os efeitos não nutricionais das MAs sobre o hospedeiro encontram-se listados na **Tabela 5.12**. O favorecimento da relação água-planta, depois dos benefícios nutricionais, é o efeito mais importante das MAs para as plantas. A colonização aumenta a resistência das plantas à seca, embora existam trabalhos com resultados contrários a este (Sylvia & Williams, 1992). O aumento da resistência à seca é geralmente atribuído à melhoria do estado nutricional (Nelsen, 1987), mas outros fatores, modificados pela colonização, também influenciam os benefícios das MAs na relação água-planta. Estes incluem: alterações na elasticidade das folhas, potencial de água e turgor das folhas, taxa de transpiração, abertura estomatal e alterações nas raízes (comprimento e profundidade). Paula & Siqueira (1987b) verificaram que, em casa de vegetação, plantas de soja resistem mais ao déficit hídrico e recuperam o turgor mais rapidamente quando o nível adequado de água do solo é restabelecido. O milho inoculado com *G.etunicatum* mostrou-se mais tolerante ao estresse hídrico no campo que sem inoculação (Sylvia & Williams, 1992). Como as MAs são mais ativas em condições subótimas de nutrição, existe uma interação muito forte entre o estado nutricional-micorrização-tolerância ao estresse hídrico, o que sem dúvida interessa à agricultura tropical. Plantas de soja crescendo em latossolo roxo com alto nível de umidade (100% do volume total de poros preenchidos com água) mostram sintomas foliares típicos de toxicidade de Mn, os quais foram ausentes em plantas inoculadas com fungos MAs (Paula & Siqueira, 1987b). Cabe salientar que o efeito protetor das MAs contra o excesso de Mn já foi mencionado neste capítulo. Outros aspectos fisiológicos das MAs na relação água-planta são abordados em Nelsen (1987) e Sylvia & Williams (1992).

As plantas micorrizadas exibem também alterações metabólicas, fisiológicas e anatômicas diversas. Várias auxinas, citoquininas, giberelinas e vitaminas acumulam-se em maior quantidade em plantas com MAs. Se estas são resultantes da interação fungo-planta ou de seus benefícios primários, como da melhoria nutricional, ainda é uma questão sem resposta. Diversos especialistas consideram que a maioria das alterações fisiológicas resulta dos benefícios nutricionais, mas as alterações nas substâncias reguladoras do crescimento devem ser reguladas diretamente pela simbiose, pois são necessárias para o funcionamento (fluxo de metabólitos) da associação (Schwab et al., 1991; Smith et al., 1994).

Os efeitos metabólicos das MAs incluem, principalmente: a) aumento do número de várias organelas; b) aumento da atividade enzimática; c) aumento da abertura estomatal; d) aumento da taxa de respiração e absorção de CO_2 (em até 20%); e) aumento da exsudação radicular; f) redução do conteúdo de amido (em até 50%); g) elevação na relação C/P e N/P; h) alteração na composição de aminoácidos; i) acúmulo de ácidos graxos pouco comuns, como 16:1 (11c), e do pinitol. Estas alterações são bem evidentes e interferem em outros processos como na nutrição e na microbiota associada.

A redução dos malefícios causados pelos fatores bióticos é também comumente relatada nas MAs. Os fungos MAs nas raízes não atuam como agentes de biocontrole, mas amenizam os efeitos ou danos causados pelos nematóides, fungos patogênicos do sistema radicular e algumas pragas. As MAs reduzem a incidência de doenças na maioria dos casos conhecidos, mas podem aumentar em algumas situações. Patógenos foliares, por exemplo, podem ser favorecidos pelas MAs (ver Bagyaraj, 1984). No caso dos nematóides, a interação com os fungos MAs pode resultar em aumento, redução ou nenhum efeito sobre o ataque, mas existem evidências de maior resistência de plantas micorrizadas e redução na reprodução dos nematóides. Como também se verifica em relação aos patógenos radiculares, os efeitos dos fungos MAs dependem de qual organismo se estabelece primeiro nas raízes.

A interação micorrizas com pragas é ainda pouco explorada. Rabin & Pacovsky (1985) demonstraram que larvas de *Heliothis zea* e *Spodoptera frugiperda* tiveram crescimento e pupação reduzidos quando alimentadas com folhas oriundas de plantas micorrizadas. Isto parece ser devido ao acúmulo de substâncias tóxicas ou com ação repelente, como compostos aromáticos nas plantas micorrizadas. Estes resultados abrem novas perspectivas para as MAs no contexto da produtividade agrícola nos trópicos e precisam ser melhor avaliados no Brasil. Alguns pesticidas podem interferir na micorrização, como se verifica com o uso do Carboxin, Captan e fungicidas sistêmicos. Estes podem controlar o agente alvo, mas podem também reduzir a micorrização e tornar a cultura mais exigente em nutrientes e mais suscetível ao déficit temporário de água. A interação MA-patógenos pode também estar envolvida no declínio das monoculturas, que geralmente se manifesta com deficiências nutricionais e ataque de patógenos radiculares. Os estudos conduzidos com aspargos nos Estados Unidos são evidências destas relações, envolvendo inclusive a ação de aleloquímicos (Siqueira et al., 1991a). Os mecanismos envolvidos nestas respostas não são conhecidos, mas resultam do melhor vigor das plantas micorrizadas.

As MAs podem também atuar como amenizadoras de estresses abióticos diversos, como acidez, metais pesados, estresse osmótico e produtos químicos (Sylvia & Williams, 1992). Algumas gramíneas, como *Brachiaria decumbens* e *Panicum virgatum* L., crescem melhor e absorvem menos Al e mais Ca e P quando são micorrizadas (Koslowsky & Boerner, 1989; Siqueira et al., 1990). As MAs podem aumentar a absorção de metais pesados, mas protegem as plantas da toxicidade destes, quando em concentrações moderadas (Sylvia & Williams, 1992). Os fungos MAs podem também aliviar os efeitos fitotóxicos de doses sub-letais de fitotoxinas. Siqueira et al. (1991b) demonstraram que a aplicação do isoflavonóide formononetina, em solo contendo 13 ppb residual do herbicida da Scepter (Imazaquin) e fungos MAs indígenas, reduziu a fitotoxicidade do herbicida residual para o milho e sorgo. Estes efeitos não foram observados quando o solo foi autoclavado para eliminar os propágulos dos fungos MAs. Como já foi exposto, a formononetina estimula a micorrização, que através de mecanismos desconhecidos protege as plantas da fototoxicidade induzida por Scepter. Embora ainda sem resultados experimentais, acredita-se que as MAs possam proteger as plantas de outros produtos fitotóxicos.

As hifas dos fungos MAs e seus polissacarídeos extracelulares desempenham função importante na agregação do solo (Tisdall, 1994). Dentro dos agregados, as hifas formam uma rede que atinge até 50 m de hifa por grama de agregado estável, contribuindo de modo significativo para a estabilização dos mesmos. Estudos realizados na Austrália (Tisdall, 1994) mostram relações muito estreitas entre o cultivo e o comprimento total de hifa e a proporção de agregados estáveis. Solos cultivados ou em pousio continham menos de 5m hifa . g^{-1} de solo e menos de 5% de agregados estáveis, enquanto no solo virgem havia em torno de 17 m de hifa e 24% de agregados estáveis.

Assim, os agregados são estabilizados pelas MAs que são, por outro lado, protegidas pelos agregados. Modelo conceitual para os efeitos das MAs na distribuição dos agregados por tamanho mostra que as raízes finas e as hifas são os principais fatores determinantes do diâmetro médio geográfico (Miller & Jastrow, 1992). Como solos bem agregados são menos afetados pela erosão e mais produtivos, os efeitos das MAs na agregação contribuem para a produtividade e sustentabilidade agrícola e para a conservação ambiental.

5.5. Tecnologia das MAs

Uma das estratégias para alcançar a sustentabilidade de qualquer ecossistema é maximizar o uso dos microrganismos e processos biológicos benéficos do solo, dentre os quais destacam-se as MAs. Esta associação apresenta enorme potencial biotecnológico, exercendo grande impacto na agricultura e qualidade ambiental.

As MAs ocorrem na maioria das espécies de interesse econômico, e os benefícios da micorrização para o crescimento, nutrição e sanidade das plantas variam marcadamente em virtude dos componentes do sistema micorrízico (planta, fungo e solo) e do manejo destes componentes (Johnson & Pfleger, 1992). Quando se pretende explorar esta simbiose, diversos aspectos destes componentes precisam ser considerados (**Tabela 5.14**). Conforme a característica ou condição de cada componente têm-se estratégias diferentes e esperam-se sucessos variados. Para culturas não-micotróficas (não-micorrízicas), recomenda-se, no caso de agrossistema, a rotação com uma espécie micotrófica para aumentar o número de propágulos no solo. Culturas micorrizo-dependentes devem ser inoculadas e o grau de sucesso esperado com a inoculação pode ser alto, dependendo das outras condições. Outro aspecto é a fertilidade do solo. Os efeitos da micorrização são máximos em condições de fertilidade média ou baixa (**Figura 5.9**) onde a inoculação, se praticada, terá sucesso. Em solo de fertilidade muito baixa, recomenda-se a correção antes da inoculação, enquanto em solos muito férteis devem-se reduzir as quantidades de nutrientes aplicadas via adubação. A densidade e qualidade dos propágulos do solo, que determinam sua infectividade, ou seja, capacidade de formar MAs espontâneamente, constituem outro aspecto importante. Os fungos indígenas do solo podem ocorrer em densidade baixa ou alta ou, até mesmo, estar totalmente ausentes, e a efetividade simbiótica destes pode também variar muito. Deve-se praticar a inoculação em solos com baixa densidade de propágulos de baixa efetividade, enquanto em solos com alta densidade de fungos efetivos deve-se manejar o sistema de modo que esta população seja mantida sem muita alteração. O sucesso desta prática, no entanto, é difícil de ser previsto (Miller et al., 1994). Considerando todos estes aspectos, inoculações bem sucedidas são esperadas nas seguintes condições:

a) Solos com baixa infectividade ou totalmente isentos de propágulos de fungos MAs. Exemplos: solos degradados, fumigados, cultivados com plantas não-hospedeiras ou em pousio por períodos prolongados;
b) Solos com condição nutricional abaixo do ótimo para o crescimento máximo da cultura;
c) Em condições ambientais estressantes;
d) Locais com alta incidência de doenças do sistema radicular;
e) Quando espécies ou isolados fúngicos efetivos e adaptados às condições edafoclimáticas forem disponíveis para inoculação;

f) Quando a fertilidade do solo e aplicações de fertilizantes e corretivos forem monitorados cuidadosamente;
g) Quando a oferta de fertilizantes ou os preços se tornarem limitantes para os agricultores;
h) Quando tecnologia apropriada para produção, armazenagem e comercialização de inóculo se tornar disponível.

Tabela 5.14. Principais aspectos a serem considerados na utilização dos fungos MAs: condições do solo e planta, estratégia recomendada e grau de sucesso esperado. Adaptado de Siqueira & Saggin Jr. (1994).

Condições (planta, solo, fungo)		**Estratégia adotada**	**Grau de sucesso**
I - Relação fungo-planta			
Condição micorrízica da planta	Grau de dependência		
Micorrízica	Altamente dependente	Inocular	Muito alto
Micorrizica	Dependente	Inocular	Alto
Não-micorrizica	Não se aplica	Rotação cultura	Muito baixo
II - Condições químicas do solo			
Fertilidade	Efeito da micorrização		
Alta	Depressivo	Red. adubação	Muito baixo
Média	Benéfico	Inocular	Médio
Baixa	Muito benéfico	Inocular	Muito alto
Muito baixa	Nenhum	Adubar e inocular	Alto
III - Fungos nativos no solo			
Propágulos no solo	Efetividade		
Ausentes	Não se aplica	Inocular	Muito alto
Baixa densidade	Baixa	Inocular	Alto
Baixa densidade	Alta	Manejar	Alto
Alta densidade	Baixa	Inocular	Baixo
Alta densidade	Alta	Manter	Baixo

A inoculação não será bem sucedida em solos férteis ou naqueles submetidos a adubações pesadas, pois a alta disponibilidade de nutrientes inibe o estabelecimento da simbiose e, mesmo que ela se estabeleça, os benefícios para a planta serão reduzidos, inexistentes ou, até mesmo, as MAs podem atuar como parasitas. Assim, a condição ótima de fertilidade que maximiza a respostas das MAs precisa ser determinada. Em solos com fertilidade muito baixa,a aplicação de nutrientes, especialmente de P, pode aumentar os efeitos da inoculação, dependendo da espécie cultivada (**Tabela 5.11**). Isto está relacionado ao déficit de P que é determinado pela demanda de P pela planta e suprimento pelo solo (**Figura 5.11**). Relação semelhante deve existir para outros nutrientes que têm a absorção favorecida pelas MAs, especialmente Zn e Cu. Menge et al. (1982) verificaram que, em solos da Califórnia, Estados Unidos, contendo acima de 34, 12 e 27 ppm de P (Olsen), Zn e Mn, respectivamente, o citro não responde à inoculação com *G. fasiculatum* (= *G.deserticola*). De acordo com esse estudo, a inoculação seria benéfica em 77% dos solos da Califórnia plantados com citros.

As condições biológicas do solo são também de grande influência nas respostas à inoculação. Os efeitos da inoculação são maiores em solos fumigados, mas ocorrem também em solos não-esterilizados (**Figura 5.12**). Em solos não-fumigados, o fungo introduzido tem que competir com fungos indígenas, geralmente bem adaptados, e com antagonistas, hiperparasitas e outros componentes da biota do solo. A produtividade da mandioca, em resposta à inoculação com fungos MAs, decresceu de 15% a 28% em solos com até 213 esporos . 100 g^{-1} para 12% e 11%, em solos contendo 823 e 1717 esporos . 100 g^{-1} de solo, respectivamente (Sieverding, 1991). Do mesmo modo, a resposta do estilosantes à inoculação foi mínima em solos com mais de 20% de colonização pelos fungos indígenas (Mosse, 1981). No entanto, a infectividade da maioria dos solos agrícolas é baixa, podendo-se obter respostas à inoculação, como se verifica para o cafeeiro (**Figura 5.12**) e soja em solo de cerrado.

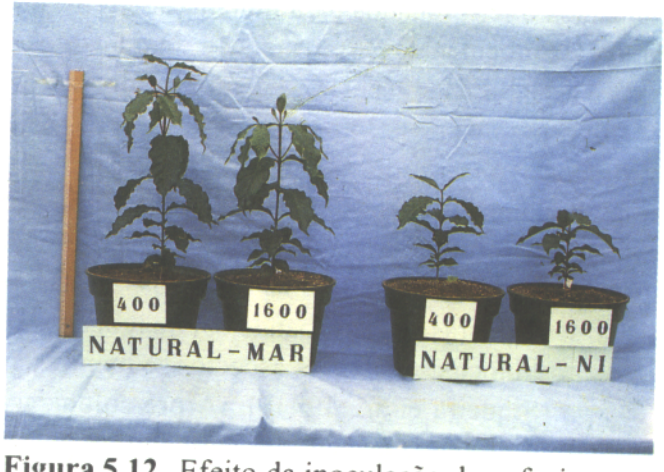


Figura 5.12. Efeito da inoculação do cafeeiro com *Gigaspora margarita* (MAR), em solo não-fumigado e adubado com difentes quantidades de P.

As MAs não são compatíveis e nem mesmo necessárias em sistemas manejados intensivamente, mas podem "representar as raízes de uma agricultura sustentável". A importância relativa e potencial das MAs para a produção agrícola mundial decresce na seguinte ordem: agrossistemas de baixo insumo, sistemas altamente alterados e sistemas manejados intensivamente. Contudo, as pressões para redução no uso de fertilizantes e biocidas, a adoção de sistemas de rotação e cultivos reduzidos, melhor integração com os ambientalistas e o desenvolvimento de tecnologias para exploração das MAs contribuem para aumentar sua importância para os atuais sistemas intensivos de produção agrícola. Nos sistemas alternativos de produção, como no LISA ("low input sustainable agriculture") e agricultura orgânica, as MAs desempenham papel de grande importância (Douds-Júnior et al., 1993). Em condições controladas de produção, como aquelas com plantas envasadas e substratos esterilizados, mudas em viveiros com solos fumigados e programas de recuperação de áreas degradadas, as MAs são geralmente essenciais para garantir o sucesso da exploração.

Apesar do enorme potencial e do grande volume de estudos, a exploração dos fungos MAs em larga escala ainda apresenta vários obstáculos, sendo os principais apresentados a seguir:

a) Biologia do fungo é ainda pouco conhecida. O caráter biotrófico obrigatório dificulta estudos da biologia básica e multiplicação em larga escala;
b) Falta de inoculantes aceitos comercialmente. Apesar de várias tentativas, a comercialização dos fungos MAs é ainda muito limitada. Várias empresas internacionais colocaram no mercado produtos como Nutri-Link (NPI-Estados Unidos), Mykovan (Filipinas), Mycori-Mix (Primier Peat-Canadá) e Vaminoc (UK e Japão), mas nenhum teve aceitação ampla.
c) Mercado é muito fragmentado devido à diversidade dos sistemas onde o uso é promissor;
d) Expectativas irreais dos diversos segmentos envolvidos na exploração dos fungos MAs;
e) Falta de resultados consistentes e previsíveis a campo e de análise de custo e benefícios.

A falta de inoculante aceito comercialmente representa o principal obstáculo para a exploração comercial dos fungos MAs. Mesmo existindo várias alternativas para multiplicação do fungo *in vivo* (Sylvia & Jarstfer, 1994), utilizando-se meios inertes sem solo e hidroponia, inoculantes aceitos comercialmente são ainda raros. Mesmo assim, os fungos MAs podem ser multiplicados em solos ou substratos desinfestados e utilizados para inoculações. Para se conseguir isto, fungos devem ser isolados ou introduzidos, multiplicados e selecionados para inoculação ou mesmo para serem fornecidos aos produtores ou fornecedores de inoculantes (**Figura 5.13**). Organismos selecionados são utilizados para inoculações diversas e a viabilidade técnica e econômica do processo pode ser avaliada. A partir das etapas iniciais de um programa de pesquisa, constatou-se, em laboratório da ESAL, que a inoculação do cafeeiro com fungos MAs, em solos pobres dos trópicos, é viável na cafeicultura brasileira (Siqueira et al., 1993a). Mudas de cafeeiro devem ser inoculadas com isolados de *Glomus etunicatum* nativos do agrossistema cafeeiro selecionados quanto à efetividade simbiótica, ou com *Gigaspora margarita*, também de ocorrência natural nos cafeeiros. Mudas de cafeeiro inoculadas na repicagem para sacos plásticos, sementeiras móveis (bandejas) ou tubetes, crescem mais rapidamente e com maior vigor que aquelas sem inoculação. Estes aspectos se manifestam também quando estas são transplantadas para o campo (Siqueira et al., 1993b). A pré-colonização das mudas durante a formação representou aumento de produtividade média, em três anos, equivalente a 7 sacas (de 60 kg) de café beneficiado . ha^{-1} . ano^{-1}. Apesar de não se conhecerem os custos exatos da inoculação nas condições brasileiras, pode-se afirmar que a pré-colonização das mudas é economicamente viável, considerando os custos de U$ 5,00 . 1000 $mudas^{-1}$ (equivalente a U$ 12,50 . ha^{-1}), praticados nos Estados Unidos. Estudos conduzidos em laboratório da ESAL indicam, em vários experimentos,

aumentos de produtividade média do cafeeiro da ordem de 60% devido à pré-colonização das mudas e plantio de lavouras em solo de cerrado (Siqueira et al., 1993a). Testes de inoculação realizados por agricultores, mediante o fornecimento de inoculante (solo infestado), também demonstram as vantagens da inoculação. Procedimentos semelhantes podem ser adotados para outras culturas que passam por fase de formação de mudas e para espécies destinadas a reflorestamento ou recuperação de áreas degradadas (Franco et al., 1992). Portanto, embora ainda sem uma tecnologia amplamente utilizada, a aplicação das MAs em sistemas de produção de mudas é uma realidade viável.

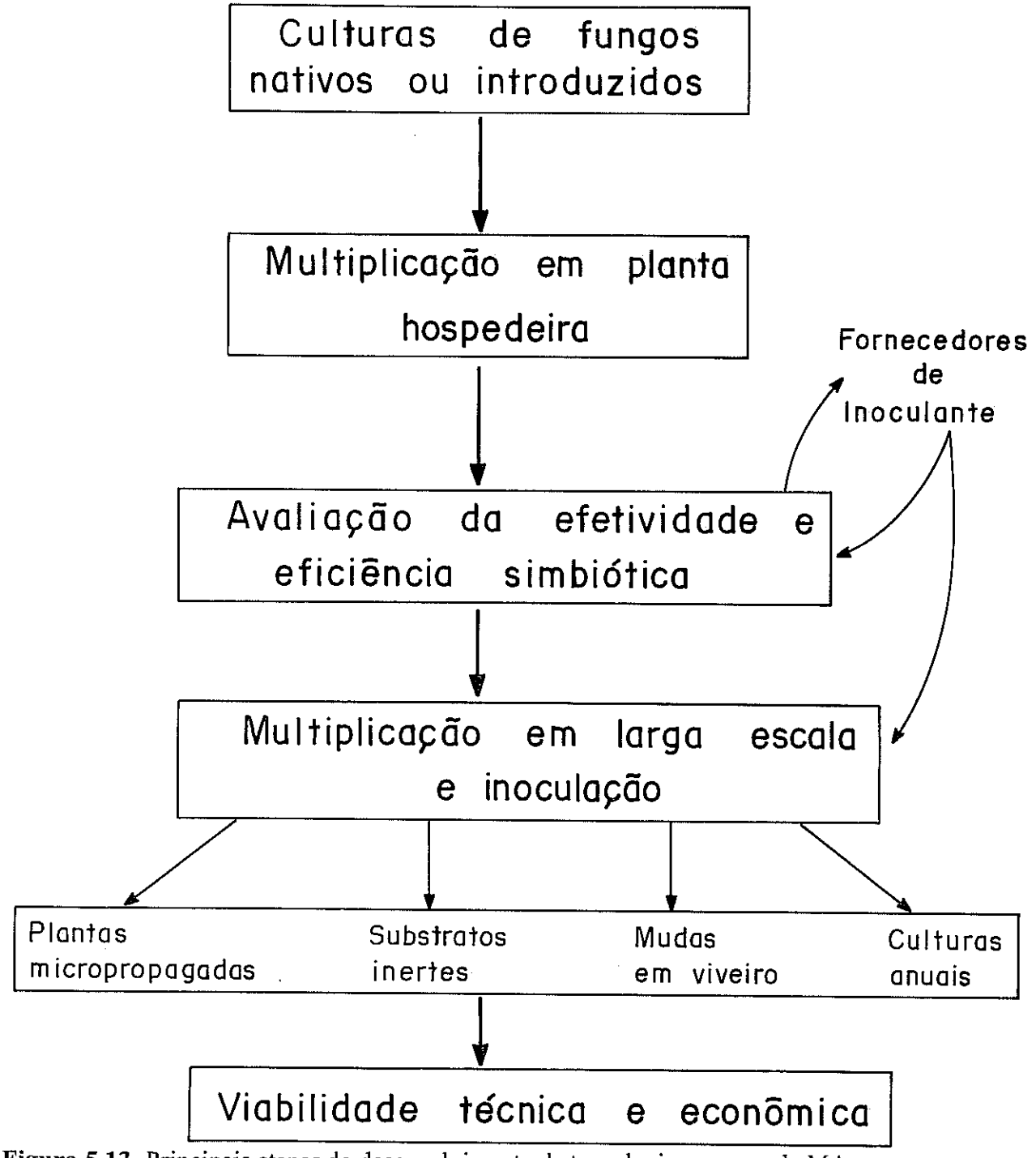


Figura 5.13. Principais etapas do desenvolvimento de tecnologia para uso da MAs.

O uso das MAs em culturas de ciclo curto, como produtoras de grãos, é mais difícil de ser praticado via inoculações. A maioria dos solos agrícolas tem propágulos de MAs, mas geralmente estes não se encontram em níveis suficientes para alcançar taxas de colonização capazes de garantir benefícios a culturas de ciclo curto, como a soja e o milho. A colonização das raízes deve atingir seu máximo antes do pico de demanda de nutrientes (P) (O'Keffe & Sylvia, 1991), quando o déficit de P é máximo. Como isto não ocorre, devido à baixa infectividade do solo, a inoculação é geralmente benéfica quando existe déficit nutricional. Diversos estudos realizados no exterior apontam os benefícios da inoculação (por exemplo, Baltruschat, 1987), mas deixam claro a inviabilidade econômica da tecnologia, devido principalmente à elevada quantidade de inoculante necessária e ao custo de produção e aplicação do mesmo.

Alternativamente, pode-se manejar a população fúngica do solo através de rotação de culturas, visando aumentar a densidade de propágulos e colonização micorrízica. Mas, segundo Mosse, (1986), citado por Miller et al. (1994), "devido à diversidade dos fungos MAs, ao conhecimento inadequado das relações fungo-solo e à variabilidade de resposta das plantas, é difícil predizer os efeitos da modificação dos sistemas micorrízicos na produção agrícola". Assim, o manejo das MAs em campos de produção, embora de grande interesse biológico e ambiental, parece difícil de ser conseguido. Não obstante, em casos como os de solos sob pousio prolongado, cultivados com planta não-hospedeiras e nas monoculturas prolongadas, práticas como a rotação de culturas podem aumentar a infectividade do solo. As condições micorrízicas do solo e a dependência das culturas são fatores importantes na definição de sistemas de rotação, devendo-se considerar o seguinte:

a) utilizar culturas com baixa dependência micorrízica, em solos com baixa infectividade;
b) utilizar culturas com elevada dependência micorrízica, em solos com alta infectividade;
c) utilizar, em solos infestados com patógenos, plantas não-hospedeiras destes.

A descoberta de compostos aromáticos capazes de estimular a micorrização (Nair et al., 1991; Siqueira et al., 1991b) abre novas perspectivas para aplicação das MAs em sistemas agrícolas. A aplicação de formononetina no solo, por ocasião da semeadura, acelera a micorrização. Este composto acha-se patenteado nos Estados Unidos como bioestimulante de solo (US patents nº 5002603, 5085682 e 5125955) e, conforme resultados preliminares (**Tabela 5.15**), apresenta enorme potencial para o desenvolvimento de tecnologia para a agricultura brasileira e mundial. Há necessidade, porém, de ampla experimentação a campo, para determinar solos e condições onde a aplicação do composto tenha efeito garantido.

Tabela 5.15. Efeito da aplicação de formononetina sintética nas produtividades do milho e da soja, em latossolo na região de Lavras (Siqueira et al., 1992).

Variáveis	Milho		Soja	
	Controle	Formononetina	Controle	Formononetina
Produtividade (kg . ha^{-1})	3555	4405	1510	2289
Aumento produção (%)	-	24	-	52
Aumento receita (U$. ha^{-1})	-	72	-	140
Impacto estimado* (U$ bi)	-	0,9	-	1,6
Quantidade aplicada (g . ha^{-1})	-	125	-	250

* Na agricultura brasileira.

5.6. Referências bibliográficas

ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Factors influencing the ocurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.35, p.121-150, 1991.

ALLEN, M.F. (ed.) **Mycorrhizal Functioning**. London: Chapman Hall, 1992. 515p.

ALVES, G.L.N. **Micorrizas vesicular-arbusculares no crescimento e utilização do fósforo do solo pela brachiaria e estilosantes**. Lavras, ESAL, 1988. 42p. Tese de Mestrado.

AMES, R.N.; REID, C.P.P.; PORTER, L.K.; CAMBARDELLA, C. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ^{15}N - labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytol.**, v.95, p.381-396, 1983.

ASAI, T. Uber das vorkommen und die bedeutung der wurzelpilze in den landpflanzen. **J. Bot.**, v.7, p.107-150, 1943.

BAGYARAJ, D.J. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. ed. **VA mycorrhiza.** Boca Ratton: CRC, 1984. p.131-153.

BALTRUSCHAT, H. Field inoculation of maize with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by using expanded clay as carrier material for mycorrhiza. **Zeit. Pflanzenk. Pflanz.**, v.94, n.4, p.419-430, 1987.

BAON, J.B.; SMITH, S.E.; ALSTON, A.M. Phosphorus allocation in P-efficient and inefficient barley cultivars as affected by mycorrhizal infection. **Pl. Soil**, v.155/156, p.277-280, 1993.

BAREA, J.M. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. **Adv. Soil Sci.**, v.15, p.1-39, 1991.

BÉCARD, G.; DOUDS, D.D.; PFEFFER, P.E. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO2 and flavonols. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.821-825, 1992.

BELLGARD, S.E. The topsoil as the major store of the propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in southeast Australian sandstone soils. **Mycorrhiza**, v.3, p.19-24, 1993.

BOLAN, N.S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Pl. Soil**, v.134, p.189-207, 1991.

BRUNDRETT, M. Mycorrhizas in natural ecosystems. **Adv. Ecol. Res.**, v.21, p.171-313, 1991.

CLIQUET,J -B.;STEWART, G.R. Ammonia assimilation in *Zea mays* L. infected with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **Plant Physiol.**, v.101, p.865-871, 1993.

DALPÉ, Y. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: CARTER, M.R., ed. **Soil Sampling and Methods of Analysis**. Ottawa: Canadian Society of Soil Science, 1993. p.287-301.

DOUDS-JUNIOR, D.D.; JANKE, R.R.; PETERS, S.E. VAM fungus spore populations and colonization of roots of maize and soybean under conventional and low-imput sustainable agriculture. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.43, p.325-335, 1993.

ELIAS, K.S.; SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, p.1928-1933, 1987.

FERNANDES, A.; SIQUEIRA, J.O. Micorrizas vesicular-arbusculares em cafeeiros da região sul do estado de Minas Gerais. **Pesq. agropec. bras.**, v.4, n.12, p.1489-1498, 1989.

FERNANDES, A.B.; SIQUEIRA, J.O.; MENEZES, M.A.L.; GUEDES, G.A.A. Efeito diferenciado do fósforo sobre o estabelecimento e efetividade da simbiose endomicorrízica em milho e soja. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.11, p.101-108, 1987.

FRANCIS, R.; READ, D.J. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. **Pl. Soil**, v.159, p.11-25, 1994.

FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.; SILVA, E.M.R. da; FARIA, S.M. de **Revegetação de solos degradados.** Seropédica: EMBRAPA/CNPBS, 1992. 11p. (EMBRAPA/CNPBS. Comunicado Técnico, 9)

GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.6 , p.397-418, 1968.

GIANINAZZI, S. Vesicular-arbuscular (endo-)mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.35, p.105-119, 1991.

HABTE, M.; FOX, R.L.; AZIZ, T.; EL-SWAIFY, S.A. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi whith erosion in and oxisol. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.54, p.945-950, 1988.

HALE, H.A.; SANDERS, F.E. Effects of benomyl on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of red clover (*Trifolium pratense* L.) and consequences for phosphorus inflow. **J. Plant Nutr.**, v.5, n.2, p.1355-1367, 1982.

HAMEL, C.; BARRANTES-CARTIN, U.; FURLAN, V.; SMITH, D.L. Endomycorrhizal fungi in nitrogen transfer from soybean to maize. **Pl. Soil**, v.138, p.33-40, 1991.

HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 1983. 483p.

HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T.; COX, T.S. Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties, landraces, and ancestors. **Can. J. Bot.**, v.70, p.2032-2040, 1992.

HOWELER, R.H.; SIEVERDING, E.; SAIF, S. Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. **Pl. Soil**, v.100, p.249-283, 1987.

JANOS, D.P. Tropical mycorrhizas, nutrient cycles and plant growth. In: SUTTON, S.L.; WHITMORE, T.C.; CHADWICK, A.C., ed. **Tropical Rain Forest:** Ecology and Management. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1983. p.327-345.

JAYACHANDRAN, K.; SCHWAB, A.P.; HETRICK, B.A.D. Mineralization of organic phosphorus by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biol. Biochem.**, v.9, n.24, p.897-903, 1992.

JEFFRIES, P. Use of mycorrhizae in agriculture. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.5 , p.319-357, 1987.

JOHNSON, N.C.; PFLEGER, F.L. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stresses. In: **Mycorrhizae in Sustainable Agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1992. p.71-99.

JOHNSON, N.C.; TILMAN, D.; WEDIN, D. Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. **Ecology**, v.73, n.6, p.2034-2042, 1992b.

JOHNSON, N.C.; COPELAND, P.J.; CROOKSTON, R.K.; PFLEGER, .F.L. Mycorrhizae: possible explanation for yield decline with continuous corn and soybean. **Agron. J.**, v.84, p.387-390, 1992a.

JOHNSON, N.C.; PFLEGER, F.L.; CROOKSTON, R.K.; SIMMONS, S.R.; COPELAND, P.J. Vesicular-arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. **New Phytol.**, v.117, p.657-663, 1991.

KLEINSCHMIDT, G.D.; GERDEMANN, J.W. Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soils related to the absence of endomycorrhizae. **Phytopathol.**, v.62, n.12, p.1447-1452, 1972.

KOIDE, R.T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. **New Phytol.**, v.117, p.365-386, 1991.

KOIDE, R.T.; SCHREINER, R.P. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.43, p.557-581, 1992.

KOSLOWSKY, S.D.; BOERNER, R.E.J. Interactive effects of aluminium, phosphorus and mycorrhizae on growth and nutrient uptake of *Panicum virgatum* L. (Poaceae). **Environ. Poll.**, v.61, p.107-125, 1989.

KUNISHI, H.M.; BANDEL, V.A.; MILLNER, P.D.; ANDERSON, E.A. Soil fumigation effects on growth and phosphorus uptake by corn. **Commun. in Soil. Plant Anal.**, v.20, n.15/16, p.1545-1555, 1989.

LI, X-L.; MARSCHNER, H.; GEORGE, E. Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. **Pl. Soil**, v.136, p.49-57, 1991.

LINDERMAN, R.G. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: **Mycorrhizae in Sustainable Agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1992. p.45-70.

LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; DIAS, R.; SCHENCK, N.C. Occurrence and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in coffee (*Coffea arabica* L.) plantations in central São Paulo State, Brazil. **Turrialba**, v.33, p.417-422, 1983.

MAIA, C.L.; TRUFEM, S.F.B. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em solos cultivados no estado de Pernambuco. **Rev. bras. Bot.**, v.13, p.89-95, 1990.

MANJUNATH, A.; HABTE, M. Relationship between mycorrhizal dependency and rate variables associated with P uptake, utilization and growth. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.22, n.13/14, p.1423-1437, 1991.

MARKS, G.C.; KOZLOWSKI, T.T., ed. **Ectomycorrhizae their Ecology and Physiology**. London: Academic Press, 1973. 445p.

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Pl. Soil**, v.159, n.1, p.89-102, 1994.

MENGE, J.A.; JARRELL, W.M.; LABANAUSKAS, C.K.; OJALA, J.C.; HUSZAR, C.; JOHNSON, E.L.V.; SIBERT, D. Predicting mycorrhizal dependency of troyer citrange on *Glomus fasciculatus* in California citrus soils and nursery mixes. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.46, p.762-768, 1982.

MILLER, R.M.; JASTROW, J.D. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. In: **Mycorrhizae in Sustainable Agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1992. p.29-44.

MILLER, M.; McGONIGLE, T.; ADDY, H. An economic approach to evaluate the role of mycorrhizas in managed ecosystems. **Pl. Soil**, v.159, p.27-35, 1994.

MORTON, J.B. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature and identification. **Mycotaxon**, v.32, p.267-324, 1988.

MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (zygomicetes): a new order glomales, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae* and two new of *Glomaceae*. **Mycotaxon**, v.37, p.471-491, 1990.

MOSSE, B. Fructifications associated with mycorrhizal strawberry roots. **Nature**, v.171 p.974, 1953.

MOSSE, B. Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. **Nature**, v.179, p.922-924, 1957.

MOSSE, B. Vesicular-arbuscular mycorrhiza research for tropical agriculture. Institute for tropical Agriculture. and Human Resources, Hawaii, 1981. **Res Bull**, v.194, 82p.

NAIR, M.G.; SAFIR, G.R.; SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mhycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p.434-439, 1991.

NELSEN, C.E. The water relations of vesicular-arbuscular mycorrhizal systems. In: SAFIR, G.R., ed. **Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants**. Boca Ratton: CRC, 1987. p.71-91.

NICHOLSON, T.H. Vesicular-arbuscular mycorrhiza - a universal plant symbiosis. **Sci. Progr.**, v.55, p.561-581, 1967.

OLIVEIRA, E. de.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, R.D.; COLOZZI-FILHO, A.; SOUZA, P. DE. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo- arbusculares em cafeeiros das regiões do Alto Paranaíba e Triângulo no estado de Minas Gerais. **Hoehnea**, v.17, n.2, p.117-125, 1990.

O'KEFFE, D.M.; SYLVIA, D.M. Mechanisms of the vesicular-arbuscular mycorrhizal plant-growth response. In: ARORA, D.K.; RAI, B; MUKERJI, K.G.; KNUDSEN, G.R., ed. **Handbook of Applied Mycology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.35-53.

PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O. Efeito de micorrizas vesicular-arbusculares no crescimento, nodulação e acúmulo de N pela soja. **Pesq. agropec. bras.**, v.22, p.171-178, 1987a.

PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O. Efeito da umidade do solo sobre a simbiose endomicorrízica em soja. II. Crescimento, nutrição e relação água-planta. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.11, n.3, p.289-293, 1987b.

PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O. Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension-cultured *Pueraria phaseoloides* cells and cell products. **New. Phytol.**, v.115, p.69-75, 1990.

PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; OLIVEIRA, L.H.; OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica relativa em soja de populações de fungos endomicorrízicos nativos e de isolados de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora margarita*. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.12, p.25-31, 1988.

PAULA, M.A.; URQUIAGA, S; SIQUEIRA, J.O.; DÖBEREINER, J. Synergistic effects of VAM fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomea batatas*). **Biol. Fert. Soils**, v.13, p.145-152, 1991.

PENG, S.; EISSENSTAT, D.M.; GRAHAM, J.H.; WILLIAMS, K.; HODGE, N.C. Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply. Analysis of carbon costs. **Plant Physiol.**, v.101, p.1063-1071, 1993.

PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F. Nitrogen fixation by legumes in tropical and subtropical agriculture. **Adv. Agron.**, v.44, p.155-223, 1990.

PIROZYNSKI, K.A. Interactions between fungi and plants through the ages. **Can. J. Bot.**, v.59, p.1824-1827, 1981.

RABIN, L.B.; PACOVSKY, R.S. Reduced larva growth of two lepdoptera (Noctuidae) on excised leaves of soybean infected with a mycorrhizal fungus. **J. Econ. Entomol.**, v.78, p.1358-1363, 1985.

RHLID, R.B.; CHABOT, S; PICHé, Y.; CHENEVERT, R. Isolation and identification of flavonoids from Ri T-DNA-transformed roots (*Daucus carota*) and their significance in vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Phytochemistry**, v.33, p.1369-1371, 1993.

RICH, J.R.; SCHENCK, N.C. Seasonal variations in populations of plant-parasitic nematodes and vesicular-arbuscular mycorrhizal in Florida field corn. **Plant Dis.**, v.65, n.10, p.804-807, 1981.

ROSS, J.P. Effect of phosphate fertilization on yield of mycorrhizal and non-mycorrhizal soybeans. **Phytopathol.**, v.61, p.1400-1403, 1971.

SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O. Avaliação da efetividade simbiótica de fungos endomicorrízicos para o cafeeiro. Submetido à **Rev. bras. Ci. Solo**, ref. 378/94. (Em revisão)

SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O.; GUIMARÃES, P.T.G.; OLIVEIRA, E. Interação fungos micorrízicos versus superfosfato e seus efeitos no crescimento e teores de nutrientes do cafeeiro em solo não fumigado. **Rev. bras. Ci. do Solo**, v.18, p.27-36, 1994.

SCHENCK, N.C.; PÉREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. INVAM, University of Florida, Gainesville, 1987. 245p.

SCHENCK, N.C.; SIQUEIRA, J.O.; OLIVEIRA, E. Changes in the incidence of VA mycorrhizal fungi with changes in ecosystems. In: VANCURA, V.; KUNC, F., ed. **Interrelationships Between Microrganisms and Plants in Soil.** Amsterdam: Elsevier, 1989. p.125-129.

SCHWAB, S.M.; MENGE, J.A.; TINKER, P.B. Regulation of nutrient transfer between host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytol.**, v.117, p.387-398, 1991.

SIEVERDING, E. **Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems.** Deutsche Geselshaft Tecnishe Zusammenarbeit (GTZ) Eschborn, 1991, 371p.

SIQUEIRA, J.O. Eficiência de fertilizantes fosfatados em associações micorrízicas. In: ENCONTRO NACIONAL DE ROCHA FOSFÁTICA, 5., 1990, São Paulo. **Anais**. São Paulo: IBRAFOS, 1990. p.165-193.

SIQUEIRA, J.O. Fisiologia e bioquímica de micorrizas vesículo-arbusculares: alguns aspectos da relação fungo-planta e absorção de fósforo. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MICORRIZAS, 4, 1991, Mendes. **Anais**. Itaguaí: EMBRAPA-CNPBS, 1991. p.1-27.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo:** fundamentos e perspectivas. Lavras, MEC/ABEAS/ESAL, 1988. 235p.

SIQUEIRA, J.O.; PAULA, M.A. Efeito de micorrizas vesicular-arbusculares na nutrição e aproveitamento de fósforo pela soja em solo sob cerrado. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.10, n.2, p.97-102, 1986.

SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JúNIOR, O.J. Importance of mycorrhizae in low-fertility soils. In: DEUTSCH, J.A., ed. **Stress Physiology**. México, DF, CIMMYT, 1994. (In press).

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas naturais do estado de Minas Gerais. **Pesq. agropec. bras.**, v.24, n.12, p.1499-1506, 1989.

SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R.; NAIR, M.G. VA-mycorrhizae and mycorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. **Pl. Soil**, v.134, p.233-242, 1991b.

SIQUEIRA, J.O.; BROWN, D.J.; SAFIR, G.R.; NAIR, M.G. Field application of the VAM stimulating isoflavonoid formononetin (Rizotropinetin) on corn and soybean in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MANAGEMENT OF MYCORRHIZAS IN AGRICULTURE, HORTICULTURE AND FORESTRY, 1992, Perth. **Resumos**. Perth, University of Western Australia, 1992. p.31.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI FILHO, A. ; SAGGIN-JúNIOR, O.J.; GUIMARãES, P.T.C.; OLIVEIRA, E. Crescimento de mudas e produção do cafeeiro sob influência de fungos micorrízicos e superfosfato. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.17, n.1, p.53-60, 1993b.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A.; FARIA, F.H.S.; OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares para o algodoeiro. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.10, n.3, p.213-218, 1986.

SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M.G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.10, n.1, p.63-121, 1991a.

SIQUEIRA, J.O.; ROCHA-JÚNIOR, W.F.; OLIVEIRA, E.; COLOZZI-FILHO, A. The relationship between vesicular arbuscular mycorrhiza and lime: associated effect on growth and nutrition of Brachiaria grass (*Brachiaria decumbens*). **Biol. Fert. Soils**, v.10, p.65-71, 1990.

SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; GUIMARÃES, P.T.G. Ecology and application of VAM fungi in coffee crop in Brazil. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 9, 1993, Guelph. **Proceedings**. Guelph: University of Guelph, 1993a. p.78.

SILVA-JÚNIOR, J.P. **Efeito da formononetina (7-hidroxi, 4'-metoxi isoflavona) na micorrização, crescimento e nutrição do milho e soja**. Lavras: ESAL, 1993. (Tese de Mestrado).

SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; KOIDE, R.; CAIRNEY, J.W.G. Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. **Pl. Soil**, v.159, n.1, p.103-113, 1994.

SYLVIA, D.M.; JARSTFER, A.G. Production of inoculum and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. ed., **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p.231-238.

SYLVIA, D.M.; WILLIAMS, S.E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: **Mycorrhizae in Sustainable Agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1992. p.101-124.

THOMPSON, J.P. What is the potential for management of mycorrhizas in agricultureâ In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. ed., **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p.191-200.

TISDALL, J.M. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. **Pl. Soil**, v.159, n.1, p.115-121, 1994.

TRAPPE, J.M. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: SAFIR, G.R. ed., **Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants.** Boca Ratton: CRC, 1987. p.5-25.

TRAPPE, J.M.; BERCH, S.M. The prehistory of mycorrhizae: A. B. Frank's predecessors. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 6, Corvallis, 1985. **Proceedings.**. Corvallis: Forest Research Laboratory, 1985. p.2-11.

TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L. Micorrizas vesículo-arbusculares de culturas introduzidas em áreas de cerrado. **Rickia**, v.12, p.165-187, 1985.

WILSON, J.M.; TOMMERUP, I.C. Interactions between fungal symbionts: VA mycorrhizae. In: ALLEN, M.F. ed., **Mycorrhizal Functioning**. London: Chapman Hall, 1992. p.199-248.

YOST, R.S.; FOX, R.L. Contribution of mycorrhizae to the P nutrition of crops growing on an oxisol. **Agron. J.**, v.71, p.903-908, 1979.

CAPÍTULO 6

A BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO E SUA IMPORTÂNCIA NOS ECOSSISTEMAS TERRESTRES

David A. Wardle[1]
Mariangela Hungria[2]

6.1. Introdução

A biomassa microbiana do solo é definida como o componente microbiano vivo do solo e é composta de bactérias, fungos, microfauna e algas. O conceito de que, para determinados estudos, toda a população microbiana poderia ser tratada como um todo, foi proposto por Jenkinson (1966). Para se ter uma idéia da diversidade e quantidade de microrganismos, Ritz et al. (1994) citam que em apenas 1 cm^3 de solo sob pastagem pode conter milhões de bactérias, milhares de protozoários, centenas de metros de hifas de fungos, centenas de fungos, insetos e outros organismos maiores.

A biomassa microbiana é um componente crítico de todos os ecossistemas naturais ou manipulados pelo homem, porque é o agente regulador da taxa de decomposição da matéria orgânica e da ciclagem dos elementos (Jenkinson & Ladd, 1981), atuando, portanto, como fonte e dreno ("source" e "sink") dos nutrientes necessários ao crescimento das plantas (Ladd et al., 1985). Já foram constatadas relações estreitas entre a biomassa microbiana e a produtividade das plantas (Okano et al., 1987), taxa de amonificação (Holmes & Zak, 1994), taxa de decomposição de resíduos vegetais (Flannagan & Van Cleve, 1983) e a biomassa dos níveis tróficos superiores (Wardle, 1994a).

Desde o desenvolvimento da técnica de incubação-fumigação para quantificar a biomassa microbiana (Jenkinson & Powlson, 1976), o número de estudos sobre esse tema tem aumentado substancialmente, muitos dos quais relacionados ao desenvolvimento de metodologias para quantificar a biomassa, o que foi discutido recentemente por Kunc (1994), Powlson (1994) e Wardle (1994b).

Mais recentemente, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, os estudos sobre aspectos fisiológicos e genéticos da biomassa e sobre a diversidade da comunidade microbiana também têm sido intensificados. Em relação à diversidade bacteriana, por exemplo, Torsvik et al. (1994) observaram que, pela extração e análise do DNA das bactérias do solo, foi possível detectar uma diversidade cerca de duzentas vezes superior à encontrada nos estudos tradicionais de caracterização fenotípica *in vitro*. Outros métodos moleculares, como o uso de PCR ("polymerase chain reaction") e hibridização com seqüências 16S rRNA, foram recentemente compilados por Ritz et al. (1994).

Neste capítulo são abordados os principais aspectos ecológicos da biomassa microbiana, particularmente em relação à influência dos fatores ambientais bióticos e abióticos.

---

[1] Pesquisador, Ph.D., AgResearch Ruakura Agricultural Research Center, Private Bag 3123, Hamilton, New Zealand.
[2] Pesquisadora, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

6.2. Fatores Químicos

6.2.1. Teores de carbono e nitrogênio

A dinâmica da biomassa microbiana está estreitamente correlacionada à dinâmica da matéria orgânica do solo. A maioria dos sistemas naturais é fortemente limitada por nutrientes (Gottschal, 1990), o que faz com que os microrganismos tenham crescimento lento ou mesmo fiquem em estado dormente. Nessas condições, as células ficam estressadas e, durante longos períodos, pode ser constatada a ausência de replicação do cromossomo (Chesboro, 1990).

A biomassa microbiana responde rapidamente à adição de carbono (C) e nitrogênio (N) prontamente disponíveis (Nordgren, 1992), o que sugere que a maioria dos componentes da microflora está limitada pelo C e pelo N (Knapp et al., 1983; Cochran et al., 1988). A biomassa microbiana, entretanto, está mais freqüentemente relacionada ao N do que ao C do solo (Martens, 1987; van de Werf & Verstraete, 1987) e a proporção do C orgânico do solo imobilizado na biomassa microbiana (ou a relação C da biomassa:C orgânico) está freqüentemente correlacionada negativamente com a relação C:N no solo (Wardle, 1992). Os dados apresentados por Beare et al. (1990) demonstram que a biomassa microbiana na cobertura vegetal morta é correlacionada positivamente com o teor de N e negativamente com o teor de C dessa cobertura. Muitos estudos sobre a decomposição da cobertura vegetal morta mostraram que o N, e não o C, regula a atividade dos microrganismos decompositores e as taxas de decomposição (Swift et al., 1979; Taylor et al., 1989). Isso fica evidenciado, por exemplo, em um estudo sobre a decomposição de palha de trigo (*Triticum aestivum* L.) e de tremoço (*Lupinus albus* L.), conduzido no norte do Paraná, onde foi observado que a palha da leguminosa, com maior concentração inicial de N e menor relação C:N, resultou em uma taxa de mineralização líquida de 54 kg a 82 kg de $N.ha^{-1}$ em 130 dias, enquanto que a mineralização da palha de trigo foi de 13 kg a 47 kg de $N.ha^{-1}$ (Andrade et al., 1993b). Deve-se salientar, porém, que a importância do C e do N nos mecanismos regulatórios da atividade da biomassa microbiana pode variar substancialmente entre os diversos tipos de solo (Gallardo & Schlesinger, 1992; Wardle, 1992).

Fatores que alteram os teores de matéria orgânica do solo normalmente provocam também alterações na biomassa microbiana. Isso é particularmente evidente quando resíduos de plantas são adicionados ao solo (Sorenson, 1983; Dalal et al., 1991), ou quando ocorre um decréscimo no teor de matéria orgânica (West et al., 1986; Bonde et al., 1988).

A qualidade da matéria orgânica também é importante para estimular a biomassa microbiana e adições de resíduos de alta qualidade podem aumentar a relação C microbiano:C orgânico nos solos (Powlson et al., 1987; Saffigna et al., 1989). O C e N presentes na cobertura vegetal morta e nos compostos derivados da cobertura vegetal morta são, de um modo geral, aproveitados imediatamente pela biomassa microbiana, conforme tem sido demonstrado em estudos com isótopos (Amato & Ladd, 1980; Ladd et al., 1981; Ocio et al., 1991).

As relações entre a biomassa microbiana e o teor de N mineral do solo, ou mesmo a resposta à adição de N mineral no campo são contraditórias (Wardle, 1992). Alguns estudos chegam a mostrar um efeito negativo da adição de N na biomassa microbiana (Söderström et al., 1983; Ohtonen & Markkola, 1991), o que pode estar relacionado a um estímulo da nitrificação, aos efeitos negativos do íon nitrato na microflora (Verhaegen et al., 1988) ou, ainda, ao estímulo no crescimento da planta, resultando em maior competição entre a planta e os microrganismos por nutrientes.

Embora vários estudos tenham sido feitos para investigar a resposta da biomassa microbiana ao C e N da matéria orgânica, pouco se sabe sobre a resposta da biomassa microbiana a outros elementos, como o fósforo. A maioria dos estudos conduzidos investigou a resposta da biomassa microbiana à adição de fertilizantes contendo N e P, de modo que os efeitos não podem ser separados (Wardle, 1992). Os níveis de P limitam a biomassa microbiana em algumas situações, mas não em outras (Scheu, 1990), e a adição de P pode exercer efeitos estimulatórios (Biederbeck et al., 1984) ou neutros (Tate et al., 1991). Há evidências, também, de que a biomassa microbiana pode mostrar uma relação positiva com o teor de enxofre e potássio do solo (Lawrence & Germida, 1988).

Finalmente, parece haver concordância que a redução nos teores de C e N da matéria orgânica provoca um decréscimo no teor da biomassa microbiana. Áreas sob pastagem têm maior biomassa do que solos cultivados (Drury et al., 1991; Pfenning et al., 1992) e menor do que solos sob vegetação natural, como florestas (Ayanaba et al., 1976; Srivasava & Singh, 1991). A retirada de florestas pode resultar, a longo prazo, em efeitos negativos na biomassa microbiana (Luizou et al., 1992 ; Mazzarino et al., 1993).

Resultados encontrados no Brasil geralmente contrastam com os obtidos em regiões temperadas, apresentando maior ciclagem da biomassa. Desse modo, a queimada da vegetação natural reduz a biomassa microbiana (Fritze et al., 1993), tendo provocado uma queda de 87% no teor desta, conforme estudo conduzido na Região Amazônica (Pfenning et al., 1992). Na Região Sul do Brasil também foi constatado que reduções no teor de matéria orgânica causadas pelo cultivo do solo refletem na biomassa microbiana. No Paraná, a retirada da mata natural (**Figura 6.1**) ou do campo nativo no Rio Grande do Sul reduziu o teor de C e N do solo. Em apenas quatro anos foi constatado um decréscimo drástico no teor de biomassa microbiana no solo descoberto (**Figura 6.2**) e decréscimos menores, porém substanciais, quando o campo nativo foi substituido por guandu e milho (39%), siratro (33%), aveia e milho (47%), ou pangola (48%) (Cattelan & Vidor, 1990a,b).

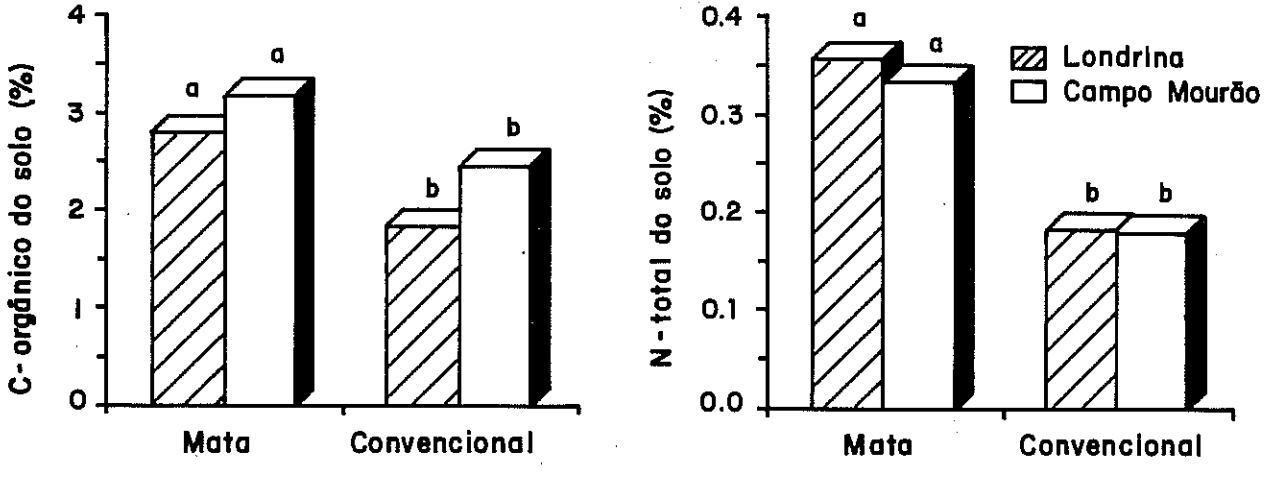


Figura 6.1. C-orgânico e N-total no solo, na camada de 0-10 cm, após sete anos e meio de cultivo em um LR eutrófico em Londrina, PR, e em um LR álico em Campo Mourão, PR. Letras indicam diferenças estatísticas no nível de 5%, pelo teste de Tukey, para cada local. Segundo Santos (1993).

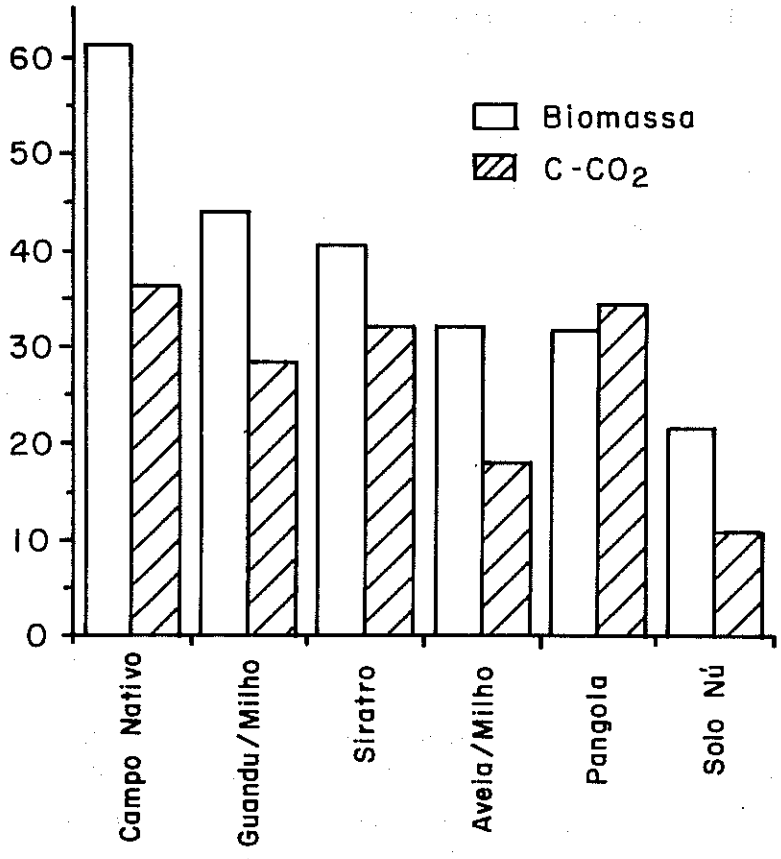


Figura 6.2. Biomassa microbiana, avaliada pelo método de fumigação-incubação (mg.100 g^{-1} solo), e atividade microbiana, estimada pela liberação de CO_2 do solo não-fumigado, durante 20 dias, em um PVE do Rio Grande do Sul, sob diferentes sistemas de cultivo. Avaliações realizadas na camada de 0-5 cm do solo. Valores médios de 12 épocas. Segundo Cattelan & Vidor (1990b).

Alguns sistemas de plantio também permitem teores mais elevados de matéria orgânica. Um exemplo típico é o do plantio direto em relação ao plantio convencional. No plantio convencional são utilizadas as operações de cultivo primário, com aração (arado de disco, aiveca ou escarificador), seguidas pelo cultivo secundário, com grade de disco pesada. A aração e gradagem podem, ainda, ser feitas em uma única operação, com uma grade de disco. Já no plantio direto, bastante utilizado no sul do Brasil, a semeadura é realizada sob resíduos da cultura anterior sem movimentação do solo, exceto na linha de semeadura, o que permite grande acúmulo de resíduos vegetais (**Figura 6.3**). Quando comparado ao plantio convencional, o plantio direto favorece o acúmulo de matéria orgânica (**Figura 6.4**) e a biomassa microbiana (**Figura 6.5**). Essa diferença observada na biomassa microbiana entre o plantio direto e convencional nos solos do Paraná é muito mais elevada do que as observadas em regiões temperadas, que ficam em torno de 10% a 20% (Wardle, 1992, 1994a).

Figura 6.3. Soja (*Glycine max* L. Merrill) sob o sistema de plantio direto, mostrando a cobertura morta com aveia preta (*Avena strigosa*). Cortesia de Dr. Eleno Torres (EMBRAPA-CNPSo).

Nesses estudos, porém, é difícil separar os efeitos diretos, da adição de C e N pela adição de matéria orgânica, dos efeitos indiretos, causados pelas menores variações de temperatura e umidade, fatores estes que estão diretamente relacionados à atividade da biomassa microbiana. A adição de 6,6 t de palha.ha^{-1} a um solo descoberto no Rio Grande do Sul, por exemplo, reduziu a temperatura máxima do solo de 38° C para 30° C (Morote et al., 1990). No Paraná, a temperatura máxima, a 3 cm em solo sob plantio direto, atingiu 36°C, enquanto que sob plantio convencional foi de 46°C, constatando-se , ainda, menor disponibilidade de água (Sidiras & Pavan, 1985). Essas diferenças na temperatura e umidade do solo podem ser responsáveis, em grande parte, pela redução do número de células de certos microrganismos do solo, como os fixadores de nitrogênio, fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (Voss & Sidiras, 1985; Andrade et al., 1993a), actinomicetos, solubilizadores de fosfato. Por outro lado, foram observados incrementos de 57% na proporção de esporos de bactérias, que são formas de resistência que aparecem sob condições de estresse (Cattelan & Vidor, 1990b).

6.2.2. Relações com as plantas

As plantas normalmente estimulam a biomassa microbiana, principalmente porque a rizosfera está constantemente exudando formas prontamente disponíveis de C e N (Smith & Paul, 1990), que são absorvidas pela microflora, o que fica evidenciado por estudos com isótopos (Bottner et al., 1984; Schnürer & Rosswall, 1987).

Esse padrão de estímulo, entretanto, não é universal, e as plantas às vezes reduzem a biomassa, provavelmente pela competição por nutrientes com as raízes (Okano et al., 1991), como mostra a **Figura 6.6**. Foi sugerido, ainda, que as plantas podem estimular ou inibir a biomassa, dependendo de qual força for determinante, o estímulo da rizosfera ou a imobilização (van Veen et al., 1989).

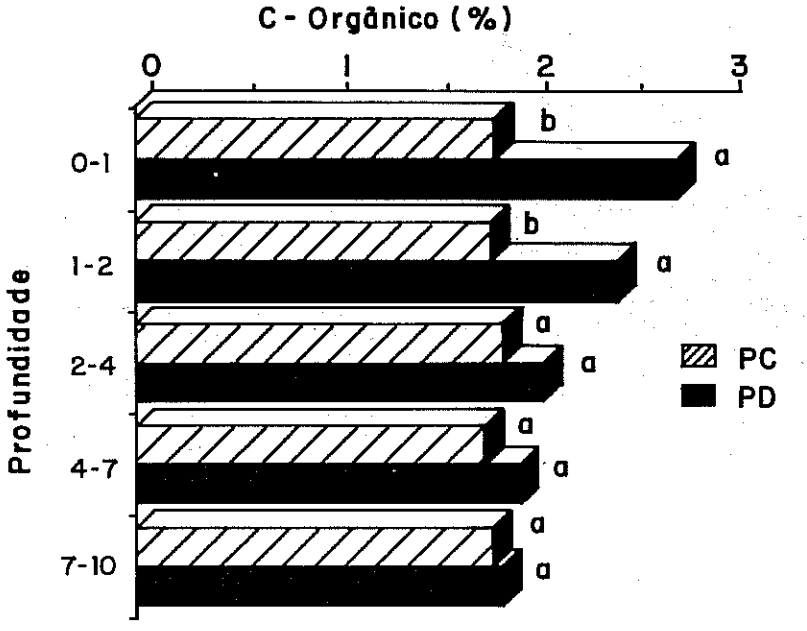


Figura 6.4. Carbono orgânico em um LR eutrófico, após sete anos e meio de cultivo, sob plantio direto ou convencional na região de Londrina, PR. Médias de quatro repetições seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, no nível de 5% pelo teste de Tukey entre os sistemas em cada profundidade. Segundo Santos (1993).

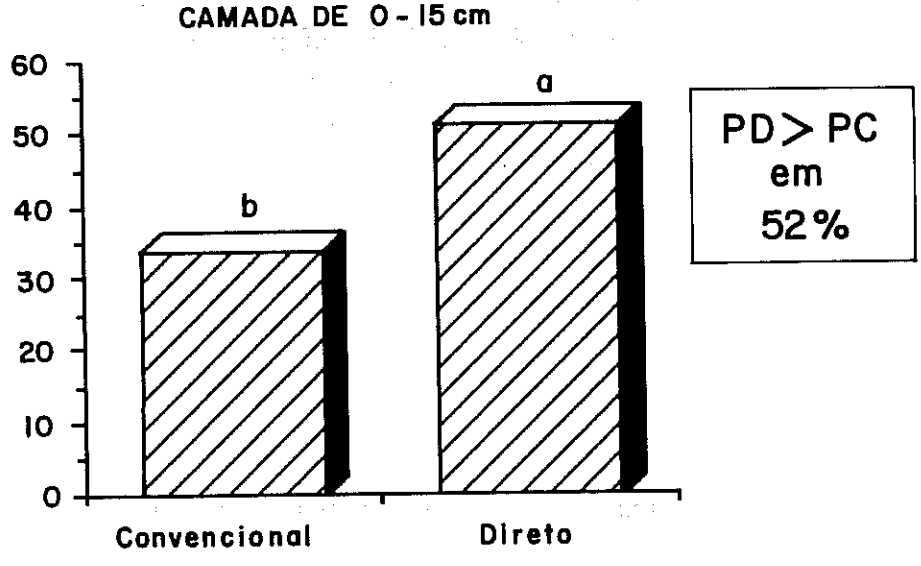


Figura 6.5. Biomassa microbiana em um LR, sob plantio convencional ou direto. A biomassa foi expressa pelo teor de N ($\mu g\ N.g^{-1}$ de solo seco) e avaliada pelo método de fumigação com clorofórmio e extração com sulfato de potássio (0,25 M). Médias de sete coletas realizadas durante 14 meses, cujos valores diferiram estatisticamente no nível de 5% pelo teste de Tukey. Segundo Andrade et al. (1993a).

Como as plantas regulam a fonte de nutrientes para os microrganismos e contribuem qualitativa e quantitativamente para o acúmulo de matéria orgânica, a natureza da comunidade vegetal é muito importante. Conseqüentemente, os estudos sobre sucessão de plantas normalmente mostram padrões previsíveis de acúmulo de biomassa, pelo menos nos estádios iniciais (Halvorson et al., 1991; Fenn et al., 1993). Essas mudanças são, quase que certamente, relacionadas às limitações de C e N (Zak et al., 1990; Bosatta & Ágren, 1994) e, nos estádios posteriores, possivelmente devido ao P (Scheu, 1990). Flutuações temporais da biomassa microbiana também são menores nos sistemas posteriores de sucessão (Santruckova, 1992), sugerindo que a dinâmica da biomassa microbiana estabiliza à medida que o ecossistema desenvolve.

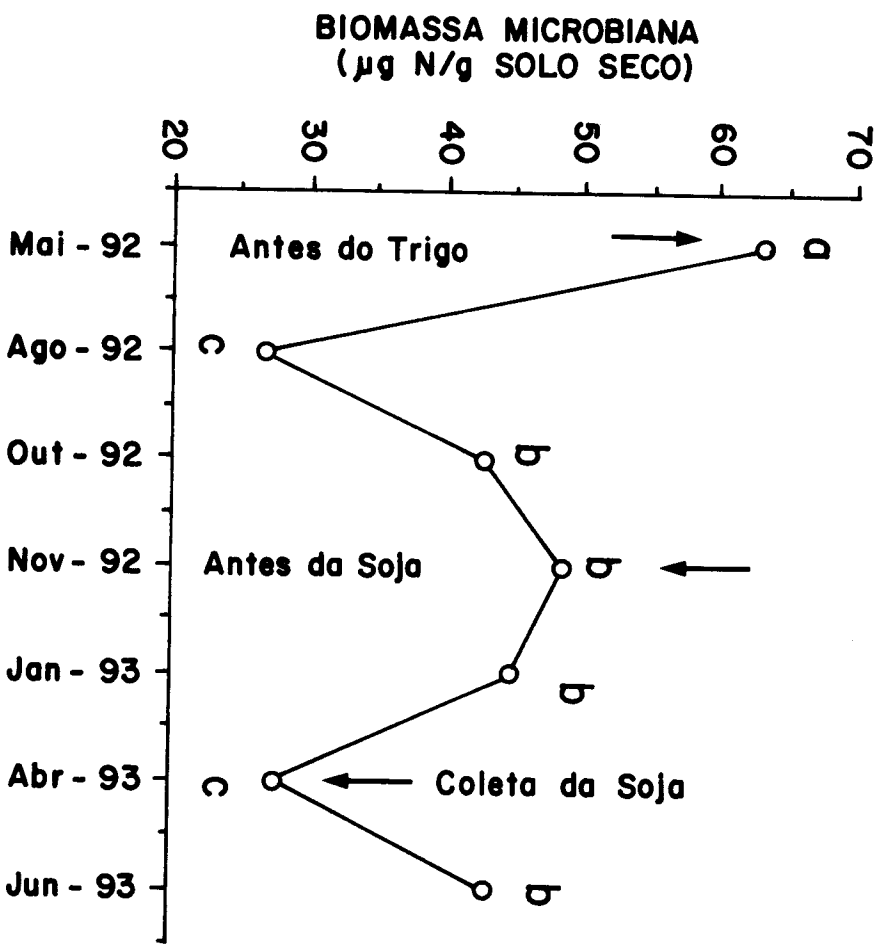


Figura 6.6. Teor de biomassa microbiana, avaliada pelo método de fumigação-incubação, durante um ano agrícola de plantio de soja e trigo, em um LR do Paraná. Segundo Andrade et al. (1993a).

As espécies de plantas têm grande influência na biomassa microbiana e, de um modo geral, plantas de espécies diferentes em um mesmo solo resultam em níveis diferentes de biomassa microbiana (Drury et al., 1991; Sparling et al., 1992), o que normalmente resulta de diferenças qualitativas e quantitativas na adição de matéria orgânica ao solo. Os sistemas de rotação e sucessão de culturas influenciam a população microbiana pela presença de determinadas espécies de plantas. Nos sistemas de rotação com soja/milho/trigo e sucessão milho/trigo e soja/ trigo, os microrganismos foram favorecidos pela presença da leguminosa (Andrade et al., 1993a; Colozzi-Filho et al., 1993). Resultados semelhantes foram observados no consórcio de feijão e milho e na monocultura do feijão em relação à do milho (Andrade et al., 1993c). Anderson & Domsch (1989) também observaram que as rotações de cultura podem estimular a biomassa microbiana e a relação C da biomassa:C orgânico, indicando provavelmente maior diversidade dos microhabitats do solo devido à maior variabilidade nos tipos de tecido. De fato, Andrade et al. (1993c) constataram que com o consórcio milho/feijão as espécies de fungos MVA e de *Rhizobium* foram mais numerosas nos solos que na monocultura com milho. Essa riqueza de comunidades vegetais em sistemas agrícolas parece exercer efeitos pronunciados na dinâmica da biomassa microbiana, implicando geralmente em incremento no teor e maior biodiversidade (Wardle & Nicholson, dados não publicados). Com certeza, parte dos resultados citados no item anterior, sobre diferenças na biomassa microbiana com diferentes coberturas de solo, resulta também da diversidade de espécies vegetais (Wardle, 1992).

6.2.3. pH do solo

A biomassa microbiana é normalmente relacionada positivamente com o pH do solo (Wardle, 1992). Em alguns locais, entretanto, a biomassa dos solos ácidos é bem adaptada às condições ácidas (Nioh et al., 1993). Embora a acidificação freqüentemente exerça efeitos negativos na biomassa microbiana, o grau de inibição é bastante variável. Em algumas situações, a biomassa só é inibida quando o pH atinge valores muito baixos, como 2,0 e 3,0 (Baath et al., 1979). A importância do aumento do pH no incremento da biomassa microbiana também foi demonstrada pela adição de calcário (von Lützow et al., 1993; Smolander & Malkonen, 1994). Entretanto, embora a calagem inicialmente estimule a biomassa microbiana, segundo Andrade et al.(1994), após um valor determinado do pH começa a ocorrer inibição (**Figura 6.7**) . Ao reexaminar dados de literatura, Wardle (1992) encontrou que, na análise da variação espacial da biomassa microbiana, o efeito do pH é geralmente menos importante do que o teor de C ou N, mas que o pH apresenta importância semelhante a do C e N quando a variação espacial da relação C:N é considerada.

Um fator relacionado ao baixo pH é o aumento no teor de alumínio, que pode ser tóxico aos microrganismos do solo. A biomassa em solos sob vegetação (com eucalípto, por exemplo) foi inferior a das amostras de solo sob mata nativa, o que foi explicado pelo menor teor de alumínio neste último solo (Della Bruna et al., 1991).

6.2.4. Metais pesados e pesticidas

Os metais pesados podem influenciar fortemente a biomassa microbiana, sendo bastante importante quando a contaminação ocorre de um modo contínuo por vários anos (Brookes & McGrathm, 1984). Como exemplo, tem-se que a biomassa microbiana é afetada por altos níveis de cobre, poden-

do-se observar que a relação C:N da biomassa é reduzida nas proximidades das minas de cobre (Bååth et al., 1991). Os fungicidas freqüentemente exercem efeito inibitório nos componentes fúngicos da biomassa microbiana (Anderson et al., 1981), mas os herbicidas tendem a exercer efeitos variáveis, geralmente de menor importância e intensidade, quando comparados com a variação espacial e temporal da biomassa microbiana (Wardle & Parkinson, 1991). São poucos os relatos confiáveis que demonstram que quando os herbicidas foram aplicados em concentrações realistas afetaram a biomassa microbiana. Muitos estudos que relataram efeitos inibitórios de herbicidas em nível de campo estavam provavelmente avaliando os efeitos indiretos pela alteração da cobertura vegetal (Wardle, 1994a).

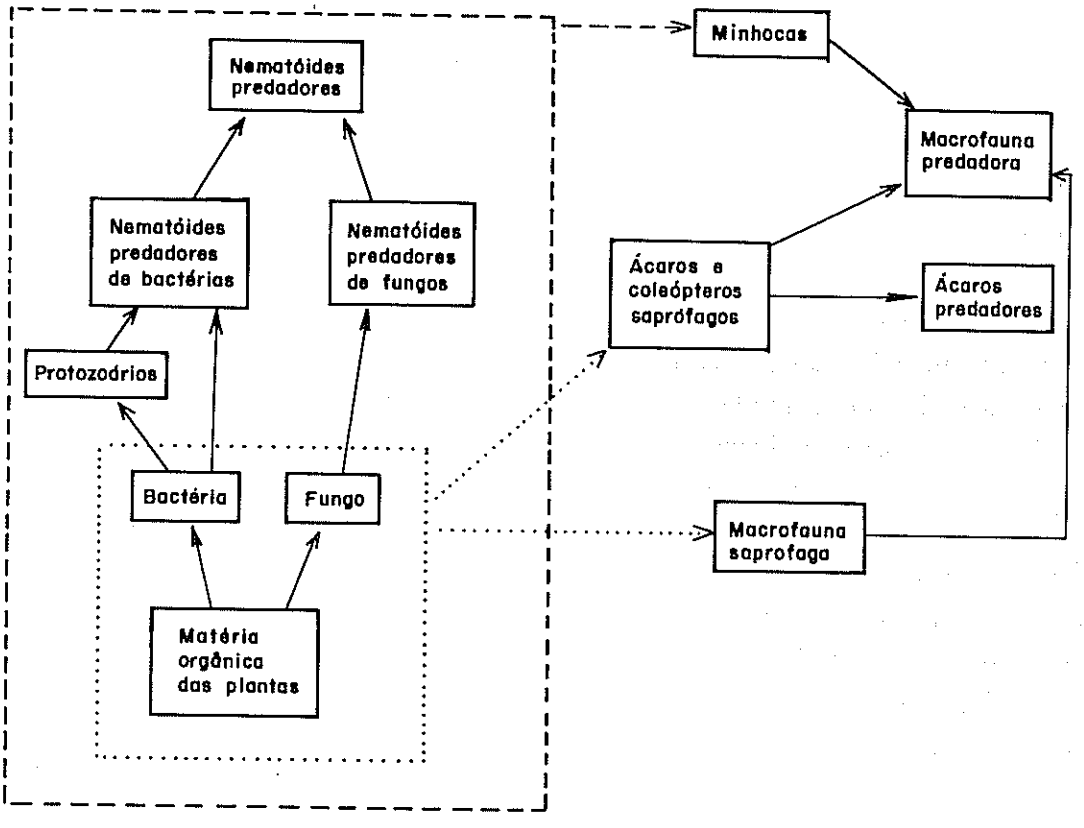


Figura 6.7. Relações entre a biomassa microbiana do solo (bactérias e fungos) e outros componentes da biota do solo.

6.3. Fatores Físicos do Solo

6.3.1. Textura

A textura do solo exerce efeitos importantes na biomassa microbiana, e um teor elevado de argila estimula a manutenção da biomassa. Isso provavelmente ocorre porque a argila aumenta a absorção dos produtos orgânicos e nutrientes, serve como tampão às mudanças de pH e protege os microrganismos contra predadores (Smith & Paul, 1990). Na Amazônia, por exemplo, a biomassa microbiana foi avaliada em 817μg $C.g^{-1}$ de solo na camada superficial de um latossolo amarelo muito argiloso sob mata natural, enquanto que em outro latossolo, com menor teor de argila, o acúmulo foi de 463 μg $C.g^{-1}$ de solo (Pfenning et al., 1992). Recalculando diversos dados de literatura, Wardle

(1992) demonstrou que, de um modo geral, a biomassa microbiana, mas não a relação C da biomassa:C orgânico, é fortemente correlacionada com o teor de argila no solo. Este resultado sugere que o principal papel da argila no estímulo da biomassa microbiana está relacionado à sua habilidade de reter C e N orgânicos.

6.3.2. Estrutura

A biomassa microbiana do solo também é alterada pela estrutura do solo e, com o aumento no tamanho e estabilidade dos agregados, geralmente ocorre um incremento no teor da biomassa (Drury et al., 1991; Carter & Mele, 1992). Em sistemas de cultivo onde as práticas de preparo do solo são minimizadas, a estabilidade dos agregados do solo aumenta. Quando o sistema convencional foi comparado com o plantio direto em solos do Paraná, o último favoreceu a estabilidade dos agregados, avaliada pela maior proporção de agregados maiores do que 4 mm e maior diâmetro médio geométrico das partículas (Santos, 1993). Essas condições do plantio direto favorecem o desenvolvimento de hifas de fungos (Hendrix et al., 1986) e, aparentemente, existe um mecanismo de retroalimentação entre a estrutura do solo e a formação de cadeias de hifas de fungos.

6.4. Microclima do Solo

Normalmente a biomassa microbiana declina rapidamente com a secagem do solo e aumenta com a recuperação do teor de umidade. Estudos com isótopos indicam que uma proporção significativa do C e N da biomassa microbiana pode ser liberada durante os ciclos de secagem e umedecimento (Marumoto et al., 1982). Contudo, existem alguns relatos de relações negativas entre a biomassa e a umidade do solo, que ocorreram pelo estímulo de predadores sob alta umidade (Flanagan & van Cleve, 1977) ou morte das raízes durante longos períodos de seca, que estimulam o crescimento de fungos tolerantes (Ross et al., 1984). Outros estudos que detectaram relações negativas ou aleatórias entre a biomassa microbiana e a umidade do solo provavelmente indicam problemas metodológicos, ou mesmo que as avaliações da biomassa microbiana variam com os gradientes de umidade do solo (Wardle & Parkinson, 1990).

A biomassa microbiana é composta de diversas espécies, que apresentam diferentes graus de suscetibilidade à secagem. Além disso, a biomassa microbiana em solos submetidos a ciclos freqüentes de secagem e umedecimento é, de um modo geral, mais resistente à deficiência hídrica do que a biomassa de solos que não passam por ciclos de umidade (Sparling et al., 1981). As condições de seca reduzem a disponibilidade de solutos e, portanto, é razoável assumir que os microrganismos adaptados à seca sejam tolerantes a períodos longos sem nutrientes (Rosacker & Kief, 1990). Por outro lado, o metabolismo anaeróbio é menos ativo do que o aeróbio e, provavelmente por isso, a biomassa de solos continuamente alagados é inferior a dos solos com boa aeração. Em um solo de várzea na Amazônia, a biomassa foi duas a três vezes inferior a do solo com boa aeração (Pfenning et al., 1992).

A temperatura do solo também afeta a biomassa microbiana, embora não se tenha um entendimento perfeito sobre os processos envolvidos. Temperaturas elevadas podem encorajar a atividade microbiana com a conseqüente deficiência de substrato, resultando no declínio da biomassa microbiana (Joergensen et al., 1990). Entretanto, a biomassa microbiana mostra relações variáveis com a temperatura, o que está presumivelmente relacionado com a temperatura ótima das espécies presentes em um

determinado sistema (Wardle, 1992). Ciclos de congelamento e descongelamento podem ser importantes na ciclagem microbiana, uma vez que o descongelamento é rapidamente seguido por crescimento microbiano, auxiliado, ainda que parcialmente, pela disponibilidade de substrato (Flanagan & van Cleve, 1983).

As flutuações na biomassa microbiana são governadas, pelo menos em parte, pela umidade e temperatura do solo. É razoável, portanto, esperar variações sazonais elevadas no teor de biomassa microbiana em locais onde as diferenças climáticas entre as estações do ano sejam grandes e, como exemplo, Flanagan & van Cleve (1977) e Cochran et al. (1989) citam as áreas subpolar e boreal e Singh et al. (1989) as áreas com estações úmidas e secas pronunciadas. No caso da comparação entre o plantio direto e o plantio convencional, certamente grande parte do efeito positivo do primeiro sistema na biomassa microbiana (Andrade et al., 1993a) se deve às menores variações da umidade e temperatura do solo (Sidiras & Pavan, 1985). Wardle (1992) identificou, através da análise de dados da literatura, quatro respostas da biomassa microbiana às variações sazonais, que foram denominadas de: 1) resposta positiva ao aumento no teor de umidade do solo; 2) resposta negativa ao aumento no teor de umidade; 3) resposta positiva ao aumento na temperatura; e 4) resposta positiva à produção de raízes. As respostas da biomassa às mudanças sazonais são importantes nos estudos de modelagem utilizados para prever a ciclagem microbiana. Segundo esses modelos, a ciclagem é mais rápida em climas quentes (que freqüentemente apresentam menor variação entre as estações. Contudo, admite-se que a ciclagem microbiana em climas mais frios, com extremos de temperatura durante o ano, possa ser maior do que se acredita.

6.5. Interações Tróficas

A biomassa microbiana não é um componente isolado no sistema do solo; ao contrário, interage estreitamente com muitos outros componentes. Bactérias e fungos ocupam um nível trófico intermediário na rede de decomposição alimentar, onde são dependentes da disponibilidade de recursos providos por níveis tróficos inferiores (principalmente plantas, como discutido anteriormente) e também por níveis tróficos mais elevados (ex. nematóides, protozoários, ácaros, colêmbolos). A posição trófica da biomassa microbiana é mostrada na **Figura 6.7**. As massas fúngicas e bacterianas são, portanto, aparentemente influenciadas pela dinâmica de qualquer um dos grupos com os quais interagem.

6.5.1. Protozoários e nematóides

A estimulação da microflora do solo, pela adição de substrato, por exemplo, parece induzir um aumento na macrofauna associada (nematóides, protozoários). Mas esse incremento na macrofauna pode, por outro lado, causar uma supressão da microflora através da pressão alimentar e pressão física (Clarholm, 1984). Isto parece ocorrer mais com bactérias do que com fungos, e qualquer aumento potencial das bactérias induzido por retorno de matéria orgânica ou efeitos da rizosfera parece ser anulado por essas pressões dos protozoários e nematóides (Ingham et al., 1986). As bactérias são usualmente consumidas ao acaso e menos adaptadas do que os fungos em suportar a pressão da macrofauna do solo. Os fungos possuem uma gama de adaptações, tanto morfológicas como químicas, na competição com protozoários e nematóides, e embora a biomassa fúngica às vezes seja reduzida (Wasilewska et al., 1975), os efeitos não são usualmente severos. Aparentemente, portanto, a biomassa

bacteriana é regulada por forças "de cima para baixo" (pela macrofauna, por exemplo), enquanto que os fungos são regulados "de baixo para cima", ou seja, pela disponibilidade de substratos e níveis de matéria orgânica (Wardle & Yeates, 1993; Wardle, 1994a). As interações entre a microfauna e a biomassa microbiana (principalmente bactérias) incrementam a ciclagem microbiana, que tem implicações importantes para intensificar a disponibilidade de nutrientes (Bouwman et al., 1994) e o crescimento das plantas (Ingham et al., 1985).

6.5.2. Ácaros e colêmbolos

Os colêmbolos (ordem Collembola) e muitas espécies de ácaros são "saprófagos", significando que se alimentam de restos de vegetais e de hifas fúngicas que crescem através deles. Muitas espécies se alimentam seletivamente sobre hifas fúngicas presentes na superfície dos restos vegetais. Na verdade, quando os ácaros e colêmbolos se alimentam de fungos, isso é benéfico para os fungos do solo, provavelmente resultando em estímulo ao crescimento das hifas, o que ocorre pela remoção de hifas senescentes, pela transformação de resíduos e pelo estímulo à dispersão (Visser, 1985). Um crescimento compensatório considerável dos fungos pode ser constatado se ocorrer um grau elevado de fragmentação do habitat pelos colêmbolos (Bengtsson et al., 1993). A biomassa fúngica e a produtividade são, freqüentemente, maximizadas na presença de uma população intermediária de microartrópodes, mas em solos com alta intensidade geralmente ocorre supressão da biomassa fúngica (Hanlon, 1981). O aumento da massa fúngica e a liberação de nutrientes, causados por uma população intermediária de microartrópodes do solo, podem resultar em uma importante contribuição à mineralização da matéria orgânica do solo e dos restos culturais (Seastadt, 1984).

6.5.3. Macrofauna

O grupo mais conhecido e estudado da macrofauna é o das oligoquetas terrestres (minhocas). A influência das oligoquetas sobre os microrganismos resulta da modificação do material ingerido por elas ao passar pelo trato intestinal. Dejetos das oligoquetas contêm conjuntos modificados de microrganismos, e as bactérias tendem a ser intensificadas, provavelmente às custas dos fungos (Daniel & Anderson, 1992). Isto acontece, possivelmente, porque as oligoquetas estimulam alguns microrganismos através da modificação da natureza química e física do seu ambiente e, simultaneamente, pela digestão de outros microrganismos, principalmente fungos (Edwards & Fletcher, 1988). O resultado é que a composição da massa microbiana é alterada, enquanto que a biomassa total geralmente não é afetada (Scheu, 1990, 1994). As oligoquetas podem também ter efeito indireto na microflora do solo, pelo incremento da infiltração, revolvimento de restos culturais para camadas profundas e intensificação da produtividade das plantas (Wardle, 1994a).

Outros grupos da macroflora podem, potencialmente, exercer efeitos importantes na biomassa microbiana, embora isto tenha sido pouco estudado. A macrofauna saprófago (por exemplo, miriápodes, besouros, formigas, cupins) pode ser extremamente abundante em alguns ecossistemas, e a passagem de materiais através de seus tratos intestinais pode ter efeitos diretos e importantes na microflora do solo (Anderson et al., 1983; Wolters, 1989). A macrofauna predatória (por exemplo, aranhas, carabídeos, estafilinídeos) pode estimular a biomassa microbiana ao se alimentar daqueles organismos que consomem microrganismos (Kajak et al., 1993; Wardle, 1994a).

6.6. Distribuição Global da Biomassa Microbiana

Enquanto a maioria dos estudos fica concentrada na investigação da biomassa microbiana em um escala geográfica relativamente estreita, as diferenças entre os ecossistemas só podem ser avaliadas se for utilizada uma escala geográfica mais ampla. Para avaliar os fatores que influenciam a biomassa microbiana em uma escala global, Wardle (1992) recalculou os valores de C e N da biomassa encontrados em 112 trabalhos (listados no apêndice I de Wardle, 1992). Esses estudos foram realizados desde a região polar até os trópicos, e a sua análise foi realizada com a finalidade de relacionar a biomassa do solo com as propriedades físicas e químicas do solo e com o macroclima. Nessa análise, o C e o N da biomassa microbiana foram fortemente correlacionados com os níveis de C e N em florestas, solos cultivados e pastagens. Esses efeitos foram mais fortes do que os efeitos relacionados ao macroclima. A biomassa foi positivamente relacionada ao pH somente nos solos cultivados, não apresentando correlação com a relação C:N. Entretanto, quando se considerou a relação C microbiano:C orgânico, relações negativas foram encontradas com a relação C:N do solo, enquanto que as relações com o pH foram positivas, particularmente em ecossistemas florestais.

Em bases globais, o C da biomassa microbiana foi negativamente correlacionado com a temperatura do mês mais frio em solos cultivados, pastagens ou solos orgânicos de floresta, mas não em solos minerais de florestas. Essa relação negativa parece estar relacionada com a maior atividade microbiana em climas quentes, resultando em perda de matéria orgânica do solo e, portanto, reduzindo a fonte de sustentação da biomassa. A precipitação anual não mostrou uma correlação consistente com a biomassa microbiana. A relação C microbiano:C orgânico foi independente do macroclima, exceto nas florestas, onde foi encontrada uma relação positiva com a temperatura do mês mais frio. Os resultados dessa análise, portanto, sugerem que a biomassa microbiana, em uma escala global, é influenciada primariamente pela "qualidade" do solo, e que os efeitos macroclimáticos são secundários. Isto ocorre porque os microrganismos são geralmente adaptados ao clima de sua área geográfica, provavelmente porque evoluíram nesse ambiente.

Quando esses 112 estudos foram classificados em grupos de ecossistemas, observaram-se diferenças entre os ecossistemas (**Tabela 6.1**). A biomassa microbiana em florestas tropicais imobiliza uma proporção maior de C orgânico total do que em florestas temperadas, especialmente de coníferas; isso, porém, não ocorre em relação ao nitrogênio. Esse padrão parece não ocorrer também em solos cultivados, mas são necessários mais estudos, particularmente nas regiões tropicais, para confirmar essa premissa. Em solos cultivados, os níveis de C e N da biomassa microbiana também são menores do que nos solos sob floresta ou pastagem, mas a proporção entre o C orgânico no solo e o N na biomassa microbiana não é menor, indicando que a conversão de sistemas naturais (ou perenes) em sistemas cultivados reduz a biomassa microbiana, particularmente pela redução dos níveis totais de matéria orgânica do solo.

Os dados na **Tabela 6.1** podem ser usados para fornecer uma medida aproximada do C e N imobilizados na biomassa microbiana. Tal informação é de interesse nos estudos sobre a contribuição dos microrganismos nos ciclos do C e N (Smith & Paul, 1990). Quando esses dados são combinados com os dados globais de C e N fornecidos por Smith & Paul (1990) e Anderson (1991), as estimativas do C e N globais na biomassa microbiana, em Gt (onde: 1 Gt = 10 15 g) são: florestas tropicais (C = 3,68, N = 0,43); floresta boreal conífera (C = 1,82, N = 0,25); floresta temperada (C = 1,48, N =

0,20); savana (C = 3,73, N = 0,38); pastagem temperada (C = 3,03, N = 0,48); e tundra (C = 0,18, N = 0,03). Essas figuras sugerem que as massas de C e N globais que estão alocadas na biomassa microbiana são de, respectivamente, 13,9 Gt e 1,83 Gt, representando 1,4 % e 2,8%, respectivamente, do C e N armazenados na Terra.

Tabela 6.1. Valores médios do C (C mic) e do N (N mic) da biomassa microbiana e da relação C mic:C orgânico total do solo (C org) e N total do solo (N tot) em uma série de ecossistemas, resultantes de uma revisão de 112 estudos. Modificado de Wardle (1992).

Ecossistema	**C mic** ($\mu gC.g^{-1}$ solo)	**C mic.(C org)$^{-1}$** (x 100)	**N mic** ($\mu gN.g^{-1}$ solo)	**N mic.(N total)$^{-1}$** (x 100)
Floresta tropical úmida	986	1,99	100	4,41
Floresta tropical seca	653	3,21	65	3,44
Floresta temperada (angiosperma)	877	1,43	93	3,19
Floresta temperada (conífera)	736	0,93	-	-
Pastagem tropical	342	2,87	35	4,24
pastagem temperada	1011	2,04	170	3,66
Terra cultivada tropical	240	1,96	48	3,99
Terra cultivada climas amenos	331	2,47	47	2,73
Terra cultivada climas frios	461	2,68	66	3,32

Relativamente, pouco se sabe sobre o tempo de ciclagem da biomassa microbiana, mas as estimativas variam de alguns meses (Smith & Paul, 1990) a até dois anos (Jenkinson & Ladd, 1981). Se for assumido que esse tempo é de um ano e que a Terra é um sistema estável, a contribuição da decomposição dos tecidos microbianos no CO_2 atmosférico global é de cerca de 65 ppm (se 1 Gt = 0,47 ppm), ou 2,2 % dos níveis globais de C-CO_2. Isso sugere que a biomassa microbiana tem uma contribuição razoável nas entradas de CO_2 atmosférico, sendo aproximadamente igual a 50% do CO_2

proveniente da decomposição mundial (Smith & Paul, 1990). Deve-se salientar, ainda, que os outros 50% estão também relacionados com a atividade microbiana, embora não entrem diretamente na formação da biomassa, mas que são gerados pela ineficiência microbiana durante a síntese e manutenção dos microrganismos.

6.7. Significado das Estimativas da Biomassa Microbiana

Enquanto a biomassa microbiana fornece uma indicação da quantidade de nutrientes imobilizados nos compartimentos lábeis da matéria orgânica do solo, as avaliações da biomassa, sem a associação a outros dados, não informam sobre a atividade biológica dos solos, decomposição ou ciclagem de nutrientes (Jenkinson, 1988). As avaliações da biomassa microbiana são mais úteis, portanto, quando combinadas com outros componentes do solo, como nos estudos sobre interação trófica (Andren et al., 1990), ecossistemas (Flanagan & van Cleve, 1983), atividade do solo (Nordgren, 1992), produtividade primária (Jenkinson et al., 1992) ou em conjunto com outras avaliações sobre estresses e alterações ecológicas. Informações úteis também podem ser obtidas pela avaliação da biomassa microbiana em diferentes épocas do ano, desde que essa é um indicativo dos fluxos de nutrientes que podem ocorrer, e como eles interagem com o crescimento das plantas. Como exemplo, Singh et al. (1989) encontraram que, em florestas tropicais secas, o declínio na liberação de nutrientes devido às variações sazonais coincidiu com o período em que a absorção de nutrientes pelas plantas era máxima. Resultados semelhantes foram encontrados no Brasil, conforme discutido anteriormente (**Figura 6.6**). Há evidências, também, de que somente parte da biomassa microbiana é ativa (van de Werf & Verstraete, 1987).

Como conclusão, pode-se dizer que a biomassa microbiana varia consideravelmente em termos temporais e espaciais, determinados por fatores abióticos e bióticos. O desafio para o futuro será determinar as conseqüências diretas dessas variações nos ecossistemas e na produtividade dos sistemas agrícolas auto-sustentáveis.

6.8. Referências Bibliográficas

AMATO, M.; LADD, J.N. Studies of nitrogen immobilisation and mineralisation in calcareous soils. V. Formation and distribution of isotope-labelled biomass during decomposition of ^{14}C and ^{15}N-labelled plant material. **Soil Biol. Biochem.**, v.12, p. 405-411, 1980.

ANDERSON, J.M. The effects of climate change on decomposition processes in grassland and coniferous forest. **Ecol. Applic.**, v.1, p. 326-347, 1991.

ANDERSON, J.M.; INESON, P.; HUISH, S.A. Nitrogen and cation mobilisation by soil fauna feeding on leaf and soil organic matter from deciduous woodlands. **Soil Biol. Biochem.**, v.15, p. 463-467, 1983.

ANDERSON, J.P.E.; ARMSTRONG, R.A.; SMITH, S.N.. Methods to evaluate pesticide damage to the biomass of soil microflora. **Soil Biol. Biochem.**, v.13, p. 149-153, 1981.

ANDERSON, T. H., DOMSCH, K.M. Ratio of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.21, p. 471-479, 1989.

ANDRADE, D.S.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; HUNGRIA, M. População microbiana em solos sob plantio direto ou convencional com soja, milho e trigo. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO SOBRE PLANTIO DIRETO NA PEQUENA PROPRIEDADE, 1, 1993, Ponta Grossa. **Resumos**. Ponta Grossa: IAPAR, 1993a. p. 23.

ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; MEDEIROS, G.B.. Decomposição da palha de inverno em solos sob plantio direto e convencional. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO SOBRE PLANTIO DIRETO NA PEQUENA PROPRIEDADE, 1, 1993, Ponta Grossa. **Resumos.** Ponta Grossa: IAPAR, 1993b. p. 24.

ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; HUNGRIA, M. Interação entre microrganismos do solo e feijão em monocultura ou consórcio. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4, 1993, Londrina. **Resumos.** Londrina: IAPAR, 1993c. p. 129.

ANDRADE, D.S.; PAVAN, M.A.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; CHAVES, J.C.D. Relacões entre microbiota e calagem em solo cultivado com cafeeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos.** Londrina: IAPAR, 1994. p.150.

ANDREN, O.; LINDBERG, T.; PAUSTIAN, K.; ROSSWALL, T. **Ecology of Arable Land.** Copenhagen: Ecological Bulletins, 1990.

AYANABA, A.; TUCKWELL, S.B.; JENKINSON, D.S. The effects of clearing and cropping on the organic reserves and biomass of tropical forest soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.8, p. 519-525, 1976.

BÅÅTH, E.; ARNEBRANT, K.; NORDGREN, A. Microbial biomass and ATP in smelter-polluted forest humus. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.47, p. 278-282, 1991.

BÅÅTH, E.; LUNDGREN, B.; SÖDERSTRÖM, B. Effects of artificial acid rain on microbial activity and biomass. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.23, p. 737-740, 1979.

BEARE, M.H.; NEELY, C.L.; COLEMAN, D.C.; HARGROVE, W.L. A substrate-induced respiration (SIR) method for measurement of bacterial and fungal biomass on plant residues. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p. 585-594, 1990.

BENGTSSON, G.; HEDLUND, K.; RUNDGREN, S. Patchiness and compensatory growth in a fungus-Collembola system. **Oecologia**, v.93, p. 295-302, 1993.

BIEDERBECK, V.O.; CAMPBELL, C.A.; ZENTHEN, R.P. Effect of crop rotation and fertilisation on some biological properties of a loam in Southwestern Saskatchewan. **Can. J.. Soil Sci.**, . v.64, p. 355-367, 1984.

BONDE, T.A., SCHNURER, J.; ROSSWALL, T. Microbial biomass as a fraction of potentially mineralisable nitrogen in soils from a long-term experiment. **Soil Biol. Biochem.**, v.20, p. 447-452, 1988.

BOSATTA, E.; ÁGREN, G.I . Theoretical analysis of microbial biomass dynamics in soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.26, p. 143-148, 1994.

BOTTNER, P.; MNEIMNE, Z.; BILLES, G. Response de la biomasse microbienne a l'adjonction au sol de matériel végétal marque au 14C: role des racines vivantes. **Soil Biol. Biochem.**, v.16, p. 305-314, 1984.

BOUWMAN, L.A.; BLOEM, J.; van den BOOGERT, P.H.J.F.; HOENDERBOOM, G.H.J.; de RUITER, P.C. Short term and long term effects of bacterivorous nematodes and nematophogous fungi on carbon and nitrogen mineralisation in microcosms. **Biol. Fertil. Soils,** v.17, p. 249-256, 1994.

BROOKES, P.C.; Mc GRATH, S. P. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. **J. Soil Sci.**, v.35, p. 341-346, 1984.

CARTER, M.R.; MELE, P.M. Changes in microbial biomass and structural stability at the surface of a duplex soil under direct drilling and stubble retention in north-eastern Victoria. **Aust. J. Soil Res.**, v.30, p. 493-503, 1992.

CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.14, p. 125-132, 1990a.

CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e populacão microbiana do solo em funcão de variações ambientais. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.14, p. 133-142, 1990b.

CHESBORO, W.; ARBIDGE, M.; EIFFERT, F. When nutrient limitation places bacteria in the domains of slow growth: Methabolic, morphologic and cell cycle behaviour. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 74, p. 103-120, 1990.

CLARHOLM, M. Heterotrophic, free living protozoa: neglected micro-organisms with an important task in regulating bacterial populations. In: KLUG, M.J.; REDDY, C.A.,ed. **Current Perspectives in Microbial Ecology**. Washington, D.C.: American Society of Microbiology, 1984. p. 321-326.

COCHRAN, V.L.; ELLIOTT, L.F.; LEWIS, C.F. Soil biomass and enzyme activity in subarctic agricultural and forest soils. **Biol. Fertil. Soils.**, v.1, p. 283-288, 1989.

COCHRAN, V.L.; HORTON, K.A.; COLE, C.V. An estimation of microbial death rate and limitations of C or N during wheat straw decomposition. **Soil Biol. Biochem.**, v. 20, p. 293-298, 1988.

COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; BALOTA, E.L. Esporulação de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em solos sob plantio direto ou convencional e rotação de culturas. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO SOBRE PLANTIO DIRETO NA PEQUENA PROPRIEDADE, 1, 1993, Ponta Grossa. **Resumos**. Ponta Grossa: IAPAR, 1993. p. 25.

DALAL, R.C.; HENDERSON, P.A.; GLASBY, J.M. Organic matter and microbial biomass in vertisol after 20 yr of zero tillage. **Soil Biol. Biochem.**, v.23, p. 435-441, 1991.

DANIEL, O.; ANDERSON, J.M. Microbial biomass and activity in contrasting soil materials after passing through the gut of earthworm *Lumbricius rubellus* Hoffmaster. **Soil Biol. Biochem.**, v.24, p. 465-470, 1992.

DELLA BRUNA, E.; BORGES, A.C.; FERNANDES, B.; BARROS, N.F.; MUCHOVEJ, R.M.C. Atividade da microbiota de solos adicionados de serapilheira de eucalipto e de nutrientes. **R. bras. Ci. Solo**, v.15, p. 15-20, 1991.

DRURY, C.F.; STONE, J.A.; FINDLAY, W.I.. Microbial biomass and soil structure associated with corn, grasses and legumes. **Soil Sci. Soc. Amer. J.**, v.55, p. 805-811, 1991.

EDWARDS, C.A.; FLETCHER, K.E. Interactions between earthworms and micro-organisms in organic matter breakdown. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.24, p. 235-247, 1988.

FENN, M.E.; PATH, M.A.; DUNN, P.H.; BARRO, S.C. Microbial N and biomass, respiration, and N mineralisation in soils beneath two chaparral species along a fire-induced age gradient. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, p. 457-466, 1993.

FLANAGAN, P.W.; van CLEVE, K.; Microbial biomass, respiration and nutrient cycling in a black spruce taiga ecosystem. **Ecol. Bull.**, v.25, p. 261-273, 1977.

FLANAGAN, P.W.; van CLEVE, K. Nutrient cycling in relation to decomposition and organic matter quality in taiga ecosystems. **Can. J. For. Res.**, v.13, p. 795-817, 1983.

FRITZE, H.; PENNANEN, T.; PTETIKÄINEN, J. Recovery of soil microbial biomass and activity from prescribed burning. **Can. J. For Res.**, v. 23, p. 1286-1290, 1993.

GALLARDO, A.; SCHLESINGER, W.H. Carbon and nitrogen limitations of soil microbial biomass in desert ecosystems. **Biogeochem.**, v. 18, p. 1-17, 1992.

GOTTSCHAL, J.C. Phenotypic response to environmental changes. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 74, p. 93-102, 1990.

HALVORSON, J.J.; SMITH, J.L.; FRANZ, E.H. Lupine influences on soil carbon, nitrogen and microbial activity in developing ecosystems at Mount St. Helen. **Oecologia**, v. 87, p. 162-170, 1991.

HANLON, R.D. Influences of grazing by Collembola on the activity of senescent fungal colonies on media of different nutrient concentrations. **Oikos**, v. 36, p. 362-367, 1981.

HENDRIX, P.F.; PARMELEE, R.W.; CROSSLEY, D.A.; COLEMAN, D.C.; ODUM, E.P.; GROFFMAN, P.M. Detritus food-webs in conventional and no-tillage agroecosystems. **Bioscience**, v. 36, p. 374-380, 1986.

HOBBIE, S.E. Effects of plant species on nutrient cycling. **Trends Ecol. Evol.**, v. 7, p. 336-339, 1992.

HOLMES, W.E.; ZAK, D.R. Soil microbial biomass dynamics and net nitrogen mineralisation in northern hardwood ecosystems. **Soil Sci. Soc. Amer. J.**, v. 58, p. 238-243, 1994.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; CATTELAN, A.J. Ecologia microbiana em solos sob cultivo na região sul do Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994. Resumo 22

INGHAM, E.R.; TROFYMOW, J.A.; AMES, R.N.; HUNT, H.; MORLEY, C.R., MOORE, J.C.; COLEMAN, D.C. Trophic interactions and nitrogen cycling in a semi-arid grassland soil. 1. Seasonal dynamics of the natural populations, their interactions and effects on nitrogen cycling. **J. Appl. Ecol.**, v.23, p. 597-614, 1986.

INGHAM, R.E.; TROFYMOW, J.A.; INGHAM, E.R.; COLEMAN D.C. Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers on nutrient cycling and plant growth. **Ecol. Monogr.**, v.55, p. 119-140, 1985.

JENKINSON, D.S. Studies on the decomposition of plant material in soil. II. Partial sterilisation of soil and the soil biomass. **J. Soil Sci.**, v.17, p. 280-302, 1966.

JENKINSON, D.S.. Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soils. In: WILSON, J.R., ed. **Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Systems**. Wallingford: Cab International, 1988. p. 368-386.

JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soils: measurement and turnover. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N., ed. **Soil Biochemisty**, 5. New York: Marcel Decker, 1981. p. 415-471.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocide treatment on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biol. Biochem.**, v.8, p. 209-213, 1976.

JENKINSON, D.S.; HARKNESS, D.D.; VANCE, E.D.; ADAMS, D.E.; HARRISON, A.F. Calculating the net primary production and annual input of organic matter to soil from the amount and radiocarbon content of soil organic matter. **Soil Biol. Biochem.**, v.24, p. 295-308, 1992.

JOERGENSEN, P.G.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Survival of the soil microbial biomass at elevated temperatures. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p. 1129-1136, 1990.

KAJAK, A.; CHMIELEWSKI, K.; KACZMAREK, M.; REMBIALKOWSKA, E. Experimental studies on the effect of epigeic predators on matter decomposition in managed peat grasslands. **Pol. Ecol. Stud.**, v.17, p. 289-310, 1993.

KNAPP, E.B.; ELLIOTT, L.F.; CAMPBELL, G.S. Microbial respiration and growth during the decomposition of wheat straw. **Soil Biol. Biochem.**, v.15, p. 319-323, 1983.

KUNC, F. Methods for the analysis of soil microbial communities. In: RITZ, K.; DIGHTON, J.; GILLER, K.E., ed. **Beyond the Biomass-compositional and functional analysis of soil microbial communities.** Chichester: John Wiley & Sons, 1994. p. 23-28.

LADD, J.N.; AMATO M.; OADES, J.M. Decomposition of plant material in Australian soils. III. Residual organic and microbial biomass C and N from isotope-labelled legume material and soil organic matter, decomposing under field conditions. **Aust. J. Soil Res.**, v.23, p. 603-611, 1985.

LADD, J.N.; OADES, J.M.; AMATO, M. Microbial biomass formed from 14C, 15N-labelled plant material decomposing in soils in the field. **Soil Biol. Biochem.**, v.13, p. 114-126, 1981.

LAWRENCE, J.R.; GERMIDA, J.J. Relationship between microbial biomass and elemental sulphur oxidation in agricultural soils. **Soil Sci. Soc. Amer. J.**, v.52, p. 672-677, 1988.

LUIZOU, R.C.C.; BONDE, T.A.; ROSSWALL, T. Seasonal variation of soil microbial biomass - the effects of clearfelling a tropical rainforest and establishment of pasture in the central Amazon. **Soil Biol. Biochem.**, v.24, p. 805-813, 1992.

MARTENS, R. Estimation of microbial biomass in soils by the respiration method: importance of soil pH and flushing methods for measurement of respired CO_2. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p. 77-81, 1987.

MARUMOTO, T.; ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. Mineralisation of nutrients from soil microbial biomass. **Soil Biol. Biochem.**, v.14, p. 469-475, 1982.

MAZZARINO, M.J.; SZOTT, L.; JIMINEZ, M. Dynamics of soil total C and N, microbial biomass and soluble C in tropical agroecosystems. **Soil Biol. Biochem.**, v. 25, p. 205-214, 1993.

MOROTE, C.G.B.; VIDOR, C.; MENDES, N.G. Alterações na temperatura do solo pela cobertura morta e irrigacão. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.14, p. 81-84, 1990.

NIOH, I.; ISOBE, T.; OSADA, M. Microbial biomass and some biochemical characteristics of a strongly acid tea field soil. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.39, p. 617-626, 1993.

NORDGREN, A. A method for determining microbially available N and P in an organic soil. **Biol. Fertil. Soils**, v.13, p. 195-199, 1992.

OCIO, J.A.; MARTINEZ, J.; BROOKES, P.C. Contribuition to straw-derived N to total microbial biomass N following incorporation of cereal straw in soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.23, p. 655-659, 1991.

OHTONEN, R.; MARKKOLA, A.M. Biological activity and amount of FDA mycelium in mor humus of Scots pine stands (*Pinus sylvestris* L.) in relation to soil properties and degree of pollution. **Biogeochem.**, v.13, p. 1-26, 1991.

OKANO, S.; NISHIO, M.; SAWADA, Y. Turnover rate of soil biomass nitrogen in the root mat of pastures. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.33, p. 373-386, 1987.

OKANO, S.; SATO, K.; INOUE, K. Negative relationship between microbial biomass and root amount in topsoil of a grassland. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.37, p. 47-53, 1991.

PFENNING, L.; EDUARDO, B. DE P.; CERRI, C.C. Os métodos de fumigação-incubação e fumigação-extração na estimativa da biomassa microbiana de solos da Amazônia. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.16, p. 31-37, 1992.

POWLSON, D.S. The soil biomass: Before, beyond and back. In: RITZ, K.; DIGHTON, J.; GILLER, K.E., ed. **Beyond the Biomass compositional and functional analysis of soil microbial communities**. Chichester: John Wiley & Sons, 1994. p. 1-20.

POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p. 1121-1127, 1987.

RITZ, K.; DIGHTON, J.; GILLER, K.E. **Beyond the Biomass Compositional and functional analysis of soil microbial communities.** Chichester: John Wiley & Sons, 1994. 275 p.

ROSACKER, L.; KIEF, T.L. Biomass and adenylate energy charge of a grassland soil during drying. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p. 1121-1127, 1990.

ROSS, D.J.; ORCHARD, V.A.; RHOADES, D.A. Temporal fluctuations in biochemical properties of soils under pastures. 1. Respiratory activity and microbial biomass. **Aust. J. Soil Res.**, v.22, p. 303-317, 1984.

SAFFIGNA, P.G.; POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; THOMAS, G.A. Influence of sorghum residues and tillage on soil organic matter in an Australian Vertisol. **Soil Biol. Biochem.**, v.21, p. 759-765, 1989.

SANTOS, J.C.F. **Comportamento de propriedades físicas e químicas de dois latossolos roxos sob diferentes sistemas de rotação de cultura em plantio direto.** Lavras: ESAL, 1993. (Tese de Mestrado).

SANTRUCKOVA, H. Microbial biomass, activity and soil respiration in relation to secondary succession. **Pedobiol.**, v.36, p. 341-350, 1992.

SCHEU, S. Change in microbial nutrient status during secondary succession and its modification by earthworms. **Oecologia**, v.84, p. 351-358, 1990.

SCHEU, S. There is an earthworm-mobilisable pool of nitrogen in soil. **Pedobiol.**, v.38, p. 243-249, 1994.

SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Mineralisation of nitrogen from ^{15}N labelled fungi, soil microbial biomass and roots, and its uptake by barley plants. **Pl. Soil**, v.102, p. 71-78, 1987.

SEASTADT, T.R. The role of microarthropods in decomposition and mineralisation processes. **Ann. Rev. Entomol.**, v.29, p. 25-46, 1984.

SIDIRAS, N.; PAVAN, M.A. Influência do sistema de manejo do solo no seu nível de fertilidade. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.9, p. 249-254, 1985.

SINGH, J.S.; RAGHUBANSHI, A.S.; SINGH, R.S.; SRIVASTAVA, S.C. Microbial biomass acts as a source of plant nutrients in dry tropical forest and savanna. **Nature**, v.338, p. 499-500, 1989.

SMITH, J.L.; PAUL, E.A. The significance of soil biomass estimates. In: BOLLAG, J.M.; STOTZKY, G., ed. **Soil Biochemistry**, 6. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 357-396.

SMOLANDER, A.; MALKONEN, E. Microbial biomass C and biomass N in limed soil of Norway spruce stands. **Soil Biol. Biochem.**, v.26, p. 503-509, 1994.

SÖDERSTRÖM, B.; BÅÅTH, E.; LUNDGREN, B. Decrease in soil microbial activity and biomass owing to nitrogen amendment. **Can. J. Microbiol.**, v.29, p. 1500-1506, 1983.

SORENSON, L.H. Size and persistence of the microbial biomass formed during the humification of glucose, hemicellulose, cellulose and straw in soils containing different amounts of clay. **Pl. Soil**, v.75, p. 121-130, 1983.

SPARLING, G.P.; ORD, B.G. & VAUGHAN, D. Microbial biomass and activity in soils amended with glucose. **Soil Biol. Biochem.**, v.13, p. 99-104, 1981.

SPARLING, G.P.; SHEPHERD, T.G.; KETTLES, H.A. Changes in soil organic C, microbial C, and aggregate stability under continuous maize and cereal cropping, and after restoration to pasture in soils from the Manawatu region, New Zealand. **Soil Till. Res.**, v.24, p. 225-241, 1992.

SPARLING, G.P.; WEST, A.W.; REYNOLDS, J. Influence of soil moisture regime on the respiration response of soils subjeted to osmotic stress. **Aust. J. Soil Res.**, v.27, p. 161-168, 1989.

SRIVASTAVA, S.C.; SINGH, J.S. Microbial C, N and P in a dry tropical forest soil: effects of alternative land use and nutrient flow. **Soil Biol. Biochem.**, v.23, p. 117-124, 1991.

SWIFT, M.J.; HEAL, O.W.; ANDERSON, J.M. **Decomposition in Terrestrial Ecosystems**. Berkeley: University of California Press, 1979.

TATE, K.R.; ROSS, D.J.; RAMSAY, A.J.; WHALE, K.N. Microbial biomass and bacteria in two pasture soils: an assessment of measurement procedures, temporal variations and the influence of P fertility status. **Pl. Soil**, v.132, p. 233-241, 1991.

TAYLOR, B.R.; PARKINSON, D.; PARSONS, W.F.J. Nitrogen and lignin as predictors of decay rates: a microcosm test. **Ecology**, v.70, p. 97-104, 1989.

TORSVIK, V.; GOKOYR, J.; DAAE, F.L.; SORHEIM, R.; MICHALSEN, J. & SALTE, K. Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. In: RITZ, K.; DIGHTON, J.; GILLER, K.E., ed. **Beyond the Biomass - compositional and functional analysis of soil microbial communities**. Chichester: John Wiley & Sons, 1994. p. 239-248.

van de WERF, H.; VERSTRAETE, W. Estimation of active soil microbial biomass by mathematical analysis of respiration curves: calibration of test procedures. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.261-265, 1987.

van VEEN, J.A.; MERCKX, R.; van de GEIJIN, S.C. Plant and soil related controls of the flow of carbon from the soil microbial biomass. **Pl. Soil**, v.115, p. 179-188, 1989.

VERHAEGEN, K.; van KLEEMPUT, O.; VERSTRAETE, W. Nitrification mediated nitrosation of organics and effects on microbial biomass. **Biol. Wastes**, v.26, p. 235-245, 1988.

VISSER, S. Role of soil invertebrates in determining the composition of soil microbial communities. In: FITTER, A.H.; ATKINSON, D.; READ, D.J.; USHER, M.B., ed. **Ecological Interactions in Soil**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1985. p. 297-317.

von LUTZOW, M.; ZELLES, L.; SCHEUNERT, I.; OTTOW, J.G.C. Seasonal effects of liming, irrigation, and acid precipitation on microbial biomass N in a spruce (*Picea abies* L.) forest soil. **Biol. Fertil. Soils**, v.13, p. 130-134, 1992.

VOSS, M.; SIDIRAS, N. Nodulação da soja em plantio direto em comparação com plantio convencional. **Pesq. agropec. bras.**, v.20, p. 775-782, 1985.

WARDLE, D.A. Impact of disturbances on detritus food-webs in agro-ecosystems of contrasting tillage and weed management practices. **Adv. Ecol. Res.**, v.26. 1994a. (no prelo).

WARDLE, D.A. Métodos para quantificar a biomassa microbiana do solo. In: HUNGRIA, M. & ARAUJO, R.S., ed. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994b. (no prelo).

WARDLE, D.A. Links between the soil biomass, and climatic and biotic factors. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, Londrina, 1994. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994c. Resumo 11.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Comparison of physiological techniques for estimating the response of the soil microbial biomass to soil moisture. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p. 817-823, 1990.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Relative importance of the effects of 2,4-D, glyphosate and environmental variables on the soil microbial biomass. **Pl. Soil**, v. 134, p. 209-219, 1991.

WARDLE, D.A.; YEATES, G.W. The dual importance of competition and predation as regulating forces in terrestrial ecosystems: evidence from decomposer food-webs. **Oecologia**, v.93, p. 303-306, 1993.

WARDLE, D.A.; NICHOLSON, K.S.; AHMED, M.; RAHMAN, A. Interference effects of the invasive plant *Carduus nutans* L. against the nitrogen fixation ability of *Trifolium repens* L. **Pl. Soil**, 1994. (no prelo).

WASILEWSKA, L.; JAKUBECZYK, H.; PAPLINSKA, E. Production of *Aphelenchus avenae* Bastian (Nematoda) and reduction of saprophytic fungi by them. **Pol. Ecol. Stud.**, v.1, p. 61-73, 1975.

WEST, A.W.; ROSS, D.J.; COWLING, J.C. Changes in microbial C, N, P and ATP contents, numbers and respiration on storage of soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.18, p. 141-148, 1986.

WOLTERS, V. The influence of omnivorous elaterid larvae on the microbial carbon cycle in different forest soils. **Oecologia**, v.80, p. 405-413, 1989.

ZAK, D.R.; GRIGAL, D.F.; GLEESON, S.; TILMAN, D. Carbon and nitrogen cycling during old field succession: constraints on plant and microbial biomass. **Biogeochem.**, v.11, p. 111-129, 1990.

CAPÍTULO 7

BIODEGRADAÇÃO DE XENOBIONTES: POTENCIALIDADES E LIMITES

Tomaz Langenbach[1]

7.1. Importância da Biodegradação

Produtos químicos chamados xenobiontes, que não existiam na natureza, são utilizados atualmente em quase todas as atividades humanas. A introdução destes produtos permitiu o controle de pragas, a utilização de embalagens de plástico, o uso de eletricidade mediada por transformadores com bifenil-policlorados (PCB), o uso de detergentes e muitos outros exemplos que poderiam ser citados. Apesar do emprego destas substâncias trazer, indubitavelmente, grandes vantagens, também criou problemas novos, dentre os quais o da eliminação após seu uso, pois muitos destes produtos persistem por longo período de tempo, acumulando-se no ambiente. No início, não existia uma preocupação com esta questão mas, pouco a pouco, foram surgindo problemas que exigiam um cuidado específico com a degradação destes compostos. Todas as substâncias químicas existentes na natureza são biodegradáveis, não se acumulando no ambiente, pois há sistemas enzimáticos capazes de degradá-las entre as plantas, os animais e os microrganismos. Conseqüentemente, muitos dos produtos químicos introduzidos no ambiente são biodegradáveis por ação de enzimas previamente existentes na natureza. Outros produtos, porém, não são sujeitos à ação destas enzimas e persistem e podem acumular-se gradativamente no ambiente.

Em ecotoxicologia, é importante distinguir toxicidade e persistência, sendo esta última conseqüência de uma maior ou menor biodegradabilidade. A toxicidade é o efeito deletério a algumas formas de vida, enquanto o termo persistência significa a degradabilidade de uma substância (Deelen, 1989). O acúmulo gradativo de produtos pode implicar em um efeito retardado, muitas vezes imprevisível, de difícil reversão. O plástico não é tóxico, mas é persistente. Os pesticidas organofosforados são muito tóxicos, mas facilmente biodegradáveis.

O acúmulo de certas substâncias concentra-se sobretudo na matéria orgânica do solo e sedimentos e também em plantas, algas e animais (IAEA, 1980; Frehse, 1991). Este acúmulo de produtos pode acarretar desde a redução até a extinção de populações de animais ou, muito freqüentemente, favorecer o aparecimento de mutantes resistentes a estes produtos. Esta última situação explica porque muitos inseticidas, fungicidas e bactericidas, dentre outros, perderam a eficácia. A bioconcentração é a capacidade de uma forma de vida incorporar certos produtos em uma concentração muito superior àquela do ambiente, seja água ou solo. A biomagnificação ocorre quando este acúmulo ganha dimensão maior, passando pela cadeia alimentar e atingindo, muitas vezes, o homem. Em peixes, por exemplo, foi encontrado que o DDT foi biomagnificado em até 60.000 vezes em relação à concentração na água (Connell, 1990). A presença destes produtos no solo permite a absorção pela planta, podendo acumular-se nas raízes ou, por translocação, atingir outras partes do vegetal.

[1] Professor, Ph.D., Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Microbiologia, Cidade Universitária, CCS, Bloco I, CEP 21944-970, Rio de Janeiro, RJ.

Quando comparados às toxinas naturais, os pesticidas utilizados amplamente na agricultura têm seu efeito tóxico agravado por serem pouco específicos, necessitando da aplicação de concentrações relativamente altas e ocasionando uma acumulação maior. A pouca especificidade permite, ainda, sua atuação sobre formas de vida que não são o seu alvo. Como exemplo, os pesticidas podem promover a eliminação dos inimigos naturais das pragas, o que pode acarretar no recrudescimento de uma praga. Como resultado, o número de pragas vem aumentando.

A gravidade dos problemas decorrentes do uso de substâncias não-biodegradáveis é maior do que muitas de suas vantagens, por isso, o seu uso foi-se restringindo gradativamente. A única forma de controlar o uso de substâncias não-biodegradáveis, como os pesticidas ou os detergentes, que se distribuem sobre amplas regiões, é através da restrição de seu uso. Isto é sempre um processo muito difícil, pois o conflito de interesses entre a preservação ambiental e a produção impede, muitas vezes, a retirada do uso de certas substâncias de circulação, particularmente nos países do terceiro mundo.

A eliminação de produtos persistentes, oriundos de processos industriais, concentrados em depósitos de lixo químico, ou que se acumularam em decorrência de acidentes, ocorre por meio de tratamentos específicos, que podem ser de queima ou microbiológicos. A comparação quanto à eficiência e custos é essencial para a escolha do tratamento mais indicado para cada situação.

A queima é um processo que, para ser satisfatório, requer uma combustão completa que evite a formação de compostos organoclorados de alta toxicidade. Geralmente, a queima de lixo é feita a temperaturas abaixo de 1300° C, o que permite a formação contínua de dioxinas, consideradas entre as substâncias mais tóxicas conhecidas. O acidente de Seveso, na Itália, em meados da década de 70, é um exemplo da toxicidade da dioxina. A queima adequada deve garantir não só uma temperatura acima de 1300°C, como manter condições constantes de combustão em todas as partes do forno, o que é bastante complexo. Com isto, a instalação e operação destes fornos torna-se tão onerosa que, no Brasil, pouquíssimos equipamentos deste tipo estão em atividade. Contudo, é importante ressaltar que, quando adequadamente utilizado, este método permite eliminar substâncias tóxicas em casos nos quais a biodegradação encontra os seus limites. Há outros métodos de eficiência menos comprovada, como os fotossensibilizadores ou a utilização direta de radiação ultravioleta, muitos deles em fase experimental.

A biodegradação microbiana tem enormes vantagens. Em primeiro lugar, como os microrganimos estão presentes em todos os ambientes, o processo pode ser realizado no próprio local. é impossível incinerar-se um solo de milhões de hectares contaminados com pesticidas, mas a biodegradação está em curso em todos estes hectares. Em segundo lugar, é um processo que permite grande desenvolvimento: 1- pela seleção de mutantes capazes de degradação mais eficiente; 2- pela engenharia genética, que permite a transferência de genes responsáveis pelas enzimas de degradação a microrganismos já ambientados no local; 3- pela versatilidade nas estações de tratamento; e 4- mediante a potencialização da biodegradação pelos microrganismos já existentes na área poluída, através de um procedimento chamado biorremediação. Finalmente, seus custos são muito mais baixos do que aqueles do processo de incineração e, por isso, a biodegradação, às vezes, se torna o único método viável. Se estes aspectos deixam clara a importância da biodegradação, sua eficiência não cobre todas as situações, motivo pelo qual a persistência de determinadas substâncias por longos períodos ocorre, freqüentemente, no ambiente. Este tema é discutido no último item deste capítulo.

7.2. A Importância dos Microrganismos na Biodegradação

A primeira questão a ser colocada é: até que ponto os microrganimos são vítimas destas substâncias que, com freqüência, são tóxicas para animais e plantas? Muitos pesticidas afetam apenas as vias metabólicas de animais e plantas, que são diferentes das dos microrganismos, e por isto não os atingem (Hassall, 1990). Exemplo disso são os inseticidas que atuam no sistema nervoso, interferindo com a acetilcolinesterase. Freqüentemente, estes produtos funcionam como fonte de carbono, nitrogênio ou enxofre, beneficiando o crescimento microbiano. Por outro lado, alguns produtos atuam sobre o crescimento e a sobrevivência de populações microbianas. Após exaustivas pesquisas, concluiu-se que os pesticidas no solo, em geral, não têm efeitos maiores e mais duradouros sobre os microrganismos, quando utilizados dentro das recomendações (Sommerwille & Greaves, 1987). Ao contrário, sabe-se hoje que os microrganismos não são vítimas, pelo contrário, são importantes justamente pelo seu enorme potencial de biodegradação. Evidentemente, isto não inclui produtos antimicrobianos, como os bactericidas ou os fungicidas, cuja finalidade é precisamente atuar sobre determinados microrganismos. O efeito destes produtos não elimina todas as bactérias ou fungos e, geralmente, é revertido no tempo.

Por que os microrganismos têm uma importância relativamente maior na biodegradação do que plantas e animais. A importância da capacidade de biodegradação de animais e plantas é inegável, mas suas potencialidades são menores do que aquelas oferecidas pelos microrganismos. A degradação dos pesticidas no ambiente tropical é determinada, sobretudo, pela ação microbiana e pela radiação solar.

Nos animais, nas plantas e nos microrganismos, o metabolismo e o destino dos xenobiontes guardam diferenças importantes. Nos animais superiores, o metabolismo possibilita a conversão dos xenobiontes em moléculas polares de fácil excreção (Dorough & Ballard, 1982) Estas reações ocorrem em órgãos especializados, como o fígado, através da função das oxidases mistas, como a família dos citocromos P-450. Nas plantas não há órgãos de excreção. Observa-se, freqüentemente, a formação de conjugados solúveis ou insolúveis, que ficam imobilizados em determinados tecidos por longo tempo ou se destacam da planta por senescência (Shimabukuro et al., 1982). Quanto aos microrganismos, muitos xenobiontes são utilizados como fonte de carbono e, portanto, de energia (Matsumura, 1982). Freqüentemente, a comunidade microbiana degrada xenobiontes até o CO_2. Nestes casos, o processo é chamado de mineralização e constitui a única forma de garantir uma degradação total da substância. Já a completa oxidação de um pesticida a CO_2 não é significante na planta.

Os microrganismos são encontrados em todos os ambientes, desde o solo superficial até camadas a centenas de metros de profundidade, em regiões úmidas ou desérticas, em água doce ou salgada de qualquer profundidade, no ar, em ambientes domésticos ou industriais, em altas ou baixas temperaturas e em ambientes poluídos ou não. Assim, a biodegradação pode ocorrer em toda esta gama de ambientes. Animais e plantas sobrevivem em ambientes muito mais restritos. Os microrganismos têm vias metabólicas muito diversificadas, algumas inexistentes em animais e plantas, como a fermentação, alguns tipos de metabolismo anaeróbio, metabolismo quimioautotrófico e o metabolismo através de isoenzimas.

A adaptabilidade dos microrganimos é enorme. Cada geração ocorre, geralmente, num curto período de tempo, de até 30 minutos, garantindo, desta forma, uma alta probabilidade de aparecimen-

to de mutantes. Para se ter uma idéia, considerando o tempo de geração de 30 minutos chega-se, a partir de uma célula, a aproximadamente um milhão de células, em nove horas e trinta minutos e a um bilhão de células em 15h. O aparecimento de um mutante resistente à penicilina ocorre na proporção de um para cada 10 milhões de células. É interessante notar que, quando o ambiente é muito adverso, parece que a taxa de mutagenicidade aumenta entre os microrganismos. Sob intenso estresse, os microrganismos não têm mais a possibilidade de atender à grande demanda energética para realizar o reparo de seu DNA, persistindo todos os tipos de defeitos genéticos, o que aumenta a taxa de mutação. Conseqüentemente, a probabilidade de aparecimento de um mutante adaptado àquelas condições inicialmente adversas é maior e, com isto, as possibilidades de sobrevivência da população aumentam (Koch, 1993). Outra grande vantagem deste crescimento é a de formar, em pouco tempo, grandes biomassas, muito superiores àquelas formadas por animais ou plantas no mesmo período.

7.3. Processos Metabólicos

Nesta seção, os processos de biodegradação microbiológica são priorizados, fazendo-se algumas referências a animais e plantas.

7.3.1. Tipos de metabolismos

São destacadas, aqui, algumas modalidades metabólicas pelas quais os microrganismos podem degradar um xenobionte. A biodegradação pode ocorrer pela ação enzimática. Neste caso, distinguem-se os seguintes metabolismos:

- Incidental - ocorre quando as enzimas de degradação fazem parte do metabolismo celular, sem que o xenobionte tenha importância como fonte de carbono.
- Cometabolismo - ocorre pela indução enzimática por substâncias análogas, como, por exemplo, o uso de bifenilas como substrato, para cuja degradação são induzidas enzimas capazes de degradar PCB. Neste caso, as enzimas não discriminam o substrato do xenobionte; o metabolismo, porém, não é completo e, portanto, não permite que esta substância funcione como fonte de energia para o crescimento.
- Catabolismo - é quando o xenobionte é utilizado como fonte de energia; sendo necessárias, neste caso, concentrações maiores da substância para garantir o crescimento microbiano.

7.3.2. Produtos do metabolismo microbiano na degradação de xenobiontes

A degradação de xenobiontes também pode ser feita por substâncias liberadas pelos microrganismos no ambiente.

7.3.2.1. pH

A fácil degradação de certos xenobiontes é bem conhecida em determinada faixa de pH. Observações *in vitro* mostram que os microrganismos têm grande influência no pH, podendo alcalinizá-lo, quando o meio é rico em proteínas, ou acidificá-lo na presença de carboidratos.

7.3.2.2. Fotossensibilizadores

Sabe-se que alguns fotossensibilizadores são capazes de degradar xenobiontes. Os microrganismos podem liberar para o meio substâncias que promovem as fotorreações. Um dos mecanismos

consiste em captação da energia luminosa pelo fotossensibilizador e sua transmissão direta para a molécula do xenobionte. Segundo outro mecanismo, estas substâncias fotossensibilizadoras funcionam como receptores ou doadores de elétrons e/ou como grupos reativos, como o H^+ ou OH^-, que promovem, por sua vez, a transformação do xenobionte. A ferredoxina e as flavoproteínas das algas são fotossensibilizadores molecularmente bastante estáveis, que permitem um tempo de sobrevivência, após a morte celular das algas, capaz de promover a degradação de pesticidas.

7.3.2.3. Cofatores

Os cofatores, como a porfirina, têm origem microbiana e são liberados no ambiente, tornando-se capazes de promover reações não-enzimáticas de declorinação do DDT e DTE. é possível que substâncias como glutation, citocromos, NADH, entre outras, também sejam fatores de degradação de xenobiontes no ambiente.

7.3.3. Reações

7.3.3.1. Hidrólise

A hidrólise química ou enzimática é uma das reações mais importantes, correspondendo à adição de uma molécula de água ao xenobionte, transformando-o, muitas vezes, em substância não-tóxica. Uma das razões da alta freqüência com que estas reações ocorrem é, provavelmente, a excreção de enzimas hidrolíticas pelo microrganismo, as chamadas exoenzimas. Elas hidrolisam moléculas grandes, criando outras menores, que podem, com isto, ser transportadas para o interior celular. Exoenzimas são encontradas em ambientes terrestres e aquáticos. Scheunert (1992) destaca como exemplos deste tipo de reações a hidrólise da ligação éster dos inseticidas organofosforados e a degradação dos carbamatos e dos piretróides **(Tabela 7.1)**. Reações de hidrólise ocorrem tanto em animais como em plantas.

7.3.3.2. Redução

Uma das reações mais comuns de redução é a de dehalogenação, cuja importância se deve, sobretudo, ao fato de ser condição para reações subseqüentes de degradação da mesma molécula **(Tabela 7.2)** (Schneurt, 1992). Uma das possibilidades é que esta reação ocorra em condições anaeróbias promovidas enzimaticamente pelo FADH, situado na membrana de *E. coli*, transformando o DDT em TDE. Outro sistema de redução, acoplado à oxidação mista através do citocromo P-450, é encontrado em alguns microrganismos **(Figura 7.1)** (Matsumura, 1982). Este sistema só funciona em condições anaeróbias. Por fim, reações não-enzimáticas, envolvendo cofatores de flavoproteínas, como o FAD, FMN ou riboflavina resistentes a proteases e ao calor, também podem promover reações de redução **(Figura 7.2)**. Reações de redução de pesticidas também são encontradas em plantas. No ambiente, o potencial de oxidorredução é um fator importante a ser considerado. A degradação de determinados organoclorados, como beta e gama HCH (lindane), está relacionada a um potencial redox entre -40 e -100 mV, encontrado durante alguns dias após inundação. Esta condição anaeróbia estimula a proliferação de *Clostridium sp.* e a atividade de outros anaeróbios eficazes na biodegradação.

Tabela 7.1. Transformações dos pesticidas no solo por hidrólise enzimática.

Hidrólise de	**Fórmulas**	**Exemplos**
Éster carboxílico	$R - COOR' \rightarrow R - COOH$	Malation, Kelevan
Éster de sulfato	$R - CH_2 - O - \overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O}{\|}}{S}} - OH \rightarrow$ $R - CH_2OH$ e/ou $HO - \overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O}{\|}}{S}} - OH$	Disul
Carbamatos	$R - NH - \overset{\overset{O}{\|}}{C} - R' \rightarrow$ $R - NH_2$ e/ou $HOOCR'$	Benomil, Carbaril
Nitrilos	$R - C \equiv N \rightarrow R - C(=O)NH_2$	Ácido Nitrilo 2,4-Diclorobenzóico, Cipermetrin
Epóxidos	$\rightarrow R - COOH$ $-C(-)-C(-) - \rightarrow -C(-OH)-C(-OH)-$ (O)	Dieudrin
Declorinação	$-C(-)-Cl \rightarrow -C(-)-OH$	Tricloroacetato, Ácido 4-Clorobenzóico

Tabela 7.2. Transformação dos pesticidas no solo por oxidação enzimática.

Reações	Fórmulas	Exemplos
C-hidroxilação	$R-H \rightarrow R-OH$ $R-CH_2-R' \rightarrow R-CHOH-R'$	Cipermetrin, 2,4-diclorofenol, Carbofuran
C-Carboxilação	$R-CH_2-OH \rightarrow R-COOH$	Metabolito de Cipermetrina
Metiloxidação	$R-CH_3 \rightarrow R-CH_2OH$	Bromacil
Epoxidação	$R-C(H)=C(H)-R \rightarrow R-C(H)(O)-C(H)-R$	Aldrin, heptaclor
Formação de cetona	$R-CH_2-R' \rightarrow R-CO-R'$ $R-CHOH-R' \rightarrow R-CO-R'$	Carbofuran
Clivagem C=C	$R-C=C-R' \rightarrow$ $R-COOH + HOOC-R'$	Aldrin, anilinas clorinadas
Clivagem C=O	$R-C(=O)-R' \rightarrow RCOOH$	Kelevan
C-dehidrogenase	$R-CHCl-CHCl-R' \rightarrow$ $R-CCl=CCl-R'$	Lindane
N-demetilação	$R-N(CH_3)-R' \rightarrow [R-N(CH_2OH)-R]$ $\rightarrow R-NH-R'$ $R-NH_2-R- -NH$	Feniluréia
N-oxidação	$R-NH_2 \rightarrow R-NO$ $\rightarrow R-NO_2$ $R-NH_2 + H_2N-R'$ $\rightarrow R-N=N-R'$ $\rightarrow R-N(O)=N-R'$	Anilinas clorinadas
S-oxidação	$R-S-R' \rightarrow R-SO-R'$ $\rightarrow R-SO_2-R'$ $R-SH + HS-R' \rightarrow$ $R-S-S-R'$	Aldicarb, carboxin
Substituição de S por O	$(RO)_2P(=S) \rightarrow (RO)_2P(=O)$	Paration Etileno, uréia
Clivagem de éter	$R-O-R \rightarrow ROH$	2,4-D

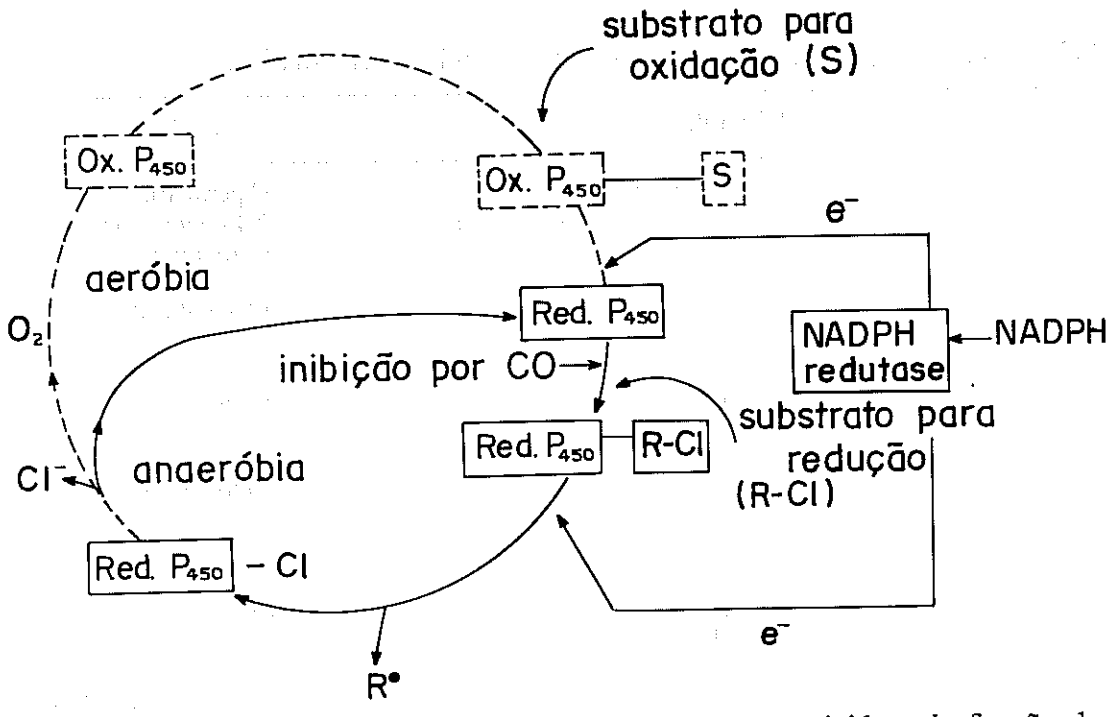


Figura 7.1. Via metabólica proposta para a redução do pesticida pela função das oxidases mistas em condições anaeróbias.

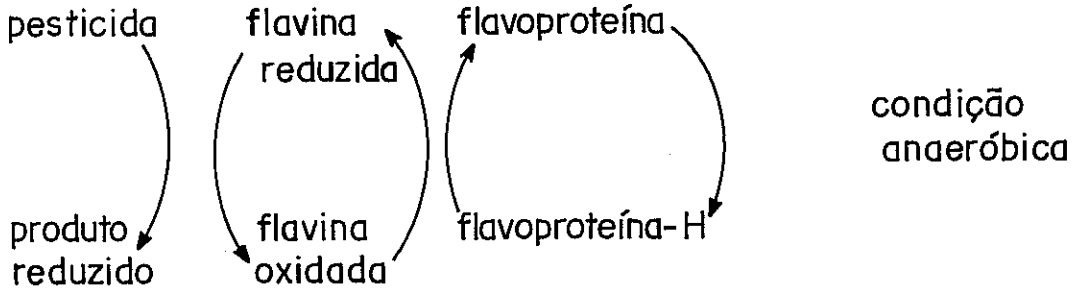


Figura 7.2. Degradação do pesticida pelo sistema de cofator flavina-flavoproteína.

7.3.3.3. Oxidação

Muitas reações de oxidação são conhecidas, como: a epoxidação dos ciclodienos; a oxidação dos tioésteres a sulfóxidos e a sulfonas; a dealquilação oxidativa de alquilaminas; a abertura de anel aromático, como o 2,4-D; e a decarboxilação **(Tabela 7.3)** (Schneurt, 1992). é importante salientar que as reações de abertura do anel aromático só foram observadas em microrganismos. Estas reações se dão através de hidroxilação e incluem reações de epoxidação. Podem ocorrer na presença de cloro na molécula, e quanto maior o número de átomos de cloro, menor a biodegradabilidade. Por isso, os PCBs com maior número de átomos de cloro têm biodegradação lenta e difícil, quando comparados aos PCBs com pouco cloro.

Tabela 7.3. Transformação dos pesticidas no solo por redução enzimática.

Reação de redução	Fórmula	Exemplos
C = C	$R-CH=CH-R' \rightarrow R-CH_2-CH_2-R'$	DDMU (metabolito do DDT)
C ≡ C	$R-C\equiv C-R' \rightarrow R-CH=CH-R'$	Buturon
Grupo NO_2	$R-NO_2 \rightarrow R-NH_2$	Paration, Fenitrotion
Grupo sulfoxido	$R-SO-R' \rightarrow R-S-R'$	Sulfóxido de forato
Clivagem S-S	$R-S-S-R' \rightarrow R-SH$	Tiram
Declorinação	$R-Cl \rightarrow R-H$	DDT, ciclodienos, benzenos e fenóis clorinados
Debrominação	$R-Br \rightarrow R-H$	1,2-Dibromo-3-cloropropano
Eliminação de NO_2	$R-NO_2 \rightarrow R-H$	Pentacloronitrobenzeno

Observações em mutantes deficientes em dihidroxibenzoato dehidrogenase evidenciaram que estas enzimas são importantes na declorinação de compostos haloaromáticos. Parece que a declorinação também pode ser feita pela participação do oxigênio molecular na presença de uma dehidroxilase.

Muitas das reações de oxidação ocorrem em microrganismos, plantas e animais por intermédio das oxidases mistas com a participação do citocromo P-450, embora por meio de um processo metabólico diferente das reações de redução.

7.3.3.4. Conjugação

Na conjugação, o xenobionte reage com substratos endógenos, como carboidratos, aminoácidos ou glutation, formando compostos com peso molecular maior. As moléculas adquirem, assim, maior polaridade e se tornam mais hidrofílicas, o que possibilita sua eliminação. A declorinação de substâncias organocloradas pelo glutation, glicose-cistina-glicina (**Figura 7.3**), é uma reação particularmente importante em plantas e, em menor importância, em animais. Esta conjugação é mediada pela enzima glutation-S-transferase que, no caso do *Hyphomicrobium* sp., mostrou baixa especificidade, sendo considerada uma reação fortuita (Hardman, 1991).

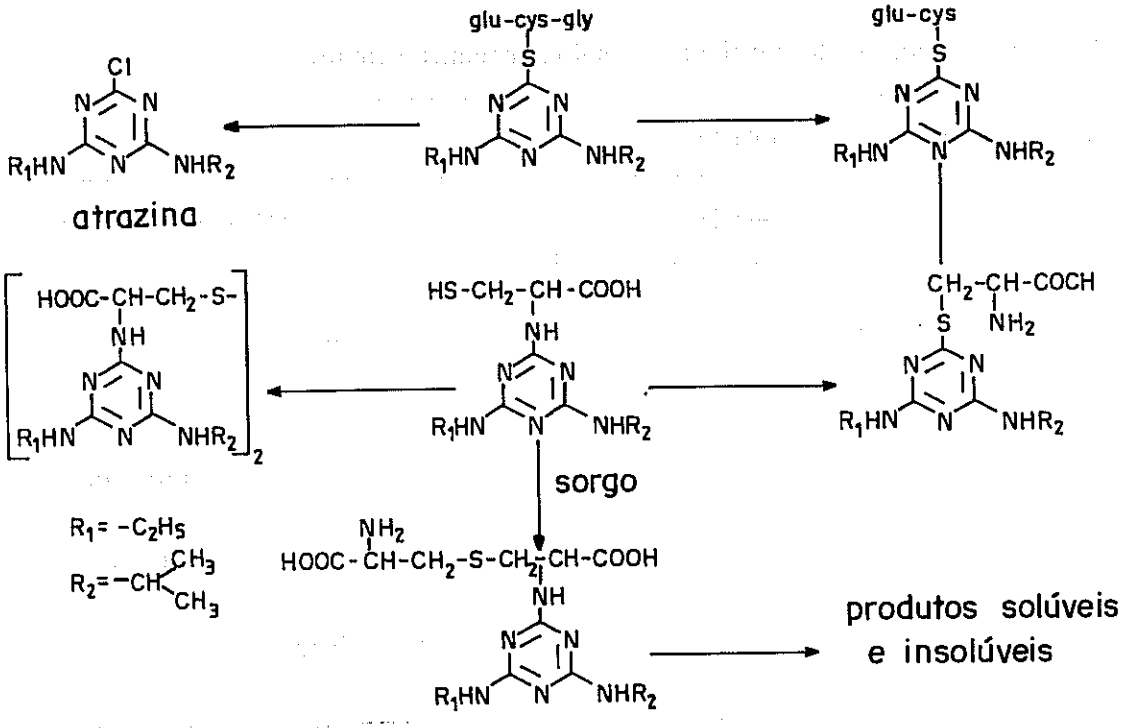


Figura 7.3. Metabolismo da atrazina por conjugação com glutation.

7.3.3.5. Isomerização

São reações promovidas pelos microrganismos, em que a fórmula primária se mantém mas a conformação molecular fica alterada. A transformação do gama HCH em alfa HCH, que reduz fortemente o grau de toxicidade, é citada como exemplo.

7.3.4. Diversidade metabólica e biodiversidade microbiana

A biossíntese de moléculas como aminoácidos apresenta uma via metabólica com poucas variações. As reações de catabolismo, ao contrário, possuem diversas vias metabólicas para um mesmo produto, em diferentes microrganismos (Clarke, 1984). Às vezes, algumas vias metabólicas distintas podem ser encontradas num mesmo microrganismo para um mesmo produto. Há uma velha teoria, formulada por Kluyver, que sugere que os microrganismos têm enzimas degradativas com baixa especificidade a diferentes substratos, de forma que a mesma enzima pode degradar muitos compostos diferentes. Embora se saiba que isto é uma extrema simplificação, a ambigüidade de muitas enzimas catalíticas, em relação a substratos, é de considerável importância. Muitas enzimas, como as decarboxilases e as isomerases, guardam grande semelhança nas seqüências de aminoácidos, sugerindo a duplicação e a divergência a partir de um gene comun ancestral.

Para que se entenda a variação das vias catabólicas é preciso considerar a biodiversidade microbiana, entendida como a relação entre a diversidade dos microrganismos e o tamanho relativo de suas populações. Poucos microrganismos são capazes de biodegradar completamente uma substância e os xenobiontes, geralmente, são degradados por um consórcio de muitos microrganismos (Slater & Lovat, 1984). No entanto, é muito importante estudar separadamente a participação de cada microrganismo no processo de degradação. O teor de matéria orgânica no solo aumenta a biomassa microbiana

e a biodiversidade e, por conseguinte, influi sobre a biodegradação de um produto. Em solos tropicais, a incorporação de matéria orgânica ao solo aumenta a atividade microbiana e, conseqüentemente, acelera a degradação de muitos pesticidas.

Em ambientes naturais existe, geralmente, uma baixa disponibilidade de nutrientes, o que restringe o crescimento de determinadas populações e aumenta o número de células mortas, que se rompem e liberam metabólitos, inclusive macromoléculas como o DNA. Por isso, a passagem deste DNA para outras células, num processo denominado transformação, ganha importância na natureza. A conjugação, que permite a transferência de material genético plasmidial, é um mecanismo significativo da flexibilidade genética . Desta maneira, o potencial genético pode ser intercambiado entre espécies bastante distantes de microrganisos e, assim, promover a evolução de novas vias metabólicas (Boyle, 1993). Recentemente, a importância destes processos foi confirmada em estudos que utilizaram microrganismos geneticamente engenheirados ("genetic engineered microorganism" - GEMS), cujos genes introduzidos puderam ser rastreados no solo e identificados em diferentes microrganimos.

A biodegradação de um pesticida no solo pode ser induzida pela aplicação de um produto que, inicialmente, leva um tempo maior para sua degradação. A aplicação repetida do mesmo produto reduz o tempo de adaptação do microrganismo, aumentando a velocidade de biodegradação. Em solos nos quais os microrganismos estão bem adaptados a determinados pesticidas, a biodegradação destes é tão grande que compromete a eficiência de seu emprego (Racke & Coats, 1990).

7.4. Métodos Químicos para a Caracterização da Biodegradação

7.4.1. Métodos inespecíficos

Inicialmente são apresentados, de forma sumária, os métodos não-específicos de quantificação da biodegradação (Zitko, 1984). Estes dados são requeridos, com freqüência, pela legislação para caracterizar se um produto é biodegradável. Nestes casos, soluções com determinada concentração da substância em teste são inoculadas e incubadas por determinado tempo, avaliando-se o desaparecimento da substância. Os métodos utilizados para isto são comparativos. A biodegradação pode ser medida de várias formas, conforme detalhado nos subitens seguintes.

7.4.1.1. Produção de CO_2

A degradação completa de um produto leva à formação de CO_2, que é captado por substâncias químicas contendo NaOH. Após a incubação, a soda restante é titulada e, com isto, pode-se determinar a quantidade de CO_2 produzida. O cálculo estequiométrico permite a quantificação da substância degradada. Antes da incubação é preciso ter o cuidado de eliminar o CO_2 do ar no frasco. Este sistema pode funcionar em frasco fechado, ou por passagem contínua de ar, com a eliminação prévia do CO_2 **(Figura 7.4)**. Este método pode ser utilizado com o produto marcado com ^{14}C, o que permite separar o CO_2 proveniente da substância em estudo do CO_2 produzido pelo inóculo ou nutriente adicionado ao meio. A avaliação da produção é muito utilizada para estudos de biodegradação de materiais de limpeza, desinfetantes e também para estudos de biodegradação da matéria orgânica do solo.

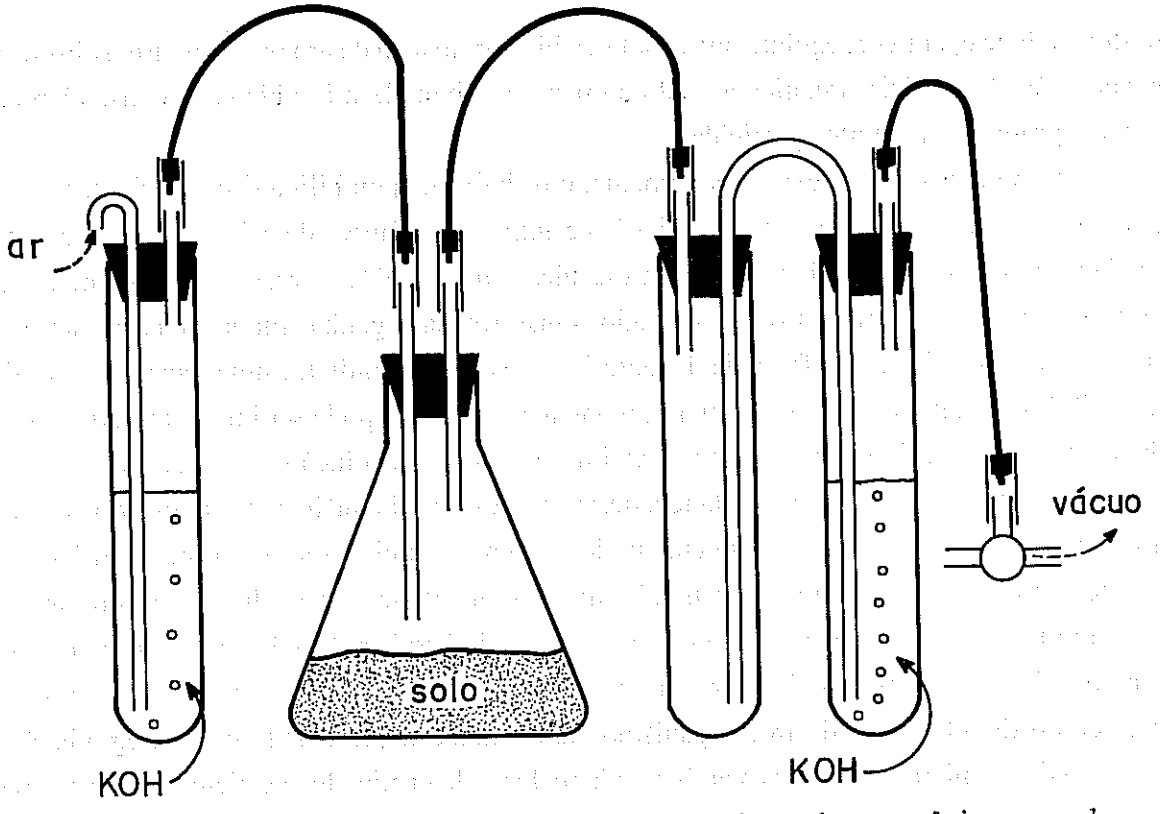


Figura 7.4. Aparelho para determinar a decomposição de produtos orgânicos no solo.

7.4.1.2. Demanda bioquímica de oxigênio (DBO)

É um método semelhante ao descrito anteriormente. A diferença é que ao invés de quantificar a biodegradação pelo CO_2 produzido, neste método mede-se o oxigênio liberado. É muito utilizado para caracterizar ambientes poluídos, mas este método funciona somente em soluções relativamente concentradas de substância, na faixa entre 10 e 100 mg . L^{-1}.

7.4.1.3. Demanda química de oxigênio (DQO)

Neste método, a amostra é incubada, como anteriormente descrito, e a matéria orgânica restante é dosada com dicromato de potássio em 50% de ácido sulfúrico, com a presença de sulfato de cobre como catalizador. Como a quantidade inicial da substância é conhecida, ao subtrair-se a quantidade residual tem-se a biodegradação.

7.4.1.4. Carbono orgânico dissolvido (COD)

A lógica deste método é idêntica à do DQO, exceto que a matéria orgânica é convertida em CO_2 ou metano, e avaliada por cromatografia gasosa ou espectrofotometria de infravermelho. Este método, assim como o DQO, pode ser utilizado em concentrações menores do substrato.

7.4.2. Métodos específicos

Os métodos específicos são utilizados, geralmente, em estudos mais refinados, que exigem a quantificação e identificação do produto inicial, chamado resíduo, e dos transformados, chamados

metabólitos. Para isto, é necessário um processo de extração destas substâncias do solo, utilizando solventes orgânicos, para purificá-las em seguida, finalizando com a análise. Não há uma metodologia universalmente aceita e padronizada para a extração de pesticidas do solo, de forma que se encontra uma certa variação metodológica nos diferentes trabalhos, correspondendo a eficiências também variadas. Quanto à etapa da purificação, fica-se no dilema de aprimorá-la, perdendo-se eficiência, ou garantir a alta recuperação com amostras pouco purificadas. Além dos métodos analíticos de separação e quantificação citados a seguir, pode-se usar o espectrofotômetro, o espectrofotômetro de fluorescência e o infravermelho.

7.4.2.1. Cromatografia de camada fina (TLC)

A separação do produto, neste processo, é feita sobre uma placa coberta com sílica, o que corresponde à fase estacionária. Em seguida, aplica-se a amostra, utilizando-se um eluente para a corrida, o que configura a fase móvel do processo. O eluente é geralmente composto de uma mistura de solventes adequados para a substância a ser analisada, indicados por manuais. A identificação corre por conta da mobilidade relativa (Rf) dos padrões das substâncias a serem analisadas e a revelação pode ser feita por ultravioleta, vapor de iodo metálico ou outras substâncias específicas para cada tipo de molécula. Quando a revelação é feita por métodos não-destrutivos, o local onde se encontra a substância pode ser raspado da placa, eluído e quantificado. A desvantagem, em relação aos métodos de cromatografia líquida (HPLC) ou cromatografia gasosa, é a resolução mais baixa, permitindo, muitas vezes, uma certa mistura entre as diferentes substâncias.

7.4.2.2. Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

Este tipo de cromatografia tem excelente resolução em análises de substâncias com polaridades distintas. A degradação de um resíduo resulta, geralmente, em metabólitos mais polares e, por isto, mais hidrofílicos. As colunas normalmente empregadas para este fim são as de fase reversa. O detector mais utilizado é o de ultravioleta, mas conta-se, atualmente, com os de infravermelho e radioatividade.

7.4.2.3. Cromatografia gasosa (CG)

É utilizada para a análise de moléculas apolares, mas tem também um uso versátil para outras subtâncias. Muitos pesticidas podem ser analisados pelo HPLC ou pelo CG. Geralmente, um dos métodos é vantajoso para um determinado caso e, por isto, recomenda-se que um bom laboratório de análise de resíduos disponha de ambos os equipamentos. A cromatografia gasosa permite o uso de uma grande variedade de detectores, como o de ionização de chama (FID), mais comumente utilizado, o de captura de elétrons (ECD), ideal para a análise de organoclorados, e um detector específico para nitrogênio e fósforo (NPD). O espectrômetro de massa (MS) é normalmente acoplado a um cromatógrafo gasoso. O CG-MS é um equipamento caro, que permite uma ótima identificação da substância correspondente a cada pico do cromatograma.

7.5. Onde ocorre a biodegradação

Como já citado no início deste capítulo, a biodegradação está presente em todos os ambientes. Contudo, nos itens subseqüentes são descritos sucintamente apenas os processos que envolvem o solo

como ambiente de grande potencialidade na degradação dos xenobiontes. A biodegradação é um recurso utilizado em diversas situações, tais como aterros sanitários e estações de tratamento de águas domésticas e efluentes industriais, constituindo um tema amplo cuja abordagem foge ao objetivo deste trabalho (Fuller et al., 1985).

7.5.1. A biodegradação dos pesticidas em solos agrícolas

A aplicação repetida de pesticidas no solo não poderia ser feita se não houvesse biodegradação. No estudo da biodegradação, tem-se que discriminar o desaparecimento do produto aplicado e a biodegradação propriamente dita. Os pesticidas aplicados no solo podem sofrer volatilização, lixiviação e adsorção forte aos colóides do solo, desaparecendo, assim, das análises químicas do resíduo feitas por extração com solvente orgânico, sem que isto possa ser interpretado como biodegradação **(Figura 7.5)** (Jury et al., 1987; Wolf et al., 1988). É essencial fazer estudos com o pesticida marcado, geralmente com carbono-14, utilizando microcosmos adequados, que permitam acompanhar os diferentes destinos dos pesticidas e seus metabólitos e efetuar um balanço completo de massa **(Figura 7.6)** (Scheunert, 1992; Schroll et al., 1992).

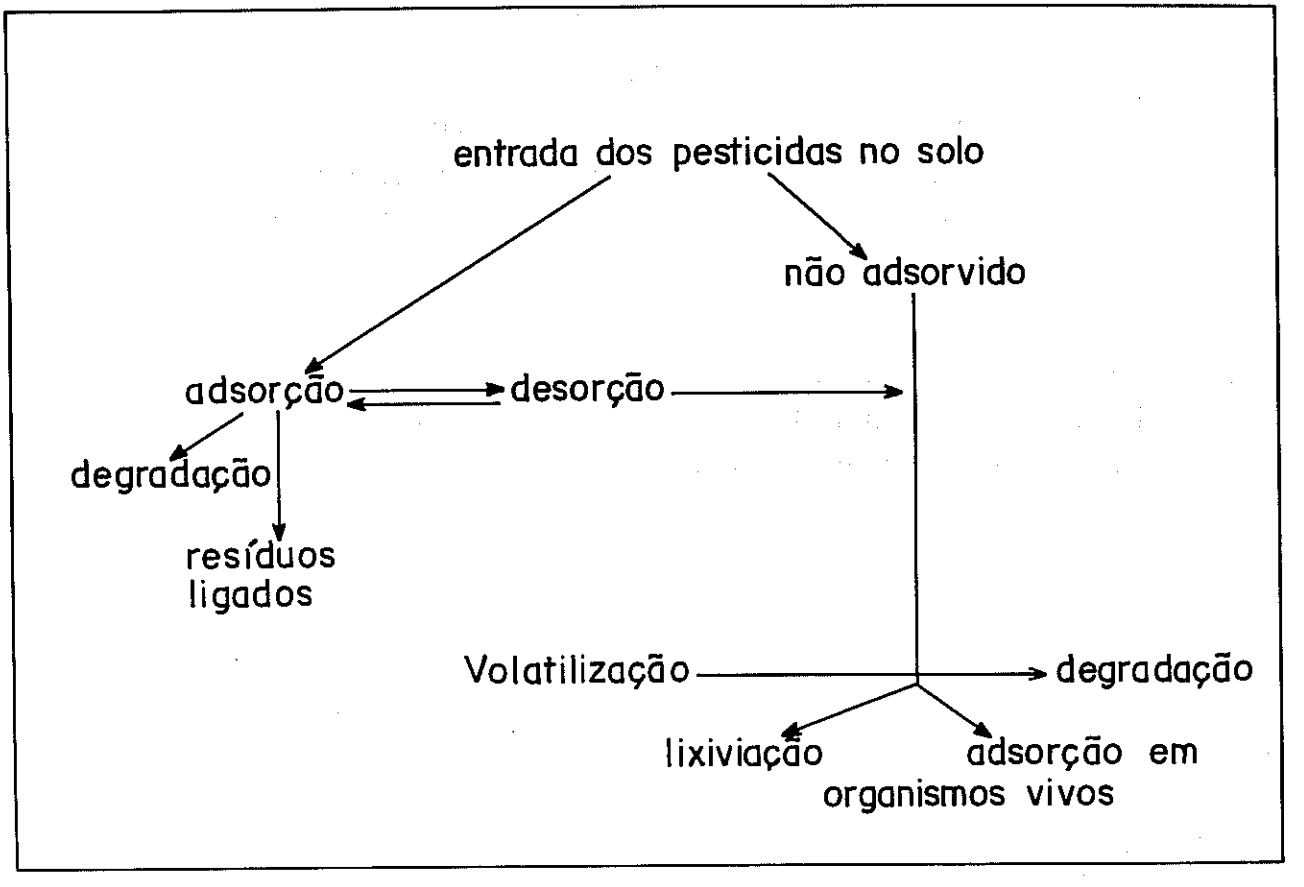


Figura 7.5. Distribuição e degradação dos pesticidas no solo.

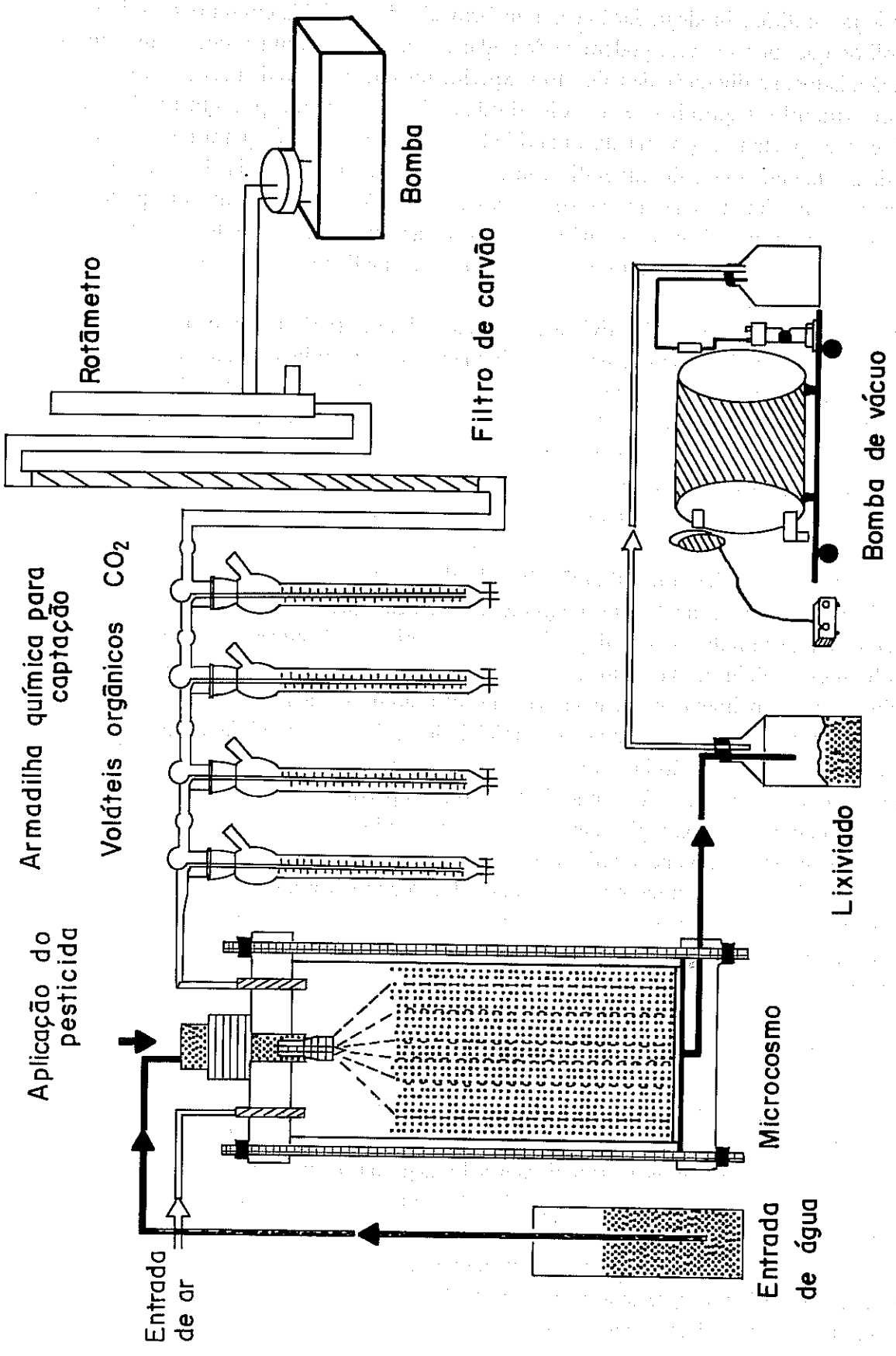


Figura 7.6 Esquema da montagem experimental para estudo da distribuição dos pesticidas solo.

Como já foi dito, a biodegradação é a transformação do pesticida em outros produtos chamados metabólitos que, por sua vez, podem se degradar novamente, em um processo que culmina na mineralização, isto é, na liberação de CO_2. Em experimentos de balanço de massa, o CO_2 marcado é captado em armadilhas químicas e a radioatividade é quantificada por cintilação líquida. A biodegradação é, portanto, a soma da quantidade dos metabólitos à quantidade de pesticidas mineralizados. Quando a taxa de mineralização é baixa não há uma degradação completa, embora, freqüentemente, o produto tenha se transformado em um metabólito recalcitrante, que pode ser tóxico às plantas ou aos microrganismos. A análise destes metabólitos não é simples e só pode ser feita corretamente se o processo analítico for adequado para esta finalidade. Geralmente, o que se mede é o resíduo do pesticida .

Quando a quantidade de radioatividade não-passível de extração por solvente orgânico e, portanto, fortemente adsorvida no solo, é grande, a lixiviação de contaminantes para o lençol d'água e a biodegradação são pequenas. A forma química em que se encontra o material radioativo, assim adsorvido no solo, não é conhecida. Neste caso, as análises são dificultadas por não permitirem identificar os compostos ligados à matéria orgânica ou à argila do solo (Kahn, 1978). A presença de resíduos e/ou metabólitos fitotóxicos no solo constitui motivo de preocupação, pois eles podem ser absorvidos pelas plantas ao longo do tempo, acarretando a contaminação dos alimentos (Fuhr, 1987).

7.5.2. Biorremediação e descontaminação do subsolo poluído

A biorremediação constitui um conjunto de técnicas que permitem aumentar a biomassa microbiana do solo, estimulando a biodegradação de xenobiontes (Bouwer, 1993). Assim, áreas contendo xenobiontes recalcitrantes podem ser descontaminadas. Como já foi dito, o subsolo tem população microbiana, principalmente bacteriana, na concentração de 10^6 a 10^7 de células.mg^{-1} solo seco. São encontrados fungos apenas na camada superficial, de até 1,5m. À medida que a profundidade do solo aumenta, passa-se da região insaturada de água, chamada vadose, para a saturada, onde a água subterrânea está em movimento. Ao longo deste eixo da superfície para as camadas mais profundas atravessa-se, inicialmente, uma região aeróbia para, em seguida, encontrar-se uma região anaeróbia **(Figura 7.7)**. Com isto, o potencial redox diminui de eletronegatividade, que passa de positiva para negativa. Há, evidentemente, uma mudança na população de microrganismos, que nas regiões mais superficiais são aeróbios, realizando a biodegradação por reações de oxidação. Na região um pouco mais profunda, onde a eletronegatividade é menor, ocorrem reações de desnitrificação. Estas reações são importantes na transformação de grupos funcionais de carboxilas e alcoilas ligadas ao anel aromático. Como exemplo disto citam-se o benzeno, tolueno, xileno, p-cresol etc. Na ausência de oxigênio, as oxidases não funcionam, mas foi constatado que o oxigênio utilizado é proveniente da água.

Em camadas ainda mais profundas e eletronegativas, existem as bactérias sulfato-redutoras e as metanogênicas. Estas últimas são particularmente importantes na declorinação de organoclorados, cujas moléculas tenham muitos átomos. Verificaram-se, em PCBs, a dehalogenação parcial de até 30%, com a formação de produtos intermediários de biodegradação, por vezes muito tóxicos. Quando a molécula tem poucos átomos de cloro, as reações de oxidação são mais eficazes. Nos processos de biorremediação, pode-se alternar a dehalogenação anaeróbia, com uma degradação posterior final aeróbia. A pesquisa com tetracloroetileno mostrou que desta forma é possível degradar inteiramente esta molécula. Não se deve desprezar a capacidade das bactérias sulfato- redutoras e do ácido sulfídrico de mediar uma condição redutora capaz de promover biodegradação.

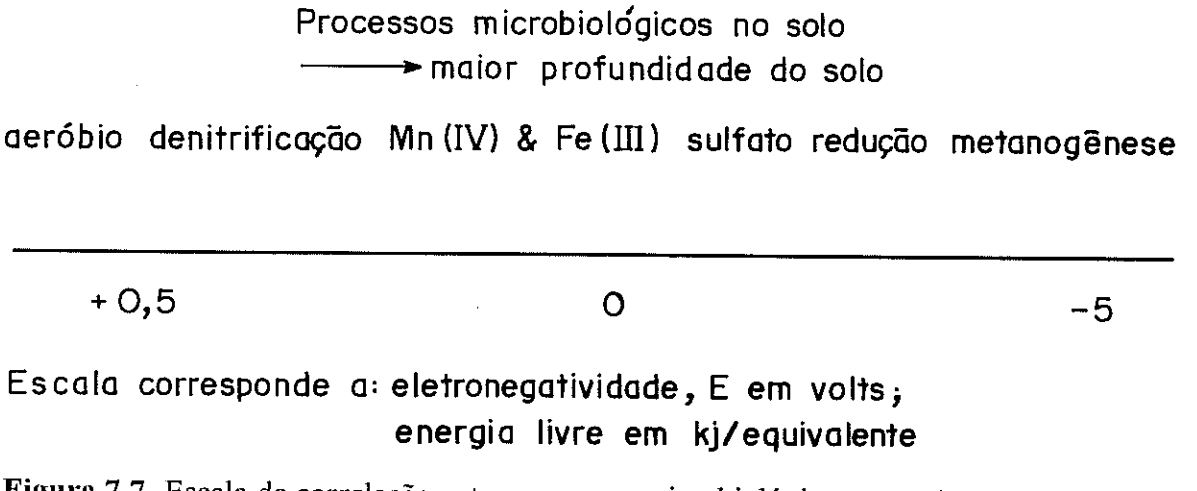


Figura 7.7 Escala de correlação entre processos microbiológicos com eletronegatividade e energia livre ao longo da profundidade do solo.

A biorremediação é a manipulação das condições que podem favorecer a biodegradação por microrganismos (Tursman & Cork, 1992). Inicialmente, é necessário conhecer a extensão hidrogeológica do local a ser biorremediado. O passo que se segue consiste em suprir a comunidade microbiana com energia, pois o contaminante quase sempre está presente em concentrações muito baixas, não suprindo a demanda energética necessária para estimular o metabolismo microbiano. A biodegradação ocorre por cometabolismo ou pelo fato de o contaminante ser análogo à fonte de carbono introduzida, sendo assim degradado casualmente. Para isto é necessário construir dois poços localizados nos limites extremos da área contaminada e à profundidade adequada para alcançar a região saturada. Deve-se injetar nutrientes, como NO_3^- ou P, ou gases, como oxigênio ou metano, na extremidade do poço, a partir da qual o fluxo da água subterrânea movimenta estes nutrientes por toda a área poluída até que eles sejam captados no poço de sucção **(Figura 7.8)**.

Hoje em dia, ganham dimensões maiores os problemas de contaminação da água potável no subsolo e nos aqüíferos, crescentemente utilizados para o abastecimento de água potável. A introdução de microrganismos obtidos no laboratório com alta capacidade de degradação do poluente encontra seus limites de adaptação de ambientação, pois muitas vezes eles não sobrevivem no ambiente. Este é o motivo pelo qual a biorremediação, por estimular os microrganismos locais, tem mostrado melhores resultados na prática.

7.5.3. O uso do solo para a biodegradação de xenobiontes, ou "land farming"

É o processo que utiliza o solo superficial para a biodegradação de xenobiontes. Neste caso, o solo, com suas excelentes propriedades de biodegradação, é utilizado como um grande reator. Aplica-se o poluente e, logo em seguida, o solo é revolvido. Adicionam-se nutrientes e umidade suficientes para estimular a biomassa microbiana. Deixa-se incubar como uma compostagem. Há uma série de práticas que podem ser utilizadas para otimizar a degradação do poluente. é essencial controlar o desaparecimento dos poluentes de modo a permitir a colocação de nova carga, assim como monitorar os lençóis d'água para evitar sua contaminação.

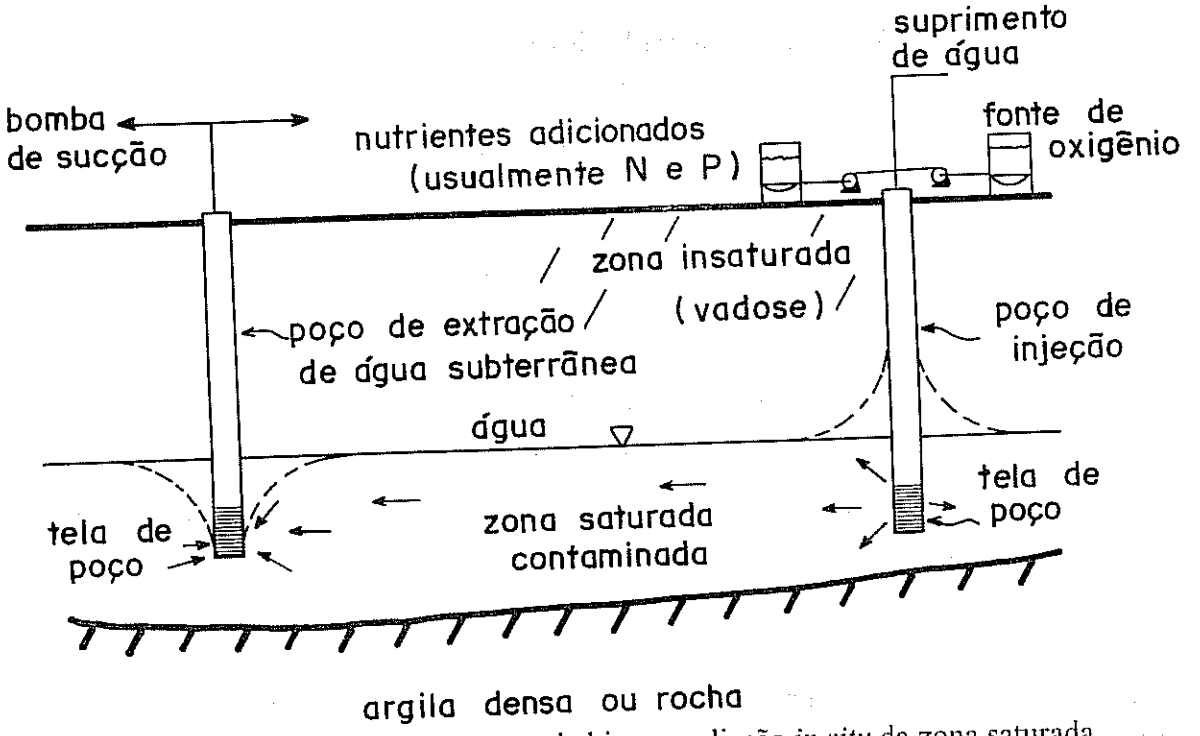


Figura 7.8. Esquema básico do processo de biorremediação *in situ* da zona saturada.

7.6. Por que nem Todos os Xenobiontes são Degradados no Ambiente?

Consta da literatura a persistência no ambiente de muitos xenobiontes, como o DDT, para os quais são conhecidos diversos microrganismos capazes de biodegradá-los. Como explicar esta aparente contradição? Os limites de biodegradação não são dados pela existência ou ausência de enzimas e vias metabólicas, mas pelo acesso destas enzimas às moléculas de xenobiontes. As substâncias mais persistentes são, sobretudo, as lipofílicas, que se incorporam facilmente a outras substâncias lipofílicas da matéria orgânica do solo ou do sedimento, ou aos lipídios das membranas de plantas, animais e microrganismos. Este processo de incorporação evita a exposição dessas moléculas a enzimas ou processos químicos de degradação. A grande estabilidade no solo ou nos sedimentos de componentes orgânicos, como o ácido húmico, fúlvico e a humina, proporciona ao xenobionte um logradouro protegido e estável, garantindo alta persistência neste ambiente. Os xenobiontes, bioacumulados e assim protegidos na membrana, ganham longevidade, pois, mesmo com a morte celular, os restos das membranas são incorporados com grande freqüência a outras células e, a exemplo do que ocorre na biomagnificação, também a outras formas de vida.

Este processo de bioacumulação e persistência de xenobiontes na biosfera só pode ser controlado adequadamente de forma preventiva. Este é o motivo pelo qual a maior ou menor biodegradabilidade de uma substância é o aspecto mais importante para a permissão de seu uso.

7.7. Referências Bibliográficas

BOUWER, E.J. Bioremediation of organic contaminants in the subsurface. In: MITCHELL, R **Environmental Microbiology**: ed. New York: Wiley-Liss, 1993. p.287-318.

BOYLE, M. The importance of genetic exchange in degradation of xenobiotic chemicals. In: MITCHELL, R. ed, **Environmental microbiology** New York: Wyley Liss, 1993. p.319-33.

CLARKE, P.H. The evolution of degradative pathways. In GIBSON, D.T. ed. **Microbial degradation of organic compounds.** New York.: Marcel Dekker, 1984. p.11-27.

CONNELL, D.W. Evaluation of the concentration factor, biomagnification factor, and related physiochemical properties of organic compounds. In: CONNELL, D.W. ed. **Bioaccumulation of xenobiotic compounds**. Boca Raton: CRC Press Inc , 1990. p.9-46.

DEELEN, C. L. Methods or assessing the risk of environmental contamination. In: SEIP, H.M.; HEILBERG, A.B. **Risk Management of chemicals in the environment**. New York: Plenum Press, 1989. p. 25-35.

DOROUGH, H. W.; BALLARD, S. K., 1982. Degradation of pesticides by animals In: MATSUMURA, F.; MURTI, C.R.K. ed. **Biodegradation of Pesticides** New York :Plenum Press, 1982. p. 3-20.

FREHSE, H. **Pesticide chemistry. Advances in international research development and legislation**. Weinheim: VCH Publish Inc., 1991.

FUHR, F. **Non-extractable pesticide residue in soil**. s.l.: IUPAC, 1987.

FULLER, W. H. AND WARRICK, A.W. Soil as a waste treatment system. In: Soil in waste treatment and utilization. Land treatment. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 195-261.

HARDMAN, J. Biotransformation of halogenated compounds. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.11, p.1-40, 1991,

HASSAL, K.A. **The biochemistry and uses of pesticides. Structure metabolism, mode of action and uses in crop protection**. New York: VCH Publish Inc., 1990.

IAEA. Agrochemicla residue-Biota interactions in soil and aquatic ecosystems. Viena: IAEA, 1980.

JURY, W.A., WINER, A.M., SPENCER, W.F.; FOCHT, D.D. Transport and transormation of organic chemicals in the soil-avi-water ecosystem . In: Ware, E.W. ed. **Reviews of environmental contamination and toxicology**. New York: Springer-Verlag, 1987. p. 120-164.

KAHN, S.U. The interaction of organic matter with pesticides. In SCHNITZER, M.; KAHN, S.U. **Organic matter**. Amsterdam: Elsevier,. 1978. p.137-166.

KOCH, A.L. Genetic response of microbes to extreme challenges. **J. Theor. Biol.**, v. 160, p.1-24, 1993.

MATSUMURA, F. Degradation of pesticides in the environment by microorganisms and sunlight. In.: MATSUMURA, F.; MURTI, C.R.K. ed. **Biodegradation of pesticides**. New York:. Plenum Press, 1982.. p.67-87

RACKE, K.D.; COATS, J. R. **Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment**. Washington: American Chemistry Society, 1990.

SCHEUNERT, I. Transformation and degradation of pesticides in soil. In: EBING, W ed. **Chemistry of plant protection**. New York: Springer-Verlag, 1990. p.23-75.

SCHEUNERT, I. Fate of pesticides in plants and in soil fauna. In: EBING, W. ed. **Chemistry of plant protection, Terrestrial behaviour of pesticides**. v.8. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p.77-103.

SCHROLL, R.; LANGENBACH, T.; CAO, G.; DÖRFLER, U.; SCHNEIDER, P.; SCHEUNERT, I. Fate of ^{14}C-terbutylazine in soil-plant systems. **Sci. Total Environ., 123/124**, 377-389. 1992

SHIMABUKURO, R.H.; LAMOUREUX, G.L; FREAR, D.S. Pesticide metabolism in plants reactions and mechanisms. In: Matsumura, F.; Murti, C. R. K. ed. **Biodegradation of pesticides**. New York: Plenum Press, 1982. p. 21-66.

SLATER, J.H.; LOVAT, D. Biodegradation and the significance of microbial communities. In: GIBSON, D.T. ed. **Microbial degradation of organic compounds**. NewYork: Marcel Dekker, 1984. p.439-485.

SOMMERWILLE, L; GREAVES, M. P. **Pesticide effect on soil microflora**. London : Taylor & Francis, 1987.

TURSMAN, J. F.; CORK, D. J. Subsurface contaminant bioremediation engineering. Crit. Rev. Environ.. Control, v.22, p.1-26, 1992.

WOLF, K; van den BRUNK, W. J.; COLON, F. J. **Contaminated soil**. Dordrecht: Kluwer, 1988

ZITKO, W. Methods for chemical characterization of biodegradation. In: GIBSON, D.T. ed. **Microbial degradation of organic compounds**. 42nd. ed. New York: Marcel Dekker. 1984. p.29-42.