

JORGE FERREIRA KUSDRA

**INFLUÊNCIA DO OLIGOCHAETA EDÁFICO *Amyntas* spp.
E DO *Rhizobium tropici* NO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. Área de Concentração Ciência do Solo. Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Jair Alves Dionísio

CURITIBA

1998



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-CIÊNCIA DO SOLO
C.P. 2959, FONE 041-350-5648, FAX 041-2523689 CURITIBA PR 80.035
E-mail: pgcisol@agrarias.ufpr.br

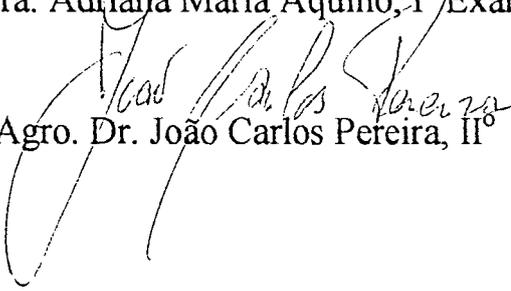
PARECER

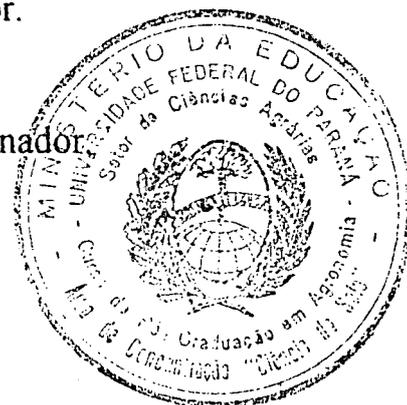
Os Membros da Comissão Examinadora, designados pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo", para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pelo candidato **JORGE FERREIRA KUSDRA**, com o título: "**Influência do Oligochaeta edáfico *Amyntas* spp. e do *Rhizobium tropici* no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**" para obtenção do grau de Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo" do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, são de Parecer pela "APROVAÇÃO" da Dissertação com média 9,2 - conceito "A" completando assim, os requisitos necessários para receber o diploma de Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo".

Secretaria do Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo", em Curitiba 08 de dezembro de 1998.


Prof. Dr. Jair Alves Dionísio, Presidente.


Dra. Adriana Maria Aquino, I^o Examinador.


Engo. Agro. Dr. João Carlos Pereira, II^o Examinador



OFEREÇO

A minha esposa ELIANA e minha filha RAISSA

DEDICO

A meu pai INÁCIO

que, lamentavelmente, faleceu no decorrer deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Jair Alves Dionísio, mais que um orientador, um grande amigo.

A amiga Ionete Hasse cuja contribuição foi fundamental na realização deste trabalho.

A minha mãe Jacira que além, de responsável pela minha existência e educação, ofereceu a minha família toda a infraestrutura necessária no decorrer deste período de Mestrado.

A Universidade Federal do Acre que liberou-me das atividades de ensino para que pudesse dar continuidade a formação acadêmica.

A Universidade Federal do Paraná, em particular ao Curso de Pós Graduação em Agronomia - Área de Concentração Ciência do Solo pela oportunidade concedida.

A CAPES/PICDT pelo apoio financeiro recebido na forma de bolsa de estudo.

As laboratoristas Elda e Ana pela colaboração prestada.

Ao secretário do Curso de Pós-Graduação Gerson Novicki pelo excelente atendimento sempre que necessitei de seus préstimos.

Aos membros da banca examinadora pela análise crítica desta dissertação.

Aos professores do Departamento de Solos e Fitotecnia, em particular aos que me ministraram disciplinas, pelas informações técnicas recebidas.

Aos colegas de curso pela convivência amigável e participativa.

Ao incentivo recebido de meus irmãos Simone e Germano bem como de suas famílias constituídas por Erivaldo, Jane, Sara e Nicole.

A avó Julia e tia Nadir que tem uma grande parcela de contribuição na minha educação.

A minha esposa e minha filha que souberam compreender os momentos de renúncia em prol da realização deste trabalho.

Aos amigos do Estado do Acre Eny, Oliveira, Ênio, Elisângela, Joel, Janete, Felner, Socorro e Eliene.

Enfim, a todos que, embora não citados, direta ou indiretamente, de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	vi
	RESUMO	viii
	ABSTRACT	ix
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MACRO E MICROSSIMBIONTE	6
2.1.1	MACROSSIMBIONTE (PLANTA HOSPEDEIRA – FEIJOEIRO)	6
2.1.2	MICROSSIMBIONTE (BACTÉRIA – RIZÓBIO)	9
2.2	DISTRIBUIÇÃO E FONTES DE NITROGÊNIO	11
2.3	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO (FBN)	14
2.3.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
2.3.2	MECANISMO BIOQUÍMICO	15
2.3.3	SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSAS	16
2.3.3.1	FORMAÇÃO E FUNCIONAMENTO DOS NÓDULOS	18
2.3.3.2	ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO FIXADO	20
2.3.3.3	INOCULAÇÃO DE SEMENTES	21
2.3.3.4	FATORES QUE INTERFEREM NA NODULAÇÃO E FBN	24
2.3.3.4.1	REFERENTES A PLANTA HOSPEDEIRA	25
2.3.3.4.2	REFERENTES AO RIZÓBIO	30
2.3.3.4.3	REFERENTES AO SOLO	33
2.4	MICROORGANISMOS PROMOTORES E INIBIDORES DO CRESCIMENTO DE PLANTAS	37

2.5	MINHOCAS (OLIGOCHAETAS EDÁFICOS)	39
2.5.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS	39
2.5.2	ALIMENTAÇÃO, EXCREÇÃO E HÁBITOS COMPORTAMENTAIS.....	44
2.5.3	MANEJO POPULACIONAL	47
2.5.4	INFLUÊNCIA NAS PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO	48
2.5.5	INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE E DISPERSÃO MICROBIANA	52
2.5.6	INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO DAS PLANTAS	57
3	MATERIAL E MÉTODO	60
3.1	EXPERIMENTO I	60
3.2	EXPERIMENTO II	64
3.3	EXPERIMENTO III	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1	POPULAÇÕES DE RIZÓBIO	68
4.2	NÚMERO E BIOMASSA DE MINHOCAS	69
4.3	PARÂMETROS DO FEIJOEIRO	72
4.3.1	ANÁLISE DAS MÉDIAS	72
4.3.2	ANÁLISE DOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR	89
4.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
5	CONCLUSÕES	94
	APÊNDICE	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE TABELAS

1. AVALIAÇÕES QUANTITATIVAS DAS DENSIDADES E BIOMASSAS DE MINHOCAS ADICIONADAS E RECUPERADAS NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM ESTUFA UTILIZANDO VASOS COMO UNIDADES EXPERIMENTAIS. TOTAIS POR TRATAMENTO. QUATRO REPETIÇÕES 70

2. AVALIAÇÕES QUANTITATIVAS DAS DENSIDADES E BIOMASSAS DE MINHOCAS ADICIONADAS E RECUPERADAS NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO UTILIZANDO TUBOS COMO UNIDADES EXPERIMENTAIS. TOTAIS POR TRATAMENTO. QUATRO REPETIÇÕES 71

3. EFEITO DE MINHOCAS E INOCULANTE NOS PARÂMETROS AVALIADOS NO FEIJOEIRO, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM ESTUFA, USANDO VASOS COMO UNIDADES EXPERIMENTAIS. MÉDIAS DE QUATRO REPETIÇÕES. DUAS PLANTAS/VASO 73

4. EFEITO DE MINHOCAS E INOCULANTE NOS PARÂMETROS AVALIADOS NO FEIJOEIRO, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO, USANDO TUBOS DE PVC COMO UNIDADES EXPERIMENTAIS. MÉDIAS DE QUATRO REPETIÇÕES. DUAS PLANTAS/TUBO 74

5.	VARIAÇÕES PERCENTUAIS NOS PARÂMETROS DO FEIJOEIRO, DEVIDO A INOCULAÇÃO DE MINHOCAS, EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE (NÍVEL 0M), SEM MINHOCAS, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM VASOS	80
6.	VARIAÇÕES PERCENTUAIS NOS PARÂMETROS DO FEIJOEIRO, DEVIDO A INOCULAÇÃO DE MINHOCAS, EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE (NÍVEL 0M), SEM MINHOCAS, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM TUBOS	80
7.	VARIAÇÕES PERCENTUAIS NOS PARÂMETROS DO FEIJOEIRO, DEVIDO A INOCULAÇÃO DE <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077, VIA INOCULANTE PÓ (TURFA), EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE (NÍVEL NI), NÃO INOCULADO, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM VASOS	86
8.	VARIAÇÕES PERCENTUAIS NOS PARÂMETROS DO FEIJOEIRO, DEVIDO A INOCULAÇÃO DE <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077, VIA INOCULANTE PÓ (TURFA) E LÍQUIDO (FLUIDO), EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE (NÍVEL NI), NÃO INOCULADO, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM TUBOS	86
9.	COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM TUBOS (INTERAÇÃO ENTRE 48 PARES DE PONTOS – 12 TRATAMENTOS X 4 REPETIÇÕES) E VASOS (INTERAÇÃO ENTRE 32 PARES DE PONTOS – 8 TRATAMENTOS X 4 REPETIÇÕES)	91

INFLUÊNCIA DO OLIGOCHAETA EDÁFICO *Amyntas* spp. E DO *Rhizobium tropici* NO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)¹

Autor: Jorge Ferreira Kusdra

Orientador: Prof. Dr. Jair Alves Dionísio

RESUMO

O presente trabalho foi executado visando investigar a influência da inoculação do Oligochaeta edáfico *Amyntas* spp. ("minhoca louca") e *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, sobre os parâmetros de matéria seca da parte aérea, da raiz, dos nódulos e da planta, número de nódulos e nitrogênio total da parte aérea do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) pertencente a variedade FT-Nobre. Para cumprir esse objetivo foram instalados três experimentos sendo os dois primeiros conduzidos em condições distintas de ambiente, fertilidade do solo e unidade experimental, sob a forma de um arranjo inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro repetições, considerando como um fator as minhocas, com quatro níveis e o outro fator o inoculante, com dois níveis em um experimento e três no outro. O terceiro experimento foi destinado a estimar as populações de rizóbios estabelecidas no solo utilizado nos experimentos anteriores. De um modo geral os resultados evidenciaram uma redução nos parâmetros avaliados devida a ambas as inoculações sendo, porém, os decréscimos significativos relacionados principalmente com a inoculação das minhocas. Concluiu-se que, nas condições experimentais estabelecidas, a presença das minhocas caracterizou-se em efeitos negativos as plantas e a inoculação das sementes com o rizóbio não foi capaz de promover acréscimos nos parâmetros avaliados.

¹ Dissertação de Mestrado em Agronomia – Área de Concentração Ciência do Solo
Setor de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Paraná
Curitiba – PR, Dezembro, 1998, 125 p.

INFLUENCE OF EDAFIC OLIGOCHAETA *Amyntas* spp. AND OF THE *Rhizobium tropici* IN BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)¹

Author: Jorge Ferreira Kusdra

Adviser: Prof. Dr. Jair Alves Dionísio

SUMMARY

The present work was performed seeking to investigate the influence of inoculation of edafic Oligochaeta *Amyntas* spp. ("crazy earthworm") and of the *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 on the parameters of dry matter of the aerial part, of the root, of the nodules and of the plant, number of nodules and total nitrogen of the aerial part of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) belonging the variety FT-Nobre. To execute that objective three experiments they were installed being the two first driven in different conditions from environment, fertility of the soil and experimental unit, under the form of an arrangement entirely randomized, in outline factorial, with four repetitions, considering as a factor the earthworms, with four levels, and the other factor the inoculant, with two levels in an experiment and three in the another. The third experiment was destined to esteem the established rizobios populations in the soil used in the previous experiments. In a general way the results evidenced a reduction in the appraised parameters owed to both inoculations being, even so, the significant decrease related mainly with the inoculation of the earthworms. It was ended that, in the established experimental conditions, the presence of the earthworms was characterized in negative effects to the plants and the inoculation of the seeds with the rizobio was not capable to promote increments in the appraised parameters.

¹ M. Sc. of Dissertation in Agronomy – Area of Concentration Soil Science
Section of Agrarian Sciences – Federal University of Parana
Curitiba – PR, December, 1998, 125 p.

1 INTRODUÇÃO

O feijão representa uma das principais fontes de proteína da alimentação básica da população brasileira, sendo consumido por praticamente todas as classes de renda do país. Porém, embora constitua-se em um alimento de grande importância nutricional, o rendimento médio nacional de 588 kg/ha (IBGE, 1997) é um dos mais baixos do mundo.

Sendo uma cultura de ciclo curto, dentre os fatores que limitam a obtenção de um rendimento mais elevado, está a exigência de quantidades relativamente altas de nutrientes, especialmente o nitrogênio, em um período de tempo relativamente pequeno. Como a maioria dos solos brasileiros geralmente apresentam baixa disponibilidade nutricional, é necessário suprir esta demanda com a utilização de fertilizantes químicos.

Entretanto, o nitrogênio, fundamental para o crescimento e produção das plantas, é um dos elementos de maior custo ao produtor não só pelo valor do insumo como, também, pelos gastos com mão de obra devido, muitas vezes, às grandes áreas cultivadas e a necessidade de aplicações freqüentes. Além de onerosa a adição de nitrogênio na forma de fertilizante é considerada pouco eficiente em decorrência de um aproveitamento muitas vezes inferior a 50% do total aplicado ao solo. Além disso, o nitrogênio não utilizado pela cultura pode ainda vir a causar danos ao meio ambiente, ocasionando desequilíbrios ecológicos pela poluição e contaminação de recursos hídricos.

É característica das plantas leguminosas a capacidade de interação simbiótica mutualista de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium* que em troca de produtos fotossintatos, promovem a fixação direta do nitrogênio atmosférico (N_2), permitindo a transferência de compostos nitrogenados à planta hospedeira através dos nódulos radiculares. A importância desse fato reside na possibilidade de, através da introdução de estirpes consideradas eficientes na fixação biológica do

nitrogênio, via inoculação de sementes, algumas culturas como a soja, por exemplo, tornarem-se praticamente autosuficientes em nitrogênio e independentes de qualquer fonte adicional deste nutriente.

Desta forma, a fixação biológica do nitrogênio representa uma grande economia de adubos nitrogenados, que deixam de ser utilizados, sendo substituídos pela inoculação das sementes, método alternativo de custo extremamente menor do que a adubação química.

Entretanto, se para a cultura da soja, a inoculação representa uma redução no custo de produção, no feijão os benefícios obtidos ainda não satisfazem as expectativas quanto a utilização dessa prática. Isto porque nessa cultura evidenciam-se problemas que dificultam ou comprometem a substituição das adubações nitrogenadas pela obtenção do nitrogênio via fixação biológica.

Uma das principais limitações têm sido as altas populações de estirpes estabelecidas, competitivas por sítios de infecção nodular e de baixa eficiência na fixação do nitrogênio, as quais dificultam um melhor desempenho por parte de estirpes mais eficientes introduzidas pela inoculação das sementes. Além disso, a simbiose no feijoeiro é muito sensível a estresses ambientais como altas temperaturas e a acidez do solo. Outra limitação para realização satisfatória da simbiose é o curto ciclo vegetativo do feijoeiro que não permite o acúmulo de quantidades de nitrogênio suficientes o bastante para obtenção de uma produção elevada por meio biológico.

A identificação de pares simbióticos (variedade de feijão x estirpe de rizóbio) eficientes na nodulação e fixação biológica do nitrogênio, menos sensíveis a estresses ambientais e formados por rizóbios competitivos por sítios de infecção nodular, capazes de superar as estirpes estabelecidas, constitui-se em uma das principais condições para obtenção de maiores benefícios deste processo biológico na cultura do feijão.

Em um 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 (ARAUJO, 1994a). Porém, muitos estudos ainda são necessários para melhor conhecer a interação simbiótica do feijão e eliminar a necessidade de adubação nitrogenada para essa cultura. O importante é sempre considerar que a fixação do N_2 ocorre através de um processo simbiótico em que estão envolvidos dois parceiros sob a influência do meio ambiente. Esse aspecto nunca deve ser esquecido para que realmente sejam conseguidos progressos no aproveitamento agrícola da fixação do nitrogênio em feijão (ARAUJO & HENSON, 1988).

De acordo com ARAUJO (1994a) referências mostrando haver uma correlação positiva e significativa entre a quantidade de tecido nodular ativo e a quantidade de nitrogênio acumulado em plantas de feijão dependentes do nitrogênio fixado sugerem que uma estratégia que resulte em mais nódulos por planta pode contribuir com maior fixação de nitrogênio para a cultura.

Os oligoquetas edáficos ou terrestres, mais conhecidos como minhocas, em função de seu contínuo deslocamento no solo, poderiam vir a constituir-se em uma estratégia capaz de promover maior nodulação na planta, em decorrência da possibilidade de realizarem a dispersão dos rizóbios para regiões do sistema radicular que provavelmente não seriam atingidas pelos mesmos na ausência destes animais.

Segundo BROWN (1995) é possível que a dispersão de células pela atividade de deslocamento da minhoca no perfil do solo se processe tanto externamente, através da superfície de seu corpo, quanto internamente, por meio das bactérias, presentes nos excrementos, que sobrevivem à passagem pelo seu intestino.

No feijoeiro a atividade das minhocas no solo possivelmente faça com que o inoculante atinja maior número de raízes secundárias as quais segundo WOLIN et al. (1989) tem grande importância na fixação biológica do nitrogênio nesta cultura. Tal fato é destacado por ARAUJO (1994a) que sugere que se os nódulos formados nas raízes secundárias tem 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 do que as estabelecidas no solo.

Nesse sentido as minhocas podem ser capazes de fazer com que rizóbios selecionados quanto a eficiência na fixação do nitrogênio, introduzidos pela inoculação das sementes, atinjam as raízes secundárias do feijoeiro.

Segundo EDWARDS & BOHLEN (1996) uma das principais limitações na colonização efetiva das raízes por bactérias benéficas do solo é sua capacidade mínima de dispersarem-se através do solo. De acordo com esses autores, os métodos usados para introduzir microrganismos benéficos ao solo e as plantas como, por exemplo, inoculação de sementes ou do próprio solo, quando usados em campo, geralmente restringem a distribuição do inóculo a uma pequena porção em relação ao volume total disponível às raízes das plantas.

A interferência positiva das minhocas na dispersão de rizóbios através do solo tem sido relatada por vários autores (BROWN, 1995; EDWARDS et al., 1995, EDWARDS & BOHLEN, 1996; DOUBE et al., 1994; STEPHENS et al., 1994; HEIJNEN & MARINISSEN, 1995).

Além da particular atividade dispersora das minhocas estas podem ser consideradas como agentes condicionadoras do solo devido, principalmente, sua atividade escavadora de galerias e deposição de excrementos, interferindo nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, podendo contribuir para a obtenção de uma melhor condição geral do solo, em particular naqueles com estrutura deficiente favorecendo, assim, o crescimento das plantas e a produção das culturas.

Entretanto, é necessário cautela quando se enfatizam os efeitos benéficos das minhocas ao solo uma vez que, além da grande variabilidade existente entre solos existem, também, inúmeros fatores que o influenciam na expressão de seu potencial produtivo.

Segundo PEREIRA (1988) da mesma forma que existem os que insistem na teoria de que as minhocas nada representam de importante para o solo agrícola, há aqueles com excesso de entusiasmo que proclamam a minhoca como a panacéia para todos seus males. Essas atitudes, ambas extremadas, são incorretas já que há numerosas causas que afetam a produtividade do solo e, as mudanças provocadas pela ação das minhocas, são limitadas a algumas delas. De um modo geral, a atividade das minhocas, por si só, não esclarece as mudanças que dela decorrem.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da inoculação do Oligochaeta edáfico *Amyntas* spp. e *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 sobre o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) pertencente a variedade FT – Nobre.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MACRO E MICROSSIMBIONTE

2.1.1 MACROSSIMBIONTE (PLANTA HOSPEDEIRA – FEIJOEIRO)

Botanicamente o feijoeiro pertence à divisão *Angiospermae*, classe *Dicotyledoneae*, subclasse *Archichlamydae*, ordem *Rosales*, subordem *Leguminosineae*, família *Leguminosae* (*Fabaceae*), subfamília *Faboideae* (*Papilionoideae*), tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolineae*, gênero *Phaseolus* e espécie *Phaseolus vulgaris* L. (DEBOUCK & HIDALGO, 1985; VILHORDO et al., 1988).

É uma planta herbácea levemente pubescente, de hábito de crescimento determinado ou indeterminado (VIEIRA, 1983), constituída de uma haste principal, da qual partem ramos laterais que emergem das axilas das folhas da haste principal. Existem ramos primários que se originam diretamente da haste principal, secundários que se originam dos primários e assim por diante, dependendo da morfologia da planta em função do hábito ou do tipo de crescimento. Na haste principal e nos ramos estão os nós dos quais emanam folhas, ramos e estruturas florais (PORTES, 1988).

Nos cultivares de hábito de crescimento determinado o crescimento vegetativo termina numa inflorescência e são produzidos nós vegetativos após a floração enquanto que, nos de hábito de crescimento indeterminado, o crescimento vegetativo prossegue no talo principal após a floração (MARIOT, 1989).

Segundo ZIMMERMANN & TEIXEIRA (1988) o hábito de crescimento determinado se caracteriza pelo desenvolvimento completo da gema terminal em uma inflorescência e o indeterminado pelo desenvolvimento da gema terminal em

uma guia. Assim, a planta pode caracterizar-se como indeterminada arbustiva, se a guia não tem tendência a trepar, ou trepadora, para aquelas com tendência trepadora. Nos feijões de hábito indeterminado, também chamados de volúveis pela capacidade que tem de se enrolarem em um suporte, o desenvolvimento cessa só por acidente ou em condições desfavoráveis. Em condições favoráveis podem continuar se desenvolvendo por longo tempo (VILHORDO et al., 1988).

Baseado no hábito de crescimento, na produção de nós após a floração e no porte o Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT classificou fenologicamente o germoplasma de feijão em quatro tipos principais: Tipo I – determinado de porte ereto; Tipo II – indeterminado de porte ereto; Tipo III – indeterminado de porte prostrado e Tipo IV – indeterminado volúvel (MARIOT, 1989).

Segundo ALBERINI et al. (1980), os cultivares pertencentes ao Tipo I têm período de floração muito curto, porte baixo e são geralmente precoces e de baixa produtividade; os de Tipo II possuem florescimento cadenciado e guias curtas ou longas; os de Tipo III grande amplitude de florescimento e guias longas e os de Tipo IV, ao qual pertencem geralmente as cultivares de feijão-vagem, um ciclo de vida bastante longo resultando em altas produtividades.

O ambiente não modifica o hábito de crescimento das plantas do Tipo I porém, as de crescimento indeterminado sofrem mudanças em climas mais quentes e com maior umidade relativa, tendendo a apresentar hastes mais longas ou a tornarem-se trepadoras (VIEIRA, 1983). A qualidade de luz, o sombreamento ou dias nublados, por exemplo, sempre causam alongamento das guias do feijoeiro não sendo, portanto, essa característica, por si só, eficiente na diferenciação varietal (ALBERINI et al., 1980).

Segundo FERNÁNDEZ et al. (1985) e MARIOT (1989) o ciclo do feijoeiro é dividido em duas fases, cada uma com cinco etapas, sendo germinação (V0), emergência (V1), folhas primárias (V2), primeira folha trifoliolada (V3) e terceira folha

trifoliolada (V4) etapas características da fase vegetativa (V) e, pré-floração (R5), floração (R6), formação de vagens (R7), enchimento de vagens (R8) e maturação (R9) etapas características da fase reprodutiva (R). A duração de cada uma dessas etapas é definida por características particulares da planta (genótipo e hábito de crescimento) e condições edafo-climáticas (solo e clima).

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 e as do Tipo IV o ciclo mais longo, com mais de 100 dias do plantio à colheita (cultivares tardios). As cultivares dos Tipos II e III apresentam ciclos intermediários, durando cerca de 80 a 100 dias do plantio à colheita (ARAUJO, 1994a).

O desenvolvimento do feijoeiro é inicialmente muito lento e só a partir do vigésimo dia é que a taxa de crescimento torna-se mais intensa atingindo o desenvolvimento máximo quando alcança a idade de 55 – 70 dias (OLIVEIRA & THUNG, 1988).

Estudos sobre o sistema radicular do feijoeiro mostraram que a maior percentagem de raízes, 74,5 a 87,4% do total, está localizada bem próximo a superfície do solo, até 10 cm de profundidade sendo que, a quase totalidade das mesmas, 97,4%, encontra-se nos primeiros 20 cm do solo (VILHORDO et al., 1988).

O feijoeiro é considerado uma planta exigente em nutrientes, em função do pequeno e pouco profundo sistema radicular e do ciclo curto (ROSOLEM & MARUBAYASHI, 1994).

Segundo BALDISSERA & SHERER (1992) o feijoeiro requer quantidades relativamente altas de nitrogênio e potássio e quantidades relativamente baixas de fósforo, cálcio, magnésio e enxofre.

Os nutrientes são obtidos do solo e dos fertilizantes aplicados, com exceção do nitrogênio que, além dessas duas fontes, pode ser obtido pela fixação biológica,

através da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* (OLIVEIRA & THUNG, 1988).

A absorção de nitrogênio ocorre praticamente durante todo o ciclo da cultura, mas a época de maior exigência, quando a velocidade de absorção é máxima, ocorre dos 35 aos 50 dias da emergência da planta, coincidindo com a época de florescimento (ROSOLEM & MARUBAYASHI, 1994).

A adubação nitrogenada freqüentemente tem proporcionado aumentos na produtividade do feijoeiro (PARRA, 1989). Entretanto, há uma tendência de reduzir seu uso devido ao processo de seleção de cultivares eficientes na sua fixação simbiótica (OLIVEIRA & THUNG, 1988).

2.1.2 MICROSSIMBIONTE (BACTÉRIA – RIZÓBIO)

Segundo MELLO et al. (1989), ainda no século passado, foi relatado que a presença de nódulos nas raízes das leguminosas devia-se a ação bacteriana e que as bactérias que habitavam esses nódulos eram capazes de fixar o nitrogênio do ar do solo. Estes microrganismos foram isolados recebendo primeiramente a denominação de *Bacillus radicolola*.

Mais tarde, já neste século, segundo HUNGRIA (1994a) e HUNGRIA et al. (1997), essas bactérias foram classificadas no gênero *Rhizobium* e subdivididas em um critério baseado, principalmente, em suas características fenotípicas, dando origem ao conceito de grupos de inoculação cruzada², que resultou do princípio de que a infecção das plantas pelo rizóbio apresentava certa especificidade de interação. Nas décadas subsequentes outras características fisiológicas, bioquímicas e genéticas passaram a ser consideradas as quais permitiram a divisão

² Conjunto de leguminosas que desenvolviam nódulos, quando inoculadas por bactérias extraídas dos nódulos de qualquer leguminosa do mesmo conjunto.

do *Rhizobium* em dois grupos: de crescimento rápido (*Rhizobium*³ e *Azorhizobium*⁴) e de crescimento lento (*Bradyrhizobium*⁵). A partir de então a taxonomia do rizóbio vem sendo constantemente alterada sendo novas espécies relatadas, subdivididas, reclassificadas ou retiradas da classificação.

Estas bactérias apresentam morfologia variada segundo um ciclo que se cumpre parte no solo e parte nas raízes das leguminosas. Os rizóbios são heterótrofos, Gram negativos, aeróbios, suportam baixas tensões de oxigênio e formam nódulos nas raízes das leguminosas fixando o nitrogênio atmosférico durante o processo simbiótico (VASCONCELOS & ALMEIDA, 1978).

Os rizóbios são conhecidos como bactérias simbióticas que, de modo geral, revelam sua capacidade de fixar N₂ somente quando em simbiose com plantas leguminosas e algumas não leguminosas. No entanto são bactérias telúricas de vida livre e sobrevivem *in situ* às custas de compostos nitrogenados do solo onde continuam a carregar seu equipamento genético, permitindo-lhes fixar o N₂ quando encontram plantas hospedeiras específicas (DROZDOWICZ, 1997).

Segundo ALEXANDER (1980) e URENHA et al. (1994) as bactérias do gênero *Rhizobium* são bastonetes que movem-se através de flagelos, não formam esporos e medem de 0,5 a 0,9 µm de largura por 1,2 a 3,0 µm de comprimento.

Em termos taxonômicos as estirpes que nodulam o feijão foram as que mostraram maiores alterações nos últimos anos (HUNGRIA et al., 1994a). Segundo ARAÚJO (1994a) como resultado da evolução taxonômica do *R. phaseoli*, posteriormente denominado *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, antes considerado como único microssimbionte do feijoeiro, originaram-se dois novos microssimbiontes: *Rhizobium tropici* e, mais recentemente, *Rhizobium etli*.

³ Colônias de 1 mm em 2 dias (tempo de geração de 2,4 a 4,0 h).

⁴ Colônias de 1 mm em 2 dias (tempo de geração de 5,0 h).

⁵ Colônias de 1 mm em 6 a 10 dias (tempo de geração de 7,0 a 13,0 h).

Estas três espécies diferem entre si, por exemplo, com relação a capacidade de reação a estresses ambientais sendo *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *Rhizobium etli* mais sensíveis que *Rhizobium tropici* que têm tolerância a condições de temperatura e acidez mais elevadas e são geneticamente mais estáveis (HUNGRIA et al., 1994a).

2.2 DISTRIBUIÇÃO E FONTES DE NITROGÊNIO

O nitrogênio apresenta ciclo biológico completo na natureza sendo a atmosfera seu reservatório natural (MALAVOLTA, 1980).

Segundo SIQUEIRA & FRANCO (1988) e SIQUEIRA (1993) o nitrogênio constitui aproximadamente 79% da atmosfera terrestre, onde ocorre na forma molecular diatômica, sendo utilizado apenas por microrganismos procarióticos que possuem a maquinaria enzimática capaz de reduzi-lo da forma molecular (N_2) para a forma de amônia (NH_3), através do processo conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN). Assim, embora a atmosfera seja um imenso reservatório de nitrogênio esta forma gasosa, extremamente estável, não é diretamente utilizável por plantas e animais.

Além da FBN o N_2 atmosférico pode ser incorporado ao solo e aos sistemas vivos também através da fixação química, por processo natural (eletroquímico) ou industrial (fertilizantes nitrogenados). Assim pode-se considerar que a fonte primária do elemento no solo é o N do ar (RAIJ, 1991).

Sendo o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico restrito apenas a determinados microrganismos que ocorrem livremente no solo ou em associação com algumas espécies vegetais a disponibilidade de nitrogênio mineral para as plantas está, normalmente, na dependência direta da contínua

decomposição de matéria orgânica ou da aplicação de adubação nitrogenada (ARAUJO & HENSON, 1988).

No solo, o N existe predominantemente em formas orgânicas, em uma enorme variedade de compostos ou radicais. Uma pequena parte do N total do solo encontra-se nas formas minerais de amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-). O íon amônio, sendo um cátion, permanece no solo em forma trocável, adsorvido pelas cargas negativas do solo. Já o nitrato, por ter carga negativa, é repellido pela superfície das partículas do solo, permanecendo na solução, sendo assim muito móvel no solo e suscetível à lixiviação. O nitrito é um ânion, em geral de existência efêmera no solo, sendo rapidamente oxidado a nitrato (RAIJ, 1991).

Os adubos nitrogenados, que representam uma fonte de N em formas assimiláveis pelas plantas, podem ser obtidos de reservas naturais não renováveis, como o salitre do Chile, ou através da fixação industrial do N_2 atmosférico (SIQUEIRA et al., 1994).

De um modo geral, há somente duas fontes de N do solo disponível para as plantas. Uma delas é o N inorgânico, representado pelos teores de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) existentes no solo e ao alcance das raízes. A outra fonte é a matéria orgânica que libera N inorgânico por mineralização (RAIJ, 1991). Assim, a quantidade deste nutriente no solo varia diretamente com o teor de matéria orgânica do mesmo (JORGE, 1988) sendo que, em geral, cerca de 20 a 30 kg de N por hectare são liberados anualmente para cada 1% de matéria orgânica contida no solo (MALAVOLTA, 1996).

De um modo geral, os teores de N nos solos brasileiros não são elevados situando-se na faixa de 0,05 a 0,30 % (HUNGRIA et al., 1994b).

O N no solo está sujeito a um grande número de processos que resultam em transformações de formas orgânicas em inorgânicas e vice-versa e que podem resultar em ganhos ou perdas para o sistema como um todo (RAIJ, 1991).

Segundo MELLO et al. (1989) o N se perde do solo por um ou mais dos seguintes processos: remoção pelas colheitas, lixiviação erosão e, na forma gasosa, pela volatilização da amônia e desnitrificação. Por outro lado é novamente restituído, basicamente de três formas: fixação do N atmosférico, adubação orgânica e adubação mineral (JORGE, 1988). O fornecimento, utilização e perdas do N formam um ciclo complexo denominado ciclo do nitrogênio (HUNGRIA et al., 1994b).

O nitrogênio é o nutriente exigido em maior quantidade para o crescimento das plantas sendo, suas fontes fornecedoras decorrentes, principalmente, da decomposição da matéria orgânica, dos fertilizantes e do processo de fixação biológica (HUNGRIA, 1994a).

Assume posição de destaque dentre os nutrientes necessitados para o desenvolvimento e produção normal das culturas pelas suas funções relevantes na fisiologia das plantas e por se encontrar em quantidades limitantes nos solos, durante o período em que estas mais precisam deste elemento (JORGE, 1988). Assim, embora seja um dos elementos essenciais existentes em maior abundância na natureza é, também, o mais crítico em relação as necessidades das plantas (VIDOR et al., 1983).

No caso do feijoeiro é, também, o elemento mineral requerido em maior quantidade, sendo absorvido tanto na forma amoniacal (NH_4^+) quanto nítrica (NO_3^-). Porém, devido ao intenso processo de nitrificação que ocorre no solo, a forma nítrica é utilizada predominantemente (STONE & SARTORATO, 1994). Segundo MORAES (1988) o ganho na produção de matéria seca dos feijoeiros é de magnitude similar a absorção de nitrogênio dependendo, portanto, do suprimento adequado deste nutriente.

O N é o elemento que estimula o crescimento vegetativo e imprime a coloração verde escura às plantas. Dentro das células o N entra na formação dos aminoácidos, os quais se combinam para compor as proteínas (JORGE, 1988).

Segundo LOPES (1989) como os aminoácidos são constituintes do protoplasma, o nitrogênio participa da manutenção da estrutura e funções celulares sendo também necessário a todas as reações enzimáticas dos vegetais. Além disso, participa também da composição de vitaminas e da molécula de clorofila, estando diretamente envolvido na fotossíntese. Contribui ainda na produção e uso dos carboidratos afetando, também, as reações energéticas.

2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO (FBN)

2.3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em ecossistemas naturais a FBN e a fotossíntese representam os processos básicos responsáveis pela manutenção da vida na Terra (DÖBEREINER, 1986).

A FBN tanto pode ser simbiótica (definida por associações entre microrganismos fixadores e espécies vegetais) quanto assimbiótica (promovida por microrganismos fixadores de vida livre). Na fixação simbiótica o nitrogênio é colocado imediatamente à disposição da planta hospedeira sob a forma de amônia que se combinará com os ácidos orgânicos provenientes da fotossíntese na formação dos aminoácidos. Na fixação assimbiótica o nitrogênio será transformado em formas orgânicas a nível celular microbiano para dar atendimento às suas necessidades metabólicas e só após a sua morte o N orgânico existente na célula microbiana será mineralizado ficando disponível para as plantas (VIDOR et al., 1983).

A capacidade de fixar o N₂ atmosférico confere vantagens competitivas nos ambientes onde este elemento é limitante. Por ser resultado de complexas reações fisiológicas e bioquímicas, muitas vezes envolvendo espécies distintas, a FBN

depende da expressão do potencial genético do microrganismo diazotrófico, do hospedeiro ou de ambos, no caso de sistemas simbióticos (SIQUEIRA, 1993).

2.3.2 MECANISMO BIOQUÍMICO

Segundo FREIRE (1975), HUNGRIA et al. (1994b) e HUNGRIA et. al. (1997) nenhum animal ou planta é capaz de utilizar o N_2 como fonte de proteína devido a tripla ligação existente entre os dois átomos de nitrogênio, uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza. Isto porque não possuem as enzimas necessárias para catalisar a reação de fixação do nitrogênio atmosférico, capacidade esta restrita apenas a alguns microrganismos, incluindo os rizóbios.

A FBN é uma reação bioquímica extraordinária considerando a grande quantidade de energia necessária para romper a tripla ligação da molécula de N_2 (RAIJ, 1991).

Industrialmente, a redução do nitrogênio à amônia consome energia derivada de fontes não renováveis como o petróleo. Neste caso a reação química responsável por esse processo, denominado Haber-Bosch, exige temperatura e pressão muito elevada de modo a possibilitar o rompimento da tripla ligação covalente entre os dois átomos de nitrogênio. A nitrogenase, enzima responsável pela fixação biológica do nitrogênio, é capaz de promover a mesma reação a temperatura ambiente e pressão normal, utilizando energia na forma de ATP, produzido a partir da oxidação de substratos provenientes de processos foto ou quimiossintéticos ou obtido de carboidratos, por respiração ou fermentação (NEVES & RUMJANECK, 1992).

A enzima nitrogenase, constituída de duas proteínas, uma com ferro e outra com ferro e molibdênio (FREIRE, 1975) é, no entanto, muito sensível ao excesso de oxigênio que pode destruí-la ou inativá-la irreversivelmente. Assim, cada organismo desenvolveu uma estratégia diferente para livrar-se do excesso de oxigênio. Em

sistemas mais especializados, como na simbiose rizóbio-leguminosas, induzindo o hospedeiro a produzir uma substância chamada leghemoglobina, como aparece nos nódulos das leguminosas, que representa uma forma de sistema tampão para o oxigênio (NEVES & RUMJANECK, 1992).

Segundo FREIRE (1975) a leghemoglobina é uma proteína produzida pela simbiose, já que qualquer um dos simbiontes é capaz de produzi-la isoladamente, cuja função é transportar o oxigênio para a respiração dos bacteróides⁶ e o conseqüente fornecimento da energia metabólica (na forma de ATP) necessária à fixação. Sua função constitui-se, portanto, em um mecanismo desenvolvido pela simbiose rizóbio-leguminosas de proteção da nitrogenase, pois transporta o oxigênio mantendo concentrações suficientes à síntese do ATP necessário à fixação, porém nunca prejudiciais a atividade da nitrogenase.

Dessa forma, os nódulos radiculares das leguminosas são compartimentos altamente especializados onde a fixação do nitrogênio e o processo de respiração aeróbia foram fisiologicamente compatibilizados (NEVES & RUMJANECK, 1992).

2.3.3 SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSAS

Segundo RAIJ (1991) embora o processo de fixação biológica de N possa ser realizado por microrganismos livres, com destaque para bactérias do gênero *Azotobacter* e *Beijerinckia*, de maior importância para a agricultura é a fixação simbiótica, realizada principalmente por bactérias do gênero *Rhizobium*. Nesse caso, as raízes de leguminosas são infestadas, logo após a germinação, por essas bactérias, que provocam a formação de nódulos, onde encontram um nicho perfeito com proteção contra efeitos ambientais e alimentação pelo fornecimento de produtos

⁶ Diferenciação celular da bactéria (forma que fixa N₂).

fotossintéticos pela planta. Em troca, a bactéria fornece à planta a NH_3 proveniente da fixação do N_2 .

A FBN é um processo que caracteriza-se por uma alta demanda de energia, obtida do metabolismo de carboidratos supridos pela planta hospedeira (HUNGRIA & NEVES, 1986).

Segundo NEVES & RUMJANECK (1992) o desenvolvimento e manutenção dos nódulos, assim como, a assimilação do nitrogênio fixado representam um gasto para a planta hospedeira chegando a consumir, no funcionamento dos nódulos, entre 13 e 28% de seus produtos fotossintetizados.

De acordo com SHUBERT & RYLE⁷ citados por HUNGRIA & NEVES (1986) se a simbiose não for eficiente, o consumo de até 30% dos fotossintatos produzidos pela planta, poderá representar uma redução no potencial de produção das leguminosas. Entretanto, apesar do maior custo energético envolvido no processo de FBN nas leguminosas comparado à assimilação do nitrogênio mineral, algumas destas, quando efetivamente noduladas, raramente respondem à aplicação de fertilizantes nitrogenados em experimentos de campo. Tal fato pode ser devido à baixa eficiência na recuperação do fertilizante pelas plantas. Em regiões tropicais esta recuperação pode ser de apenas 10% (DUQUE et al.⁸, citados por NEVES & RUMJANECK, 1992) chegando excepcionalmente a 50% do nitrogênio aplicado.

Em leguminosas como feijão, caupi e soja, o processo de FBN promove uma melhor distribuição do nitrogênio na parte aérea das plantas, favorecendo a produção de grãos (NEVES et al.⁹, citados por NEVES & RUMJANECK, 1992).

⁷ SHUBERT, K.R.; RYLE, G.J.A. The energy requirements for nitrogen fixation in nodulated leguminous. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUNTING, A.H. (eds) *Advances in legume science*. London, H.M.S.O., 1980. p. 85-96.

⁸ DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L.; BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N_2 fixation using ^{15}N . *Pl. Soil*, Hague, v. 88, p. 333-343, 1985.

⁹ 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.*, Oxford, v. 36, p. 1179-1192, 1985.

Desta forma, o maior custo do processo biológico é contrabalançado por um melhor aproveitamento do nitrogênio fixado (NEVES & RUMJANECK, 1992).

Em termos agrícolas a simbiose rizóbio-leguminosas representa uma menor necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados (SKOT & ARAUJO, 1994).

A importância da FBN para a economia nacional, é evidenciada para o caso da soja, que no Brasil, como em outras partes do mundo, é cultivada usando, principalmente, o N obtido pela fixação simbiótica com o rizóbio (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Sua importância assume maior relevância sabendo-se que o nitrogênio contribui com a maior parcela nos insumos agrícolas representando 75% dos custos dos fertilizantes (DÖBEREINER, 1986).

Entretanto, segundo ARAUJO (1994a), no caso do feijoeiro, há um descrédito generalizado quanto sua capacidade de obter nitrogênio atmosférico suficiente para expressar seu potencial produtivo, recomendando-se indistintamente o uso de fertilizantes nitrogenados para a cultura.

Assim, apesar da FBN suprir as demandas nutricionais na soja, seu manejo no feijão, visando a substituição total ou parcial de adubos nitrogenados, ainda apresenta diversas limitações (VILA et al., 1996).

2.3.3.1 FORMAÇÃO E FUNCIONAMENTO DOS NÓDULOS

A nodulação é consequência de uma série de eventos bioquímicos, genéticos e fenológicos (SIQUEIRA, 1993) controlados pela leguminosa e pelo rizóbio (PEREIRA et al., 1984).

A formação dos nódulos é um processo complexo, que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças morfológicas e fisiológicas tanto na célula hospedeira como na bacteriana. 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 (HUNGRIA et al., 1994b).

Segundo JORGE (1988) os rizóbios penetram nos pêlos absorventes das raízes das leguminosas, onde se alojam em busca de alimento e, a infecção causada pelas bactérias, estimula as plantas a produzirem células na zona de invasão que originam os nódulos. Após a formação do nódulo, o rizóbio transforma-se em bacteróide, pára de se multiplicar e começa a sintetizar a nitrogenase, iniciando-se a fixação.

Além da nitrogenase, segundo HUNGRIA (1994b), após os estádios iniciais de infecção e formação dos nódulos ocorre, também, o desenvolvimento das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase responsáveis pelas reações de assimilação do N fixado na forma de amônia.

De acordo com SIQUEIRA (1993) o tempo de aparecimento dos nódulos é variável com as espécies de leguminosas e estirpes de rizóbio. Entretanto geralmente os nódulos são visíveis de cinco a dez dias após o plantio, enquanto que a atividade da nitrogenase só é detectada 4 a 10 dias após o aparecimento dos mesmos.

Segundo VIDOR et al. (1983) os processos envolvidos na formação do nódulo (infecção dos pêlos radiculares, estímulo do tecido hospedeiro e proliferação bacteriana) são muito diferentes daqueles envolvidos no seu funcionamento (fixação do N, transporte de produtos e manutenção do tecido hospedeiro).

Ao contrário de outras hiperplasias provocadas nos vegetais por insetos, nematóides ou bactérias patogênicas, os nódulos têm estrutura perfeitamente organizada, contendo uma camada de células corticais mais ou menos espessa envolvendo-os, uma área meristemática, de crescimento apical ou circundando

quase todo o nódulo e, uma área fixadora, central ou apical, constituída de células de tamanho várias vezes maior que o normal, com grande quantidade de células da bactéria invasora (FREIRE, 1975).

Entretanto, a infecção pode falhar na produção de nódulos efetivos, tanto devido a um problema da bactéria quanto do hospedeiro, o que poderá dar à planta, em solos pobres em nitrogênio, uma característica de "doente", ou seja, deficiente em nitrogênio pela ausência da fixação e depauperada em carboidratos pelo parasitismo da bactéria nos nódulos inefetivos (ARAUJO & HENSON, 1988).

Segundo WOLYN et al. (1989) embora a nodulação do feijoeiro ocorra inicialmente na raiz principal, a nodulação posterior nas raízes secundárias contribuem no aumento do período ativo de fixação possibilitando um maior acúmulo de nitrogênio nos tecidos.

Os nódulos do feijoeiro tem a forma poliédrica e um diâmetro aproximado de 2 a 5 mm (DEBOUCK & HIDALGO, 1985). A coloração interna é rósea quando ativos, branca quando inativos e marrom a verde quando em degeneração. Essa cor é relativa a presença, ausência ou colapso da proteína leghemoglobina, que atua como controladora do fluxo de oxigênio para a atividade da enzima ferro-molibdica nitrogenase, responsável pela redução do N_2 pelos bacteróides dos nódulos (VOSS, 1989).

2.3.3.2 ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO FIXADO

Enquanto os diazotróficos de vida livre fixam o nitrogênio apenas para suprir suas necessidades de proteínas, os que vivem em simbiose com outros organismos transferem parcial ou totalmente para o hospedeiro o nitrogênio que fixam. Nas associações envolvendo plantas superiores o nitrogênio assimilado nos nódulos é

transportado para as demais partes do vegetal através do xilema (NEVES & RUMJANECK, 1992).

O produto da fixação do N é a amônia que precisa ser rapidamente removida ou assimilada por ser tóxica às células (FRANCO & NEVES, 1992).

O rizóbio, sob a forma de bacteróide, presente no interior das células infectadas dos nódulos radiculares das leguminosas, possui as enzimas assimilativas para a amônia, tal como a bactéria em vida livre (RUMJANECK & NEVES, 1992).

Os primeiros passos na assimilação da amônia proveniente da fixação do N₂ ocorrem via glutamina sintetase e glutamato sintase (HUNGRIA, et al., 1994a).

A amônia produzida é rapidamente assimilada em glutamina e glutamato pela célula vegetal e exportada para as demais partes da planta sob a forma de compostos solúveis de pequeno peso molecular e ricos em nitrogênio como, por exemplo, os ureídos (alantoína, ácido alantóico e citrulina), as amidas (asparagina e glutamina) e vários aminoácidos (FRANCO & NEVES, 1992).

A forma e a quantidade exportada depende da espécie vegetal e da estirpe de rizóbio. A exportação na forma de ureído é mais eficiente pois transporta mais N por unidade de C (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

2.3.3.3 INOCULAÇÃO DE SEMENTES

Segundo JORGE (1988) embora a infecção das raízes das leguminosas ocorra pelos rizóbios naturalmente estabelecidos no solo, aconselha-se a inoculação das sementes com o rizóbio específico da leguminosa que pretende-se implantar para aumentar os benefícios possibilitados pelo processo de fixação biológica do nitrogênio nesta cultura.

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 (ARAUJO, 1994a). Entretanto, as quantidades de N_2 fixado e os efeitos da inoculação na produção dependem muito da estirpe do rizóbio empregada e da leguminosa cultivada (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Para que uma estirpe possa ser recomendada para inoculação é preciso que se conheçam, dentre outros atributos, sua eficiência na fixação de N_2 e capacidade de se estabelecer no solo e competir com os microrganismos ali presentes (ARAUJO & HENSON, 1988).

Além disso as bactérias inoculadas devem ter habilidade de colonizar o solo e sobreviver, na ausência do hospedeiro, até o plantio seguinte. Entretanto, para que isso ocorra, é necessário que as bactérias do inoculante sejam capazes de competir por nutrientes não apenas com a microflora do solo mas também com os rizóbios estabelecidos (ARAUJO, 1994a).

Assim, segundo FREIRE (1992), na seleção de estirpes de rizóbio deve-se objetivar estirpes eficientes, adaptadas às condições prevalentes no local de emprego e competitivas por sítios de infecção nodular frente as populações estabelecidas.

A simbiose com o rizóbio pode suprir grande parte do nitrogênio necessário ao desenvolvimento e produtividade das leguminosas. Entretanto a planta deve estar eficientemente nodulada pelo rizóbio específico, uma vez que uma boa nodulação normalmente dá indicações de que a leguminosa está se beneficiando da fixação do N_2 (VIDOR et al., 1983).

Segundo VIEIRA (1983) os resultados insatisfatórios em termos de FBN no feijoeiro, devidos à inoculação de sementes têm desacreditado essa prática a ponto

de muitos técnicos e produtores resolverem ignorá-la em benefício da adubação nitrogenada.

De acordo com HUNGRIA et al. (1997), a inoculação do feijoeiro é muitas vezes limitada, devido a características intrínsecas da planta, como baixa capacidade de FBN de alguns cultivares e alta suscetibilidade a estresses ambientais e, das estirpes de rizóbio, como baixa eficiência no processo de FBN e na capacidade competitiva por sítios de infecção nodular. Como resultado, a avaliação das taxas de FBN em experimentos conduzidos com seis leguminosas em diversos países mostrou que o feijoeiro apresentava a menor porcentagem de N proveniente da FBN.

Segundo ARAÚJO (1994b) a inconsistência de melhores resultados da inoculação de sementes a nível de campo, faz com que a adoção dessa tecnologia de baixo custo seja, muitas vezes, encarada com ceticismo pelos produtores.

Considerando que o feijoeiro é cultivado principalmente por pequenos agricultores, em solos muitas vezes deficientes em nitrogênio mineral, qualquer melhoria na simbiose pode resultar em aumentos significativos no rendimento de grãos. Entretanto, devido à diversidade entre os genótipos de feijão quanto à habilidade em fixar simbioticamente o N_2 , as respostas à inoculação, sobretudo em condições de campo, podem ser variáveis (VARGAS et al., 1991).

Resultados de FRANCO et al.¹⁰ citados por FRANCO (1995) mostraram que o pico de atividade da nitrogenase ocorre logo após o início da floração enquanto que o pico de atividade da enzima indicadora da assimilação do nitrogênio mineral do solo (redutase do nitrato) ocorre mais tarde, durante o enchimento dos grãos. Por isso o feijoeiro é mais beneficiado pela fixação biológica no início do ciclo, enquanto que a aplicação de adubos nitrogenados em cobertura tem uma contribuição maior

¹⁰ FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C.; NEYRA, C.A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*, v. 63, p. 421-424, 1979.

na fase do enchimento dos grãos. Desta forma seria recomendável sempre inocular a cultura e, dependendo da relação custo/benefício, poder-se-ia efetuar uma adubação complementar com fertilizante nitrogenado no início da floração.

FREIRE et al.¹¹ citados por VIEIRA (1995) observaram que a inoculação trouxe benefícios à cultura do feijoeiro em experimentos em casa de vegetação porém, pequena variação foi encontrada em condições de campo, o que vem a sugerir a existência de problemas na adaptação do rizóbio às condições naturais.

Segundo HUNGRIA & ARAUJO (1994) e HUNGRIA et al. (1997) embora normalmente utilize-se um par de estirpes de rizóbio nos inoculantes comerciais, a comprovada instabilidade genética e dúvidas quanto a eficiência simbiótica do *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4064 levaram-no, a partir da VI RELARE¹², a não mais ser indicado para utilização no inoculante comercial do feijão, recomendando-se, para essa finalidade, apenas *Rhizobium tropici* SEMIA 4077.

2.3.3.4 FATORES QUE INTERFEREM NA NODULAÇÃO E FBN

Embora a inoculação possa apresentar considerável importância no suprimento de nitrogênio ao feijão através da simbiose, uma série de fatores relacionados com a planta, com o rizóbio, com o solo e com a interação dos três pode afetar decisivamente a nodulação (PEREIRA, 1983).

A ação conjunta desses fatores pode limitar ou estimular a nodulação o que irá refletir sobre a quantidade de N₂ fixado e sobre a produtividade da leguminosa (VIDOR et al., 1983). Devido a isto, tem-se intensificado o desenvolvimento de pesquisas visando identificar estes fatores e quantificar os seus efeitos, na tentativa

¹¹ FREIRE, J.R.J.; GOEPFERT, C.P.; VIDOR, C. Alguns fatores limitantes da fixação de N e produtividade das leguminosas do Rio Grande do Sul. In: PRIMAVESI, A. Progressos em biodinâmica e produtividade e produtividade do solo. UFSM. Santa Maria, p. 9-16, 1968.

¹² VI Reunião de laboratórios para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

de melhorar a eficiência simbiótica e, conseqüentemente, aumentar a quantidade de N₂ fixado e a produtividade da cultura (PEREIRA, 1983).

A fixação biológica de N em feijoeiro tem sido um desafio à pesquisa uma vez que a eficiência dessa simbiose tem sido muito variável (VOSS, 1989). Assim, devido à grande variabilidade tanto entre as cultivares de feijão como entre as estirpes de rizóbio, e o efeito da interação entre ambos na eficiência energética dos nódulos, deve-se considerar que os programas de seleção visando ao incremento da fixação de N₂ devem avaliar conjuntamente tanto a planta hospedeira como a estirpe de rizóbio (HUNGRIA & RUSCHEL, 1987).

2.3.3.4.1 REFERENTES A PLANTA HOSPEDEIRA

NUTMAN¹³ citado por HUNGRIA et al. (1997), já em 1946 realçava a importância da planta hospedeira na FBN, afirmando que vários fatores genéticos relacionados ao hospedeiro estariam envolvidos na formação dos nódulos e no mecanismo da fixação. Seus trabalhos fitogenéticos demonstraram que a base da eficiência fixadora reside nas estreitas e complexas inter-relações genéticas que se estabelecem entre as bactérias e as células hospedeiras (VASCONCELOS & ALMEIDA, 1978).

Em relação ao feijoeiro já na década de 50 BURTON et al.¹⁴ citados por HUNGRIA et al. (1997) observaram que os genes com maior responsabilidade pela nodulação pareciam residir na planta hospedeira.

Devido à variabilidade encontrada entre genótipos de feijoeiro quanto à eficiência do processo de FBN, tem sido enfatizada a importância do melhoramento

¹³ NUTMAN, P.S. Genetical factors concerned in the symbiosis of clover and nodule bacteria. *Nature*. London, v. 157, p. 463-465, 1946.

¹⁴ BURTON, J. C.; ALLEN, O. N.; BERGER, K. C. Response of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with mixtures of effective and ineffective rhizobia. *Proceedings of the Soil Science Society of America*. Madison, v. 18, p. 156-159, 1954.

genético da planta para otimizar o fornecimento de N via fixação biológica (HUNGRIA et al., 1997).

Segundo FREIRE (1975) o conteúdo genético da leguminosa hospedeira comanda a suscetibilidade à nodulação. Testes conduzidos em solução nutritiva mostraram que as cultivares e linhagens possuem potencial diferenciado na acumulação de N atmosférico, quando inoculadas com o rizóbio específico (VOSS, 1989). O resultado diferenciado entre cultivares sugere que existem diferentes graus de compatibilidade genética entre estirpes de rizóbio e variedades de feijoeiro (ANDREOLA, 1992).

Uma das causas pelas quais o feijão não fixa nitrogênio em quantidade suficiente para seu desenvolvimento e produção é o curto ciclo vegetativo (VILHORDO et al., 1988).

GRAHAM & HALLIDAY¹⁵ citados por VOSS (1989) agrupando cultivares pelo tipo de crescimento verificaram que a taxa de fixação de N₂ em cultivares de Tipo IV foi superior à de cultivares de hábito indeterminado Tipo II e determinado Tipo I.

Também GRAHAM & ROSAS¹⁶ citados por ARAUJO & HENSON (1988) e HUNGRIA et al. (1997) constataram que os cultivares de feijoeiro de ciclo mais longo apresentavam taxas mais elevadas de FBN que os de ciclo mais curto.

Segundo RUSCHELL et al.¹⁷, e RENNIE & KEMP¹⁸, citados por ARAUJO & HENSON (1988) devido ao tempo necessário para o desenvolvimento do sistema nodular no início do crescimento e a senescência dos nódulos na época de enchimento dos grãos, a duração da atividade nodular é curta em feijão de ciclo

¹⁵ GRAHAM, P.H. & HALLIDAY, J. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. In: VINCENT, J.M.; WHITNEY, A.S.; BOSE, J. (eds) *Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. Maui, Hawaii: University of Hawaii, 1977. p. 313-334.

¹⁶ GRAHAM, P. H.; ROSAS, J. C. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *Journal of Agricultural Science*. Cambridge, v. 88, p. 503-508, 1977.

¹⁷ RUSCHELL, A.P.; VOSE, P.B.; MATSUI, E.; VICTORIA, R.L.; SAITO, S.M.T. Field evaluation of N₂ fixation and N-utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ¹⁵N isotope dilution. *Plant and Soil*, Hague, v. 65, n. 3, p. 397-407, 1982.

¹⁸ RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. N₂ fixation in field beans quantified by ¹⁵N isotope dilution. II. Effects of cultivars of beans. *Agronomy Journal*, Madison, v. 75, n. 4, p. 645-649, 1983.

normal e menor ainda em feijão mais precoce, resultando em menor quantidade de N₂ fixado.

De acordo com BARRADAS et al. (1989) uma das principais limitações a maior eficiência da FBN no feijoeiro está justamente no ciclo curto da cultura, devendo-se, portanto, procurar prolongar o período ativo de fixação do N₂ através da identificação de combinações simbióticas com precoce nodulação e fixação do N₂.

Outro fator que restringe a otimização do processo de fixação de N₂ no feijoeiro é a senescência precoce dos nódulos havendo, a partir de então, segundo PLADYS & RIGARD¹⁹ e HUNGRIA & FRANCO²⁰ citados por HUNGRIA et al. (1997), um declínio acentuado na atividade da nitrogenase e das enzimas de assimilação do N₂ fixado e um incremento na atividade das proteases que degradam a leghemoglobina. Daí a importância da seleção de cultivares de feijão e estirpes de rizóbio que apresentem nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos.

Além disso, uma vez que a degeneração da fixação biológica do N₂ atmosférico pelos nódulos ocorre perto do florescimento é importante que este ocorra mais tarde (VOSS, 1989).

A nodulação precoce e a manutenção de nódulos efetivos durante o florescimento do feijoeiro podem favorecer a FBN nessa cultura (ARAUJO et al., 1996).

Como a duração do ciclo da cultura e, conseqüentemente, do período ativo de fixação pode influenciar no conteúdo total de nitrogênio, teoricamente plantas que comecem a fixá-lo mais cedo e mantenham um período de fixação ativa mais longo se beneficiarão com maior quantidade deste elemento incorporado as vagens. Uma estratégia para melhorar a fixação de nitrogênio pelo feijoeiro seria, portanto, a extensão do período de atividade fixadora, buscando-se combinações de planta e

¹⁹ PLADYS, D.; RIGAUD, J. Senescence of french-bean nodules: occurrence of different proteolytic activities. *Physiologia Plantarum*. Copenhagen, v. 63, p. 43-48, 1985.

²⁰ HUNGRIA, M; FRANCO, A.A. Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris* L. *Tropical Agriculture*. Trinidad, v. 65, p. 341-346, 1988.

bactéria capazes de promover uma nodulação efetiva precoce e de manter os nódulos em atividade por mais tempo (ARAUJO, 1994a).

Segundo GONZÁLES & FREIRE²¹ citados por VILHORDO et al. (1988) o tempo para formação de nódulos após a inoculação e o período de fixação do nitrogênio variam entre cultivares de feijão e estirpes de rizóbio.

Assim a utilização de cultivares de feijão com alto potencial de FBN bem como o emprego de estirpes de rizóbio eficientes na FBN, competitivas por sítios de infecção nodular e com boa capacidade de colonizar e sobreviver no solo, podem representar uma das alternativas para redução dos custos de produção dessa cultura (BARBO & VIDOR²² citados por VILHORDO et al., 1988).

Tem sido sugerido, freqüentemente, que a ineficiência de certos sistemas simbióticos, como o do feijão, e o declínio da atividade fixadora do N₂, sob condições de estresse estão relacionados com o decréscimo nas taxas fotossintéticas do hospedeiro ou com a ineficiência do complexo da nitrogenase. Porém, pelo menos no caso da simbiose feijoeiro - rizóbio, os baixos níveis de atividade da glutamina sintetase e da glutamato sintase podem ser os fatores limitantes à fixação do N₂, sendo afetados tanto pela cultivar do hospedeiro (PACOVSKY & HUNGRIA²³ citados por HUNGRIA, 1994b) como pela estirpe de rizóbio (HUNGRIA et al.²⁴ citados por HUNGRIA, 1994b).

Segundo HUNGRIA et al. (1997) para que o crescimento do feijoeiro seja otimizado é necessária a sincronização entre os processos de fotossíntese e de FBN cuja atividade deve se iniciar quando as reservas de C e N dos cotilédones

²¹ GONZÁLES, G.T.; FREIRE, J. Avaliação dos períodos de fixação do nitrogênio de estirpes de *Rhizobium phaseoli* em feijão. In: Reuniões técnicas anuais do feijão e outras leguminosas de grãos alimentícios. IPAGRO, Porto Alegre, p. 49-49, 1985.

²² BARBO, C.V.S.; VIDOR, C. Efeito da inoculação de *Rhizobium phaseoli* em quatro cultivares de feijão. In: Reuniões técnicas anuais do feijão e outras leguminosas de grãos alimentícios. IPAGRO, Porto Alegre, p. 43, 1985.

²³ PACOVSKY, R.S.; HUNGRIA, M. Glutamine synthetase may limit nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E. (eds) Nitrogen fixation: achievements and objectives, Ney York-London, Chapman and Hall, p. 359, 1990.

²⁴ 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.

terminarem. Foi constatado, porém, que nas plântulas de feijoeiro nodulado ocorre um período de "fome" de N porque suas reservas nos cotilédones se esgotam antes que o N dos nódulos seja transportado, em quantidades adequadas, para a nutrição das plantas. Esse período de estresse de N ocorre geralmente entre 15 e 20 dias após a emergência. Sendo uma cultura de ciclo curto o atraso no estabelecimento da nodulação e essa deficiência temporária de nitrogênio podem afetar substancialmente a produtividade das plantas (HUNGRIA et al., 1994a).

Freqüentemente, os programas de melhoramento das culturas não levam em conta a capacidade das leguminosas fixarem N_2 , sendo os trabalhos realizados geralmente em áreas experimentais de alta fertilidade ou adubadas com nitrogênio e, os parâmetros analisados, não incluem avaliações sobre o sistema radicular. As observações deveriam incluir, além das características agrônômicas, os aspectos relativos à nodulação. A soja representa uma exceção, pois nessa cultura os programas de melhoramento sempre se preocuparam com a nodulação (FREIRE, 1992).

Segundo DÖBEREINER (1986) a soja no Brasil somente chegou ao destaque de ser uma cultura autosuficiente em relação a adubação nitrogenada, porque desde 1965 seu melhoramento, além de outros fatores essenciais, é feito no sentido de aperfeiçoar a simbiose com os rizóbios. Ao contrário, os trabalhos de melhoramento do feijão no Brasil e no resto do mundo não consideraram a capacidade desta planta fixar o nitrogênio. Isto devido, de um lado, à sua sensibilidade a muitos fatores ambientais e, de outro, a suposição de que seu ciclo curto não permite o acúmulo de quantidades de N suficientes a elevadas produções através da fixação biológica (BURTON²⁵ citado por DÖBEREINER, 1986).

²⁵ BURTON, J.C. Pragmatic aspects of the *Rhizobium*: leguminous plant association. In: NEWTON, W.E. & NYMAN, C.J. (org.) Proc. First Int. Nitrogen Fixation. Washington State Uni. Press, 1974. p. 329-446.

O melhoramento do feijoeiro visando ciclos exageradamente curtos e sem busca de resposta a simbiose, resultou em cultivares de sistema radicular precário, altamente sensíveis a pequenas variações de umidade, de nodulação tardia, precoce senescência dos nódulos e curto período de fixação (FREIRE, 1992).

2.3.3.4.2 REFERENTES AO RIZÓBIO

Segundo PEREIRA et al. (1984) embora o processo de nodulação seja controlado geneticamente tanto pela bactéria quanto pela leguminosa, a maior concentração da pesquisa de FBN está voltada principalmente para o rizóbio e suas inter-relações com o meio ambiente.

Apesar do nódulo representar um abrigo para a bactéria, ao se tornar parte do sistema simbiótico, o rizóbio passa a ser afetado por qualquer fator que diminua o vigor da planta (FRANCO & NEVES, 1992).

Segundo FREIRE (1975) assim como os genótipos da leguminosa diferem na suscetibilidade à nodulação também as estirpes do rizóbio específico diferem na habilidade em invadir as raízes, formar nódulos e fixar nitrogênio. Assim, uma determinada estirpe pode induzir nodulação e fixar nitrogênio em certas variedades e falhar em outras as quais, por sua vez, podem ser suscetíveis a outras estirpes. Desta forma uma estirpe de rizóbio pode ser ineficiente ou medianamente eficiente em uma determinada variedade e, por outro lado, ser altamente eficiente em outra.

A grande variabilidade entre diferentes estirpes de rizóbio quanto a eficiência na fixação de N_2 é normalmente decorrente dos mecanismos genéticos que contém as informações para nodulação e síntese da nitrogenase (ARAUJO & HENSON, 1988). Isto porque as informações genéticas referentes ao complexo da nitrogenase e outras características importantes como a capacidade saprofítica e a

competitividade por sítios de infecção nodular estão encerradas no rizóbio (HUNGRIA et al., 1997).

De acordo com JUÁREZ (1984) há ocorrência natural de variação na capacidade de induzir nodulação (infectividade) e na habilidade de fixar nitrogênio (efetividade) entre estirpes de rizóbio, em condições de estresse ambiental.

Segundo ARAÚJO (1994b) muitos dos casos de insucesso da inoculação são atribuídos à baixa competitividade das estirpes inoculadas que não são capazes de prevalecer nos nódulos do hospedeiro. Esse quadro é particularmente sério quando o cultivo é realizado em solos que contenham uma determinada quantidade de bactérias estabelecidas capazes de nodular aquela espécie de planta.

De acordo com ANDREOLA (1992), dentre os fatores bióticos que afetam o processo de fixação de nitrogênio no feijoeiro, o principal problema para as estirpes selecionadas é a competição no solo com as estirpes estabelecidas, melhor adaptadas e capazes de invadir as raízes e formar nódulos, porém de baixa eficiência fixadora.

Segundo VASCONCELOS & ALMEIDA (1978) a capacidade competitiva por sítios de infecção nodular entre as estirpes de rizóbio mostra-se muito variável e independe do seu grau de eficiência fixadora do N₂ atmosférico.

De acordo com HUNGRIA et al. (1997) a competitividade das bactérias é influenciada pelos fatores abióticos do solo, que podem afetar tanto as populações estabelecidas como as condições para o estabelecimento de novas estirpes.

Segundo ARAUJO & HENSON (1988) acredita-se que o meio ambiente tenha um papel relevante na habilidade de uma determinada estirpe superar a outras no que se refere a competitividade por sítios de infecção nodular, porém o controle de seus efeitos é difícil.

A colonização e a sobrevivência de estirpes introduzidas, bem como a alta capacidade competitiva por sítios de infecção nodular em relação às estirpes

estabelecidas vem se constituindo numa das maiores preocupações dos rizobiologistas. Deve-se encontrar meios que proporcionem uma maior porcentagem de ocorrência das estirpes introduzidas nos nódulos para que haja uma maximização na fixação do N_2 e, conseqüentemente, maior produtividade da leguminosa hospedeira (VIDOR et al., 1983).

A falta de resposta das leguminosas à inoculação com estirpes mais eficientes resulta, quase sempre, da constatação de que as estirpes estabelecidas são abundantes, ineficientes e, dificilmente deslocadas pelos métodos tradicionais de inoculação (HUNGRIA et al., 1997).

Segundo FREIRE (1992) as características das populações do rizóbio específico existentes no solo estão dentre os fatores que condicionam a resposta da simbiose sendo os efeitos da inoculação maiores quando o rizóbio estabelecido é inespecífico ou está em baixo número.

De acordo com FRANCO & NEVES (1992) problemas no estabelecimento do rizóbio em alguns solos têm sido atribuídos, também, a predominância de microrganismos antagônicos.

Segundo LOVATO et al. (1985) as interações do rizóbio com o restante das populações microbianas do solo, que incluem competição por nutrientes, predação parasitismo, antibiose, bacteriofagia e ação de bacteriolisinas, podem limitar consideravelmente suas populações no solo levando-as até níveis muito baixos.

De um modo geral, para que se tenha assegurada uma boa nodulação as estirpes que compõem os inoculantes devem apresentar as seguintes características: comprovada eficiência fixadora em experimentação de campo; amplo espectro de nodulação e eficiência (baixa especificidade hospedeira); boa capacidade de colonizar e sobreviver no solo e, alta capacidade competitiva por sítios de infecção nodular. Estas características são de grande valia no aumento da produtividade das leguminosas porque evitariam possíveis riscos de ocorrência de

nodulação ineficiente ocasionada por estirpes estabelecidas que, além disso, geralmente possuem alta capacidade competitiva por sítios de infecção nodular (VIDOR et al., 1983).

A simbiose com o feijoeiro é complexa devido à grande heterogeneidade encontrada entre as estirpes de rizóbio e sua suscetibilidade a fatores ambientais. As populações estabelecidas, geralmente em número elevado e caracterizadas pela ineficiência e alta capacidade competitiva por sítios de infecção nodular são, também, um fator limitante à nodulação com estirpes mais eficientes introduzidas pela inoculação das sementes (HUNGRIA et al., 1997).

O caráter de promiscuidade nodular do feijoeiro é mais uma barreira a ser transposta para que a inoculação tenha sucesso. É preciso, portanto, que na busca de inoculantes mais eficientes seja feito um levantamento qualitativo e quantitativo das populações de rizóbios estabelecidas, de forma a melhor conhecê-las e superá-las. Levantamentos de nodulação espontânea mostraram que na maioria dos solos onde se cultiva o feijoeiro existe uma população estabelecida de rizóbios capazes de nodular a cultura (ARAUJO, 1994a).

2.3.3.4.3 REFERENTES AO SOLO

Segundo ARAUJO (1994a) os rizóbios inoculados estão sujeitos aos efeitos nocivos da temperatura e acidez elevada como, também, 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 componentes da microflora do solo.

De acordo com SIQUEIRA & FRANCO (1988) de uma maneira geral, plantas dependentes da FBN são mais sensíveis aos estresses do solo do que plantas adubadas com N mineral. Além disso, podem ser muitas as limitações a nível de

solo que comprometem o desenvolvimento e produção das culturas. Estima-se que 75% dos solos tropicais apresentam problemas de erosão, 45% de estresse hídrico, 25-30% de compactação, 7% de salinidade/alcalinidade, 35% problemas de acidez e 80% deficiência de fósforo. Outros nutrientes podem ser deficientes principalmente a partir da correção do solo como, por exemplo, o zinco após a calagem e adubação fosfatada e potássio, enxofre e molibdênio após alguns anos de cultivo.

Segundo VIDOR et al. (1983) o efeito da temperatura sobre o sistema simbiótico manifesta-se, praticamente, em todos os estágios da nodulação. Entretanto, embora a temperatura na parte aérea possa afetar a simbiose, evidências experimentais indicam que a verificada na zona radicular é de maior importância ao processo de FBN.

As temperaturas baixas retardam a infecção e a formação de nódulos enquanto que sob temperaturas altas os nódulos formados são pouco eficientes. A temperatura dos primeiros 5 cm do solo, em regiões tropicais, atinge com frequência 45 °C ou mais. O uso da cobertura morta pode minimizar o efeito das temperaturas elevadas durante o estabelecimento da cultura (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Para a simbiose o teor ótimo de umidade situa-se em torno de 60 a 70% da capacidade máxima de retenção de água do solo. Teores mais baixos ou acima deste ótimo são prejudiciais para absorção de água, refletindo-se negativamente sobre a quantidade e longevidade de nódulos com efeitos diretos sobre o processo de fixação. Em feijão foi observada uma redução de 75% e 30% no número e matéria seca dos nódulos, respectivamente, e ainda de 90% na atividade da nitrogenase quando estas plantas ficaram durante 44 dias em condições de estresse de umidade. Variações do teor de umidade fora do nível adequado, além dos efeitos diretos, manifestam-se através de suas interações com a aeração do solo e com a

temperatura. O excesso de umidade acarreta limitações no fornecimento do oxigênio necessário ao metabolismo vegetal (VIDOR et al., 1983).

A deficiência hídrica diminui a infecção dos pêlos absorventes pelo rizóbio, prejudica o crescimento, chegando até a inibir completamente a produção dos nódulos. A redução do potencial hídrico do solo também tem efeito direto na FBN, diminuindo o transporte dos produtos nitrogenados para fora do nódulo ou indiretamente, pela diminuição no fluxo de fotossintatos (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Segundo VIDOR et al. (1983) a acidez do solo vem normalmente associada com toxidez de alumínio e manganês e a baixa disponibilidade de nutrientes como cálcio, magnésio e molibdênio, essenciais para a simbiose. A elevação do pH pela calagem, além de reduzir o Al e Mn disponíveis, aumenta a disponibilidade de fósforo e outros nutrientes, através da liberação de formas adsorvidas nas partículas do solo, beneficiando marcadamente a simbiose nestes solos ácidos. O excesso de alumínio trocável no solo pode causar um efeito inibitório tanto na formação dos nódulos, devido aos prejuízos físicos sobre o sistema radicular, quanto em seu funcionamento, devido à restrição na absorção e/ou translocação de nutrientes. O excesso de manganês pode levar a uma acentuada redução na FBN bem como no rendimento das culturas. O suprimento de cálcio é muito importante em solos com toxidez de manganês uma vez que plantas com altos teores de cálcio no tecido apresentam maior tolerância a altas concentrações de manganês.

A peletização das sementes com carbonato de cálcio pode ser uma prática recomendada para melhorar a eficiência da simbiose. Com a sua utilização são criadas melhores condições para a sobrevivência e multiplicação do rizóbio no solo, protegendo-o de fatores nocivos à nodulação como a acidez e efeitos associados como toxidez de alumínio e manganês (VIDOR et al., 1983).

A influência do pH sobre a formação dos nódulos é mais pronunciada do que o efeito da reação no crescimento da leguminosa (MELLO et al., 1989) assim como a atividade dos nódulos é afetada em menor intensidade pela acidez do que sua formação (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Dentre os fatores nutricionais que mais interferem na nodulação e FBN destacam-se o cálcio, o magnésio, o fósforo, o nitrogênio e os micronutrientes molibdênio, boro, cobre, cobalto e ferro. O cálcio é importante no processo de infecção dos pêlos radiculares, sendo sua necessidade maior na formação dos nódulos do que no seu crescimento e atividade. O magnésio é indispensável para o acoplamento do ATP no funcionamento da nitrogenase. A utilização de calcário dolomítico para a correção da acidez do solo tem a dupla função de fornecer estes elementos (VIDOR et al., 1983).

O fósforo é o nutriente mais importante para a FBN ainda que uma deficiência de qualquer elemento que afete o crescimento da planta certamente afetará a simbiose. A importante função que desempenha na formação de proteínas e no desenvolvimento das raízes e da parte aérea explica os severos efeitos de sua deficiência sobre a nodulação e produção dos compostos nitrogenados. Além disso, deve-se considerar que o fósforo participa dos vários processos de armazenamento e transferência de energia sendo, sem dúvida, muito importante no processo altamente dispendioso em termos de energia que é a redução do N_2 a NH_3 (VIDOR et al., 1983).

Dentre os micronutrientes, o molibdênio é o elemento chave da nitrogenase e, portanto, indispensável ao funcionamento da simbiose. Foi demonstrado que um dos fatores limitantes da fixação de N_2 em feijão é a deficiência de molibdênio em solos ácidos (DÖBEREINER, 1986). Isto porque sua disponibilidade é regulada pelo pH do solo. O ferro faz parte da enzima nitrogenase e da leghemoglobina. O boro é essencial ao sistema vascular dos nódulos. O cobre é importante para o crescimento

e atividade da bactéria. O cobalto faz parte da enzima cobamida, que aparece em grandes quantidades nos nódulos (VIDOR, et al., 1983).

Segundo FREIRE (1992) o teor de N mineral do solo está entre os fatores do solo que condicionam a resposta da simbiose em termos de N fixado, sendo esta resposta máxima, em solo de baixo N mineral. O número e o desenvolvimento dos nódulos e, conseqüentemente, a fixação são tanto mais reduzidos quanto maior for o teor de N combinado do solo.

VILA et al. (1996), observaram que a aplicação de nitrogênio na semeadura e em cobertura no feijoeiro, reduziu significativamente a matéria seca dos nódulos.

Entretanto, muitas vezes, observam-se efeitos favoráveis de adubações nitrogenadas em leguminosas jovens pois o rizóbio, nos primeiros estágios da infecção, age como um parasita e não como um microrganismo que vive em simbiose (MELLO et al., 1989). Além disso, segundo VIDOR et al. (1983), as leguminosas demonstram certa preferência pelo nitrato em vez do nitrogênio obtido via fixação biológica, provavelmente, pelo menor custo energético necessário a sua assimilação.

2.4 MICRORGANISMOS PROMOTORES E INIBIDORES DO CRESCIMENTO DE PLANTAS

Dentre os microrganismos capazes de promover o crescimento de plantas podem ser citados os fungos micorrízicos e as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs). Ao contrário, entre os capazes de inibir o crescimento das plantas podem ser citados os patógenos sub-clínicos.

Segundo SIQUEIRA (1994) os fungos micorrízicos estabelecem com as raízes da maioria das espécies vegetais associações simbióticas mutualistas denominadas micorrizas, que constituem-se no estado natural das raízes da maior

parte das plantas. Portanto, micorriza é uma associação simbiótica não patogênica entre fungos, benéficos e específicos do solo, e raízes de plantas superiores (MIRANDA & MIRANDA, 1997). Esta associação representa uma perfeita integração morfológica e funcional entre os simbiontes (SILVEIRA, 1992).

Os fungos formadores de micorriza são habitantes comuns do solo e, colonizando as raízes, estabelecem uma série de inter-relações biotróficas: a planta fornecendo substrato energético ao fungo e este, através da rede de hifas externas, captando nutrientes e os transferindo à planta hospedeira (SILVEIRA, 1992). Desta forma, os fungos funcionam como extensões do sistema radicular das plantas (PATTINSON et al., 1997). De acordo com SILVEIRA (1992) tais associações são tão frequentes que plantas não micorrizadas constituem uma exceção na natureza.

Segundo SIQUEIRA & FRANCO (1988) os efeitos nutricionais são os mais evidentes e consistentes dos efeitos das micorrizas sobre o crescimento e produção das plantas.

Atribui-se a promoção do aumento no crescimento da planta à grande capacidade de absorção de nutrientes do solo, principalmente aqueles que movimentam-se por difusão, portanto, de baixa mobilidade, como o fósforo, cobre e zinco (COLOZZI-FILHO & BALOTA, 1994).

Entretanto, sob determinadas condições os efeitos das micorrizas podem ser negativos. Nesse caso pode haver depressão no crescimento da planta, pois o fungo passa a se comportar como um parasita (SILVEIRA, 1992).

A falta de nitrogênio, juntamente com a do fósforo, representa uma das principais limitações para o crescimento das plantas nos trópicos e as micorrizas, embora não sejam capazes de fixar o N_2 atmosférico, favorecem sua aquisição, através de efeitos indiretos na simbiose fixadora desse nutriente e no aumento da absorção do nitrogênio do solo (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

De acordo com SILVEIRA (1992) os fungos micorrízicos aumentam a absorção de nutrientes pelas plantas e, portanto, favorecem a fixação de N_2 , cujo processo exige elevada quantidade principalmente de fósforo e molibdênio.

Segundo FREITAS (1994) as RPCPs são bactérias, pertencentes principalmente ao gênero *Pseudomonas*, que vivem na rizosfera das plantas, porém sem estabelecerem relações simbióticas com as mesmas, mas que lhe são benéficas, pela produção de substâncias promotoras de seu crescimento, pela interferência positiva na sua nutrição ou atuando como agentes no controle biológico de fitopatógenos. Os patógenos subclínicos, também denominados patógenos menores, são os que, embora não vivam no interior das plantas, produzem toxinas que afetam o crescimento vegetal, podendo resultar em redução do crescimento da planta, com ou sem manifestação de sintomas visíveis. Um dos modos de ação das RPCPs é o controle biológico de fitopatógenos, sejam eles os clássicos causadores de doenças ou os subclínicos. A eliminação desses patógenos subclínicos pode resultar na promoção do crescimento da planta.

2.5 MINHOCAS (OLIGOCHAETAS EDÁFICOS)

2.5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

As minhocas fazem parte do filo *Annelida* que, segundo ASSAD (1997), constitui um dos importantes grupos de animais do solo, formado por indivíduos que apresentam corpo cilíndrico, composto por uma sucessão de segmentos, também denominados metâmeros, essencialmente semelhantes entre si e em forma de anel. Pertencem a classe *Oligochaeta* e a ordem *Opisthospora* a qual constitui-se de várias famílias, das quais destacam-se as do tipo terrícola, como *Glossoscolecidae*, *Lumbricidae*, *Megascolecidae*, com grande número de gêneros e espécies.

Os oligoquetas são em geral animais cilíndricos e alongados com segmentação externa e interna bem distinta. O número de segmentos ou anéis oscila entre 7 e 600 (KÜKENTHAL et al., 1986).

A minhoca está entre a mais linear das criaturas, afinada em ambas as extremidades, sem nenhuma protuberância, apêndices ou órgãos em evidência e com a maior parte do corpo ocupada pelo sistema digestivo que é completo com boca e ânus (MEINICKE, 1983).

São animais pecilotermos vulgarmente conhecidos como de "sangue frio". Isto porque a temperatura de seu corpo acompanha a do meio ambiente (LONGO, 1987).

Suas dimensões variam enormemente de espécie para espécie. Alguns dos menores oligoquetas, pertencentes aos gêneros *Aelosoma* e *Chaetogaster*, medem menos de 1mm de comprimento mas, as minhocas gigantes como *Rhinodrilus fafneri* (minhocuçu) de Minas Gerais, Brasil e *Megascolides australis*, da Austrália ultrapassam 2 metros de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. Entretanto, a maioria das minhocas mede apenas alguns centímetros de comprimento (STORER & USINGER, 1974).

São geralmente pigmentadas sendo essa pigmentação tanto maior quanto mais próximo da superfície vivem (ASSAD, 1997).

Seu maior constituinte químico é a água que compreende de 70 a 95 % do peso de seu corpo. Os restantes 5 a 30% são na maior parte proteína, que compõe entre 53 a 72% do total da matéria seca, gordura que representa de 1 a 17% e matéria mineral que participa com 9 a 23%, variando estes em função da dieta nutricional das minhocas (MEINICKE, 1983).

Segundo KÜKENTHAL et al. (1986) a parede do corpo é um saco dermo-muscular típico com a face revestida pelo peritônio. As células epidérmicas constituem um epitélio simples, com intercalação de células glandulares e

sensoriais, segregando uma delgada cutícula. Imediatamente por baixo da epiderme encontra-se a musculatura principal do corpo, composta de uma camada externa circular e uma interna longitudinal, a que se junta freqüentemente uma camada de fibras oblíquas (musculatura diagonal).

Dentro do corpo está o celoma, uma cavidade que se estende através de todo comprimento da minhoca. Ele é cheio de líquido celomático que envolve o canal alimentar (MEINICKE, 1983).

A minhoca não possui nenhum órgão especializado para a respiração que é cutânea se processando através da pele. A epiderme funciona como uma membrana semipermeável através da qual o CO₂ no sangue dos capilares é trocado com o O₂ da atmosfera. Entretanto para que as trocas respiratórias ocorram normalmente é necessário que a pele se mantenha úmida, de tal forma que, se ressecar o animal morre por asfixia. A pele é mantida úmida pela própria umidade do solo e em parte pelo muco secretado por células glandulares epiteliais e pelo líquido celomático eliminado através dos poros dorsais (RIGHI, 1966).

Segundo MEINICKE (1983) além de contribuir para a manutenção da superfície do corpo úmida e em condições favoráveis para as trocas respiratórias, o líquido celomático pode ser eliminado em situações de perigo como, por exemplo, quando o animal é exposto a condições de temperatura desfavoráveis ou vítima de irritação mecânica ou química.

O sistema digestivo é relativamente simples consistindo, de maneira geral, de canal bucal, faringe, esôfago, papo e moela seguido pelo intestino anterior que secreta enzimas e o posterior que absorve nutrientes (EDWARDS & FLETCHER, 1988).

O tubo digestivo é retilíneo da boca ao ânus. A boca situa-se no primeiro segmento, denominado peristoma, e o ânus em um anel, denominado pigídio, seguinte ao último segmento. Sobre a boca há uma projeção sensorial, o prostômio,

que proporciona a seleção de alimento e a direção para cavar (RIGHI, 1997). A faringe, que liga a boca ao esôfago, funciona como uma espécie de bomba de sucção, sugando o alimento ingerido. O esôfago se estende a partir da faringe até o papo e a moela. O papo empurra o alimento para a moela que, com ajuda de fortes contrações musculares, o esmaga para posterior digestão. Atrás da moela, começa o intestino onde ocorre a maior parte da digestão e absorção. O alimento atravessa 100 ou mais segmentos numa espécie de refinamento (MEINICKE, 1983).

A área de superfície do intestino é quase duplicada por uma prega longitudinal dorsal denominada tiflossole (VILLEE et al., 1985) por meio da qual a superfície do epitélio ativo na digestão é notavelmente aumentada (KÜKENTHAL et al., 1986).

A minhoca se alimenta enquanto vai movimentando-se através do solo. Através do ânus, no segmento da extremidade posterior, o solo junto aos minerais e a matéria orgânica são liberados na forma de aglomerados. A excreção líquida é feita por órgãos especiais denominados nefridios (MEINICKE, 1983).

O material ingerido, recebe um muco para facilitar o seu deslocamento ao longo do tubo digestivo onde é triturado e sofre ação de várias enzimas como a protease, que age sobre a proteína, a amilase, que converte o amido em açúcar, a lipase, que intervém na digestão da gordura, a quitinase, que atua sobre a quitina de restos de artrópodes ingeridos e, inclusive, a celulase, permitindo ao animal degradar a celulose das células vegetais (MEINICKE, 1983).

As minhocas podem apresentar, próximo ao esôfago, glândulas ricamente vascularizadas, denominadas glândulas calcíferas ou glândulas de Morren que, segundo BACHELIER²⁶ citado por ASSAD (1997), exercem importante influência no controle dos teores de cálcio, magnésio, estrôncio e fosfatos no seu sangue.

²⁶ BACHELIER, G. La faune des sols, son écologie et son action. Orstom, 1978. 391 p.

Segundo BARNES (1984) em minhocas adultas, alguns segmentos adjacentes estão espessados e intumescidos por uma zona glandular que recebe, em conjunto, o nome de clitelo, cobrindo total ou parcialmente estes segmentos, formando uma espécie de faixa ao redor do corpo. A posição do clitelo ao longo do corpo é variável mas, geralmente, se localiza na metade anterior do animal e tem apenas alguns segmentos, oscilando seu número consideravelmente entre espécies, porém raramente ultrapassando dez.

São animais hermafroditas, isto é, possuem bissexualidade, embora a grande maioria das espécies dependa de dois exemplares para a mútua fecundação. Raras são as autofecundáveis ou que praticam partenogênese (LONGO, 1987). O clitelo é sua estrutura reprodutora característica e seu desenvolvimento geralmente coincide com a maturidade sexual (BARNES, 1984), tendo participação muito importante no desenrolar da copulação e reprodução (MEINICKE, 1983) estando associado à produção dos casulos, uma espécie de cápsula que envolve os ovos (RIGHI, 1966).

Segundo ASSAD (1997) o número de casulos e ovos, o período de incubação e a expectativa de vida dos novos indivíduos gerados variam muito conforme a espécie, o ambiente e a disponibilidade de alimento.

O principal caráter da organização nervosa da minhoca é que a musculatura de todas as partes do corpo está coordenada pela repetição metamérica de reflexos intra e intersegmentares. Durante a locomoção, cada segmento exerce a um determinado momento uma tração sobre os segmentos que o seguem, a qual excita as terminações nervosas intramusculares, que são o ponto de partida de um arco reflexo, provocando a contração da musculatura circular e o alongamento da longitudinal com a conseqüente distensão (RIGHI, 1966).

O movimento dos animais é peristáltico, com gânglios nervosos segmentares regulando as contrações alternas da musculatura parietal, circular e longitudinal. As

contrações musculares agem sobre o líquido celomático, que funciona como esqueleto hidrostático (RIGHI, 1997).

Segundo MEINICKE (1983) uma faculdade muito desenvolvida que possuem as minhocas é o poder de regeneração de parte do corpo, quando perdida por acidente. Assim se a minhoca é seccionada ao longo da metade final de seu corpo, serão restabelecidos os segmentos correspondentes a essa região. Porém se o corpo é seccionado na metade anterior as chances de regeneração são reduzidas. Isto porque para que ocorra a regeneração o sistema nervoso precisa ser preservado e sua maior concentração localiza-se na parte anterior do corpo.

2.5.2 ALIMENTAÇÃO, EXCREÇÃO E HÁBITOS COMPORTAMENTAIS

As minhocas são animais saprófitas tendo sua dieta composta principalmente de detritos orgânicos em vários estágios de decomposição (LEE, 1985). Assim, normalmente, evidenciam-se maiores densidades populacionais em solos ricos em matéria orgânica ou que possuam ao menos uma camada de húmus na superfície (BARNES, 1984).

As minhocas não prejudicam as raízes das plantas porque, pois só se alimentam de matéria orgânica em decomposição (VIEIRA, 1986).

Segundo BRADY (1979) durante a passagem do solo pelo seu corpo tanto a matéria orgânica que lhe serve de alimento quanto os elementos minerais são submetidos às enzimas digestivas e a um processo de trituração.

A minhoca ingere e digere os resíduos orgânicos, dejetando excrementos com forma especial, constituídos de agregados de terra e matéria orgânica digerida, os quais recebem o nome de coprólitos (KIEHL, 1985).

De acordo com RIGHI (1997) as minhocas são classificadas em categorias ecológicas, sendo denominadas de epigeicas as espécies que vivem na superfície

do solo, sendo este apenas um refúgio temporário, tendo na serrapilheira seu ambiente primário; anécicas, as que cavam galerias no solo e a noite vêm a superfície para se alimentar e, endogeicas, as que habitam o solo mineral, alimentando-se de matéria orgânica mais ou menos integrada ao solo, raízes em decomposição e microrganismos sendo consideradas cavadoras de profundidade.

Segundo BOUCHÉ²⁷ citado por ASSAD (1997) as epigeicas por viverem em acúmulos de materiais orgânicos da superfície do solo estão muito expostas às adversidades climáticas e aos predadores. As anécicas resistem a períodos de seca entrando em diapausa, ou seja, cessam a atividade metabólica e enrolam-se em torno do próprio corpo dentro de pequenas cavidades construídas no solo. São responsáveis pela construção de galerias verticais por onde penetram restos orgânicos, que usam como alimento, misturados ao solo coletado em profundidade. As endogeicas resistem aos períodos de seca, passando por estágios de quiescência com redução da atividade metabólica e vivem permanentemente dentro do solo onde se alimentam, essencialmente de matéria orgânica intimamente ligada a fração mineral do solo e, encontram-se, relativamente protegidas, da ação de predadores e das variações climáticas intensas.

De acordo com PEARCE²⁸ citado por RIGHI (1997) o exame do conteúdo do tubo digestivo permite separá-las em duas categorias alimentares: detritívoras, quando o conteúdo predominante é de restos orgânicos com estrutura celular reconhecível, englobando as epigeicas e anécicas, que se alimentam diretamente da serrapilheira e, geófagas, quando o conteúdo predominante é formado por restos orgânicos sem estrutura celular reconhecível, englobando as endogeicas, que alimentam-se mais ativamente devido ao menor valor nutritivo da matéria orgânica dispersa entre as partículas minerais do solo.

²⁷ BOUCHÉ, M.B. *Lombriciens de France, écologi et systématique*. Versailles, 1972.

²⁸ PEARCE, T. G. Gut contents of some lumbricid earthworms. *Pedobiologia*, 1978.

Os excrementos consistem da mistura de materiais orgânicos e inorgânicos do solo que são liberados depois de passar através do intestino (LEE, 1985). A proporção dos componentes depende do regime alimentar, se detritívoro ou geófago. Espécies pertencentes a categoria epigeica depositam seus excrementos na superfície do solo. As anécicas e endogeicas evacuam tanto na superfície quanto em galerias no interior do solo ou somente neste último local. A evacuação no interior do solo ultrapassa muito a feita na superfície (RIGHI, 1997).

Produtos nitrogenados provenientes do metabolismo das minhocas retornam ao solo de quatro maneiras: a) nos excrementos que concentram a maioria do nitrogênio dos tecidos das plantas que passam através do intestino com pouca mudança química, embora alguns resíduos metabólicos nitrogenados sejam também incluídos; b) na urina por onde são excretados a maioria dos produtos residuais metabólicos nitrogenados; c) em mucoproteínas secretadas pela superfície do corpo das minhocas para mantê-lo lubrificado e d) nos tecidos de minhocas mortas que contêm entre 60 e 70% da matéria seca representada pelas proteínas (LEE, 1985).

Segundo BARNES (1984), durante as épocas de seca ou de inverno as minhocas migram para os níveis mais profundos do solo. Determinadas espécies são capazes de se encistar durante condições ambientais desfavoráveis. O animal secreta um forte revestimento mucoso que forma a parede do cisto. Algumas espécies formam cistos de verão para proteger-se contra a dessecação. Outras formam cistos de inverno quando a temperatura da água do solo torna-se baixa

As minhocas reagem negativamente à luz, razão pela qual a maioria das espécies vem à superfície do solo somente à noite, para alimentar-se e copular (MEINICKE, 1983).

A natural aversão à luz denomina-se fototaxia negativa e aumenta na razão inversa da presença de pigmentos na sua textura tegumentar. Sua tendência de se aprofundarem no solo denomina-se geotropismo positivo (LONGO, 1987).

As galerias predominam nos horizontes superficiais, de 0 a 30 cm de profundidade, mas podem chegar até grandes profundidades (RIGHI, 1997).

Em condições naturais as minhocas estão continuamente absorvendo água pela pele e excretando-a pelos nefrídios. A quantidade de água eliminada atinge até 60% do peso do corpo por dia, o que representa uma quantidade excepcionalmente elevada (RIGHI, 1966).

O sentido do tato é altamente desenvolvido nas minhocas (MEINICKE, 1983) mantendo estas um constante contato com as paredes das galerias que habitam (RIGHI, 1966). Como as minhocas são lucífugas e dotadas de tigmotactismo positivo sua locomoção só é efetiva entre os detritos de serrapilheira ou no interior do solo (RIGHI, 1997).

2.5.3 MANEJO POPULACIONAL

Segundo PEREIRA (1988) se em um determinado solo não há minhocas isto se deve a presença no mesmo de características não favoráveis a sua existência. Nesse caso sua introdução nesse solo será inútil enquanto prevalecerem as condições locais que as impedem de viver. Em solos que revelam pequenas populações seu aumento pela inoculação também não trará efeito significativo. Neste caso basta modificar os métodos de manejo do solo para que ocorra o aumento natural do número de indivíduos. Geralmente, na maioria dos solos agrícolas, é possível a manutenção da populações a níveis desejáveis, simplesmente pela adoção de práticas de manejo adequadas, dispensando-se sua inoculação.

2.5.4 INFLUÊNCIA NAS PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO

As minhocas são, provavelmente, os mais importantes invertebrados habitantes do solo uma vez que, de acordo com MINNICH (1977), através de suas constantes escavações de galerias e liberação de dejetos, interferem nas propriedades físicas e químicas do solo, tornando-as mais propícias ao crescimento das plantas.

Segundo CONROY (1994) as minhocas podem influenciar positivamente na incorporação e decomposição da matéria orgânica, na estabilidade dos agregados, na atividade microbiana e na porosidade e infiltração de água sendo que, em muitos casos, o resultado final de sua atividade, nas características físicas e químicas do solo, tem sido o aumento na produtividade agrícola.

De acordo com RIGHI (1997) o valor fundamental das minhocas é o processamento e incorporação da matéria orgânica ao solo mineral, principalmente no horizonte A_1 , graças à deposição de excrementos sobre ou no interior do solo. Embora a decomposição da matéria orgânica seja uma atividade realizada principalmente pelos microrganismos do solo, sua incorporação é um trabalho predominante das minhocas. Desta forma segundo EDWARDS et al. (1995) elas podem representar uma enorme contribuição na dinâmica da decomposição da matéria orgânica nos agroecossistemas.

Os efeitos físicos das minhocas resultam de seu movimento no solo, escavação de galerias e produção de excrementos (LEE, 1985).

O hábito de cavar galerias e revolver grandes quantidades de solo oferece grande contribuição na estrutura, aeração e drenagem do solo (EDWARDS et al., 1995).

As extensas galerias aumentam a drenagem e a aeração do solo e suas manobras de escavação misturam e revolvem o solo. Os materiais mais profundos

do solo são levados à superfície do mesmo modo que substâncias orgânicas e excrementos são deslocados para níveis inferiores (BARNES, 1984).

As galerias resultantes do trabalho das minhocas transformam-se em passagens naturais para as raízes. Sua atividade escavadora inicia-se na camada superficial e penetra gradualmente até o subsolo, propiciando não apenas o desenvolvimento do sistema radicular das plantas mas, também, sua fertilização com o depósito de matéria orgânica (PEREIRA, 1988).

Em consequência das múltiplas galerias escavadas durante seus deslocamentos contribuem ativamente para tornar o solo menos compacto, facilitando seu arejamento (RIGHI, 1966).

Segundo PEREIRA (1988) os resultados da atividade das minhocas tornam-se mais importantes à medida que a estrutura do solo declina. Assim, em solos naturalmente bem estruturados, seus efeitos na produtividade da culturas são menos perceptíveis.

As minhocas não são essenciais para que os solos sejam capazes de atingir boa estrutura porém, quando presentes, geralmente tem uma influência predominante na agregação do solo (EDWARDS et al., 1995).

Segundo EDWARDS & BOHLEN (1996) as minhocas desempenham importante função na desagregação da matéria orgânica realizando, também, a reciclagem dos nutrientes nela contidos. Além disso seu material fecal, na forma de dejetos que podem variar grandemente em forma e tamanho, são depositados na superfície do solo, em suas galerias ou em espaços abaixo da superfície, tendo papel principal no desenvolvimento dos horizontes do solo. Também influenciam a estrutura do solo formando agregados e melhorando as condições físicas para absorção de nutrientes e crescimento das plantas. Além disso elevam o nível de fertilidade do solo, acelerando a decomposição da matéria orgânica e liberando nutrientes em formas disponíveis para absorção pelas plantas.

Duas das mais importantes características estruturais do solo são influenciadas pelas minhocas: a agregação do solo e a macroporosidade (EDWARDS et al., 1995).

Segundo TOMLIN et al. (1995) a maior agregação do solo promovida pelas minhocas deve-se as quantidades de solo e matéria orgânica ingeridos e a formação e estabilização de agregados ocorrida em seus excrementos. Provavelmente tal fato seja decorrente destas promoverem uma aceleração da velocidade de associação entre as partículas minerais e orgânicas quando de sua passagem pelo seu tubo digestivo. Além disso a formação de agregados predominando sobre sua destruição promove uma melhoria na estrutura do solo.

De acordo com LEE (1985), a adesão de partículas minerais e orgânicas para formação de agregados é a característica física de maior importância ao solo por sua influência na aeração, infiltração e capacidade de retenção de água, presença de canais para crescimento das raízes, disponibilidade de sítios de absorção de nutrientes pelas plantas, atividade microbiana e, dentre outros fatores, na fertilidade do solo.

Segundo RIGHI (1997) além das minhocas serem os principais responsáveis pela formação de agregados nos horizontes superficiais do solo, melhoram também a condição de porosidade total do solo. Entretanto, o aumento da taxa de porosidade de um solo habitado por minhocas não restringe-se apenas na macroporosidade proporcionada pelas galerias mas também às mudanças estruturais originadas pelos dejetos.

De acordo com PEREIRA (1988), de um modo geral, há uma relação direta entre a taxa de infiltração de água e a densidade de minhocas. Assim, quanto maior a quantidade de minhocas no solo melhor será a retenção e menores as perdas de água. Desta forma uma alta população de minhocas é desejável, na medida em que se consegue reduzir os efeitos da erosão.

As minhocas são conhecidas pelo importante impacto que causam na fertilidade dos solos, pelas mudanças provocadas nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas (BOHLEN et al., 1995). Seus efeitos podem ser diretos, em função de sua alimentação, excreção e galerias, ou indiretos, resultantes de suas numerosas interações com microrganismos e processos dinâmicos do solo (EDWARDS et al., 1995).

As minhocas interferem nas características químicas do solo por meio de seus dejetos, excretas, secreções e cadáveres. Sua interferência direta é significativa porém discreta, predominando a ação indireta que consiste em incrementar a atividade dos microrganismos do solo (RIGHI, 1997).

De acordo com PEREIRA (1988) as minhocas reciclam grande quantidade de nutrientes durante todo seu ciclo de vida, contribuindo com o acréscimo da fertilidade do solo, pelo aumento na disponibilidade de elementos inorgânicos. Segundo EDWARDS et al. (1995) quantidades significativas de nutrientes podem passar diretamente através da biomassa de minhocas nos agroecossistemas.

A atividade das minhocas aumenta consideravelmente o teor do solo em elementos minerais solúveis (MEINICKE, 1983).

Os nutrientes minerais nos excrementos das minhocas bem como nas paredes de suas galerias são em forma prontamente disponível às plantas (EDWARDS & FLETCHER, 1988).

A disponibilidade de nutrientes nos excrementos das minhocas e paredes de suas galerias é geralmente maior que no solo ao redor. Isto porque há indicações de que nestes locais ocorrem transformações específicas de nutrientes (BLAIR et al., 1995).

Segundo LEE (1985) e EDWARDS & BOHLEN (1996) as concentrações de cálcio trocável, magnésio e potássio são geralmente maiores nos excrementos das minhocas que no solo subjacente.

Embora relativamente pouco se conheça sobre os efeitos das minhocas no ciclo do nitrogênio, existem evidências de que os excrementos e paredes das galerias podem ser importantes microsítios para sua perda por desnitrificação ou volatilização e entrada por fixação (BLAIR et al., 1995).

De acordo com KIEHL (1985) as dejeções são pobres em argila e ricas em matéria orgânica, nitrato, fósforo, potássio cálcio e magnésio apresentando, também, alta capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação de bases (V%). Os coprólitos contém maior concentração de nutrientes que o solo onde se encontram pelo fato do solo do coprólito estar misturado com a matéria orgânica e secreções intestinais e urinárias. Além disso a reação dos coprólitos tende a ser sempre mais neutra do que a do solo ingerido mesmo quando este é mais ácido ou alcalino.

Segundo MEINICKE (1983) a melhoria da produtividade agrícola através da ação das minhocas é muito difícil de ser constatada pois geralmente os solos considerados adequados para sua sobrevivência são também de alta produtividade. Solos improdutivos não melhoram sua produtividade apenas com a introdução de minhocas. Entretanto, possibilitando a estes animais condições favoráveis em termos de alimento, pH, umidade, etc, produzirão um contraste de produtividade em comparação a área vizinha, sem sua presença mas que recebeu os mesmos tratamentos.

2.5.5 INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE E DISPERSÃO MICROBIANA

Um grande número e diversidade de espécies de microrganismos são comumente encontrados no trato digestivo das minhocas (EDWARDS & FLETCHER, 1988). Entretanto, é geralmente aceito que seu intestino contém, essencialmente, as mesmas espécies de organismos presentes no solo no qual estão vivendo (SATCHELL, 1983).

Enquanto a maioria das espécies microbianas tem seu número de indivíduos proliferado durante a passagem através do intestino da minhoca, outras são mortas durante este percurso (EDWARDS & FLETCHER, 1988).

Um grande número de fatores como, por exemplo, enzimas e presença de substâncias antibióticas, pode influenciar na habilidade dos organismos em sobreviverem ou não a passagem através do intestino das minhocas e sua conseqüente capacidade de se restabelecerem e proliferarem ou não nos seus excrementos (BROWN, 1995).

Segundo EDWARDS & BOHLEN (1996) a população microbiana nos excrementos das minhocas é muito maior que o solo ao redor apresentando, geralmente, maior número de bactérias, fungos e actinomicetos como, também, uma maior atividade enzimática.

O aumento da atividade microbiana nos excrementos das minhocas deve-se às transformações sofridas pela matéria orgânica em sua passagem pelo intestino desses animais (RIGHI, 1997). Porém a magnitude do aumento microbiano depende muito da quantidade e tipo de material vegetal e solo ingeridos (SATCHELL, 1971).

Segundo BROWN (1995) as minhocas podem influenciar a densidade, diversidade, estrutura e atividade das comunidades microbianas do solo de diferentes formas e em vários níveis. Estas podem ser afetadas pelas mudanças físicas, químicas e biológicas induzidas pelos hábitos alimentares das minhocas como, também, por suas excreções e construção de galerias provocando, assim, o aumento ou redução nas populações de certas espécies, dependendo de sua habilidade em se adaptar a condição criada por estes animais.

As minhocas mantém complexas interações com os microrganismos podendo, dentre outros efeitos, dispersá-los através do solo (EDWARDS & BOHLEN, 1996).

De acordo com EDWARDS & BOHLEN (1996), dentre os grupos microbianos dispersados pelas minhocas encontram-se microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, simbiontes de raiz (fungos micorrízicos, rizóbios, etc), agentes de biocontrole, etc. Entretanto, segundo BROWN (1995), as minhocas podem, também, dispersar organismos nocivos como, por exemplo, fungos e bactérias fitopatogênicas, nematóides parasitas de plantas, etc. Todavia, de acordo com o mesmo autor, os efeitos benéficos das interações entre minhocas e microrganismos, sobre o solo e produtividade das plantas, parecem superar seus efeitos negativos.

Segundo EDWARDS et al. (1995) as interações entre minhocas e microrganismos benéficos como fungos micorrízicos e rizóbios podem influenciar positivamente no crescimento das culturas em campo.

De acordo com EDWARDS et al. (1995) e EDWARDS & BOHLEN (1996) as minhocas tem apresentado influência significativa na dispersão de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares que formam uma importante associação mutualista com raízes de plantas aumentando seu crescimento.

Segundo DOUBE et al. (1994) é possível que as minhocas possam ser usadas para introduzir e dispersar rizóbios selecionados quanto a eficiência simbiótica, em solos com deficiência em bactérias efetivas na nodulação e, assim, aumentar a produtividade das plantas. Entretanto, segundo os mesmos, são insuficientes as informações disponíveis a respeito da função de diferentes espécies de minhoca na dispersão dos rizóbios através do solo.

DANSO & BOWEN (1989) observaram que a quantidade de nitrogênio fixado pelo rizóbio foi aumentada quando o mesmo foi inoculado no solo comparado ao nitrogênio fixado quando foi inoculado apenas nas sementes. Isto porque, segundo

HARDARSON et al. (1989), o movimento dos rizóbios no solo e na rizosfera é limitado sendo a nodulação restrita às áreas onde os rizóbios estão localizados e, sua distribuição no solo, resulta em melhor nodulação e um aumento no nível de nitrogênio fixado. Assim, segundo DOUBE et al. (1994), uma melhoria na dispersão dos rizóbios através do solo pode melhorar sua competitividade nodular e a porcentagem de nitrogênio derivado da fixação aumentando, conseqüentemente, o crescimento da planta.

MADSEN & ALEXANDER²⁹ citados por EDWARDS et al. (1995) e por DOUBE et al. (1994) demonstraram que *Lumbricus rubellus* aumentou a dispersão de *Bradyrhizobium japonicum* e *Pseudomonas putida* a maiores profundidades no solo.

DOUBE et al.³⁰ citados por EDWARDS et al. (1995) demonstraram que *Aporrectodea trapezoides* aumentou o grau de dispersão de *Rhizobium meliloti*, a colonização de raízes e a quantidade de nódulos em plantas de alfafa. De acordo com os mesmos o número de bactérias associadas com raízes de alfafa na profundidade de 3 - 9 cm aumentou significativamente na presença de *A. trapezoides*, havendo também cerca de 3 vezes mais nódulos nas raízes em vasos com minhocas do que nos sem minhocas.

DOUBE et al.³¹ citados por DOUBE et al. (1994) mostraram que *Aporrectodea trapezoides* e *Aporrectodea rosea* podem dispersar *Pseudomonas corrugata* através do solo por 10 - 20 cm em 4 - 8 dias.

²⁹ MADSEN, E.L.; ALEXANDER, M. Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* through soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* v. 46, 1982. p. 557-560.

³⁰ DOUBE, B.M.; STEPHENS, P.M.; DAVOREN, C.W.; RYDER, M.H. Interactions between earthworms, beneficial soil microorganisms and root pathogens. *J. Appl. Soil Ecol.* (in press), 1994.

³¹ DOUBE, B.M.; RYDER, M.H.; DAVOREN, C.W.; MEYER, T. Earthworms: A down-under delivery service for biocontrol agents of root disease. *Acta Zool Fennici* (in press), 1994.

DOUBE et al. (1994) observaram que a presença da minhoca *Aporrectodea trapezoides* resultou, em relação a sua ausência, em um acréscimo 5 vezes maior no número total de nódulos nas raízes de trevo sendo este número 4 a 6 vezes maior nas raízes primárias 2 - 8 cm abaixo da superfície do solo.

STEPHENS et al. (1994) na presença das minhocas *Aporrectodea trapezoides* e *Microscolex dubius* detectaram mais de 10^4 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Rhizobium meliloti* por grama de solo a 90 mm de profundidade 18 dias após a inoculação das minhocas enquanto que, na sua ausência, esse número de UFC não foi detectado a essa profundidade, no mesmo período de tempo. Além disso, na presença de *Aporrectodea trapezoides*, contabilizaram 10^3 UFC de *Rhizobium meliloti* por 10 mm de raiz de alfafa, na mesma profundidade do solo e período de tempo após a inoculação das minhocas enquanto que, na sua ausência, foram detectadas menos de 3 UFC.

Segundo HEIJNEN & MARINISSEN (1995) quatro espécies de bactérias (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* e *Flavobacterium* spp.) foram inoculadas em um solo franco arenoso e transportadas por minhocas da espécie *Lumbricus rubellus* para solos não inoculados. De acordo com os mesmos, o transporte de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e *Pseudomonas fluorescens* ocorreu, principalmente, por meio dos excrementos das minhocas enquanto que, para *Flavobacterium* spp. e *Pseudomonas cepacia*, a maioria das células foram transportadas pela epiderme das minhocas.

2.5.6 INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO DAS PLANTAS

Estudos tem evidenciado que as minhocas tanto podem favorecer o crescimento das plantas quanto não ter efeito algum ou ainda sua presença representar uma redução sobre o mesmo (DOUBE et al.,1997).

PASHANASI et al. (1992) observaram o efeito da minhoca *Pontoscolex corethurus* em mudas de pupunha (*Bactris gasipaes*), urucum (*Bixa orellana*) e araça (*Eugenia stipitata*). Após 120 dias da inoculação verificaram, em relação ao tratamento controle (TC) sem minhocas, aumentos significativos no crescimento das plantas de urucum e araça e, ao contrário, uma redução no crescimento da pupunha. Os efeitos da inoculação das minhocas foram altamente positivos no crescimento do urucum (14 – 24 > TC), moderados no araça (1,6 a 2,5 > TC) e negativos na pupunha (1,8 a 2,7 < TC). Segundo os autores, as respostas podem variar muito entre as espécies de plantas dependendo, provavelmente, da estrutura e função de seu sistema radicular.

DOUBE et al. (1997) avaliaram o efeito de duas espécies de minhoca (*Aporrectodea trapezoides* e *Aporrectodea rosea*) sobre as taxas de crescimento de trigo, cevada e feijão fava em três solos de diferentes texturas.

No experimento 1, com trigo, a presença de *A. trapezoides* foi associada a um aumento de 31% no crescimento das plantas no solo franco arenoso não tendo, porém, efeito significativo nos solos franco e argiloso.

No experimento 2, com feijão fava, a presença de ambas as espécies não representou nenhum efeito significativo na matéria seca das plantas, exceto para o solo franco onde houve redução em 18% na presença de *A. rosea*.

No experimento 3, com cevada, ambas as espécies causaram no solo franco arenoso um significativo aumento na matéria seca das plantas (60%), no crescimento de raiz (40% para *A. trapezoides* e 30% para *A. rosea*) e na produção de grãos (50% para *A. trapezoides* e 45% para *A. rosea*). Não houve efeito significativo no solo franco. No solo argiloso a presença de ambas as espécies promoveu uma significativa redução na matéria seca da planta e produção de grãos sendo esta maior para *A. trapezoides* (40%) e menor para *A. rosea* (20%).

Segundo MEINICKE (1983) a espécie *Allolobophora caliginosa* aumentou em 77% o rendimento do azevém em comparação com o tratamento controle sem minhocas. No trevo branco a mesma espécie provocou um aumento de apenas 2%. Além disso as minhocas aumentaram também o conteúdo de nitrogênio das plantas em 11% no azevém e apenas 4% no trevo branco. Tal fato parece indicar que as minhocas se adaptaram bem em solo com azevém e este, por sua vez, beneficiou-se com a eficiência de sua atividade.

BAKER et al. (1997) em um experimento desenvolvido em casa de vegetação investigaram a influência das minhocas *Aporrectodea rosea* e *Aporrectodea trapezoides* no crescimento e produção do trigo e trevo.

No trigo *A. trapezoides* aumentou a biomassa das plantas em 39%, a produção de grãos em 35%, o conteúdo de nitrogênio em 14% nos grãos e em 19% na palha. Embora *A. rosea* tenha aumentado em 13% a biomassa das plantas, não teve influência significativa na produção de grãos e no conteúdo de nitrogênio nos grãos e palha.

No trevo, inoculado com rizóbio, *A. trapezoides* aumentou em 21% a biomassa das plantas mas *A. rosea* não teve efeito e nenhuma das espécies teve influência no conteúdo de nitrogênio ou na matéria seca das raízes.

Segundo os autores os resultados sugerem que espécies diferentes de minhoca, mesmo pertencentes ao mesmo gênero, podem ter influência diferenciada na produção vegetal. Embora *A. rosea* tenha tido pouca influência na produção das plantas esta foi significativamente influenciada por *A. trapezoides*. O mecanismo pelo qual *A. trapezoides* aumentou a produção de trigo e trevo em contraste com *A. rosea* não foram completamente compreendidos. Possivelmente *A. trapezoides* tenha se alimentado de maior quantidade dos resíduos de ervilha, adicionados aos vasos como fonte suplementar de alimento as minhocas, do que *A. rosea* liberando, assim, mais nutrientes para o crescimento do trigo e trevo.

STEPHENS et al.³² (1994) citado por DOUBE et al. (1997) observaram maior concentração foliar de nutrientes na presença das minhocas, sugerindo que o mecanismo pelo qual sua atividade aumenta o crescimento das plantas é, em parte, devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes do solo.

³² STEPHENS, P.M.; DAVOREN, C.W.; DOUBE, B.M.; RYDER, M.H. Ability of the earthworms *Aporrectodea rosea* and *Aporrectodea trapezoides* to increase plant growth and the foliar concentrations of elements in wheat (*Triticum aestivum* cv. Spear) in a sandy loam soil. *Biology and Fertility of Soil*, v. 18, p. 150-154, 1994.

3 MATERIAL E MÉTODO

Para o desenvolvimento da presente pesquisa foram realizados três experimentos sendo os dois primeiros executados em condições distintas de solo, ambiente e unidade experimental, com objetivo de avaliar a influência da inoculação de minhocas e *Rhizobium tropici* sobre seis parâmetros do feijoeiro: matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz, matéria seca dos nódulos, matéria seca da planta, número de nódulos e nitrogênio total da parte aérea. O terceiro experimento foi destinado a estimar as populações do rizóbio estabelecidas no solo utilizado como substrato nos experimentos acima mencionados.

3.1 EXPERIMENTO I

Foi desenvolvido em uma estufa (Van der Hoeven) no período de 26 de janeiro a 2 de março de 1998, com temperatura média variando entre $19,9 \pm 0,4$ °C³³ (mínima) e $30,2 \pm 0,9$ °C (máxima). Utilizou-se como substrato amostras de solo coletadas da camada superficial (0 – 20 cm) de um latossolo vermelho amarelo (OLMOS et al., 1984), situado em uma área já anteriormente cultivada com feijão, localizada na Fazenda Experimental do Canguiri, no Município de Pinhais – PR. A análise granulométrica do solo revelou os seguintes resultados: 34,6 % de areia, 18,4% de silte e 47,0% de argila. Sua análise química foi a seguinte: pH CaCl₂ = 5,3; Al⁺³ = 0,0 cmol/dm³; H⁺ + Al⁺³ = 4,96 cmol/dm³; Ca⁺² = 8,0 cmol/dm³; Mg⁺² = 4,4 cmol/dm³; K⁺ = 0,12 cmol/dm³; P = 16,9 mg/dm³ e C = 36 g/dm³.

O experimento foi instalado sob a forma de um arranjo inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2 × 4, com oito tratamentos e quatro repetições sendo, um dos fatores, o inoculante, com dois níveis, um controle não inoculado (NI)

³³ Valores apresentados na forma de média ± erro padrão. Médias de leituras de 30 dias.

e inoculante em turfa, designado como inoculante pó (IP). O outro fator foram as minhocas, com quatro níveis, um controle não inoculado designado como zero minhocas (0M) e inoculações de três (3M), seis (6M) e nove (9M) minhocas/vaso, quantidades equivalentes, respectivamente, a 115, 230 e 345 indivíduos/m².

Como unidades experimentais utilizaram-se vasos plásticos de 3 L de capacidade com 18,25 cm de diâmetro correspondendo a uma área de 0,0262 m², nos quais adicionou-se 1,9 Kg de solo (base seca) na condição natural de fertilidade, previamente peneirado e homogeneizado.

Foram inoculadas minhocas adultas, caracterizadas pelo desenvolvimento do clitelo, pertencentes ao gênero *Amyntas* (família *Megascolecidae*), vulgarmente conhecidas como "minhoca brava" ou "minhoca louca". Antes de serem inoculadas nos vasos, de acordo com seus respectivos níveis, foram lavadas em água esterilizada, secadas em papel toalha e pesadas para determinação das biomassas correspondentes a cada densidade.

A inoculação foi realizada colocando-se as minhocas na superfície do solo para que estas naturalmente penetrassem no mesmo. As minhocas que, no máximo até uma hora após este procedimento, por algum motivo, como presença de danos físicos, morressem ou permanecessem na superfície do solo sem aprofundar-se no mesmo, eram substituídas e, conseqüentemente, reavaliada a biomassa fresca total adicionada a unidade experimental correspondente. Não efetuaram-se reposições posteriores a esta ocasião.

Para evitar a possível fuga das minhocas observou-se as mesmas, desde o momento da inoculação até que estas tivessem completamente penetrado no solo e, nas saídas de drenagem das unidades experimentais, foram colocadas espumas na espessura de aproximadamente 5 mm, cortadas em círculo, no mesmo formato do fundo dos vasos.

Como fonte suplementar de alimento para as minhocas adicionou-se a cada vaso 10 g de palhada de aveia preta (*Avena strigosa* Schreber), previamente fragmentada, secada e esterilizada. A aveia foi adicionada também, nas mesmas condições e quantidade, aos vasos sem minhocas, padronizando-se este

procedimento, portanto, a todas as unidades experimentais, independente da presença ou ausência de minhocas. A quantidade utilizada dessa gramínea forrageira equivale a entre 4 e 5 t/ha de cobertura morta na superfície do solo em uma situação de plantio direto, dependendo de sua condição de umidade no ambiente natural.

A semeadura do feijão foi realizada no dia 26/01/98, uma semana após a inoculação das minhocas, utilizando a variedade FT – Nobre, pertencente ao grupo comercial preto, com hábito de crescimento indeterminado (Tipo II). Com objetivo de eliminar a contaminação superficial das sementes foi realizada sua desinfestação, de acordo com ANDRADE & HAMAKAWA (1994). Na inoculação das sementes, utilizou-se inoculante em turfa, designado como inoculante pó (IP) contendo, como provável concentração bacteriana, entre 10^7 e 10^8 células de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 por grama de inoculante. A dosagem utilizada obedeceu a proporção de 600 g inoculante para 50 kg sementes. Como substância adesiva do inoculante às sementes, utilizou-se solução de sacarose à 20%. Após a inoculação, semearam-se sete sementes/vaso e, com o desbaste, mantiveram-se duas plantas/vaso.

As irrigações foram realizadas regularmente, utilizando água deionizada esterilizada, procurando-se manter uma condição uniforme de umidade entre as unidades experimentais. Além disso, a presença da palhada na superfície do solo, minimizando a evaporação da água e a transferência de calor do ar ao solo, contribuiu para a manutenção de um ambiente favorável aos organismos integrantes do sistema.

A utilização de água deionizada esterilizada tanto nas irrigações quanto na lavagem das minhocas antes de introduzi-las nas unidades experimentais como, também, a desinfestação das sementes e esterilização da palhada foram medidas tomadas para procurar evitar a veiculação e disseminação, via superfície do corpo das minhocas, semente, água de irrigação ou palhada, de microrganismos fitopatogênicos ou antagonicos aos rizóbios fossem estes estabelecidos ou introduzidos pela inoculação das sementes³⁴.

³⁴Embora estes procedimentos minimizassem a possibilidade de tais ocorrências não necessariamente poderiam evitá-las uma vez que a veiculação e disseminação de microrganismos poderia eventualmente ocorrer internamente via sistema digestivo das minhocas.

Preveniu-se a possibilidade de ocorrência de eventuais altas temperaturas a nível de solo não só pela adição de cobertura morta na superfície dos vasos como, também, pelo envolvimento das unidades experimentais com papel alumínio e plástico branco o que reduziu a propagação de calor entre suas paredes limitando sua conseqüente difusão ao solo.

O corte das plantas foi realizado aos 36 dias após a sementeira, por ocasião do início da fase reprodutiva, no estágio de desenvolvimento R5 correspondente à pré-floração, retirando-se, inicialmente, a parte aérea e, posteriormente, com utilização de peneiras, as raízes junto aos nódulos. Paralelamente recolhiam-se e contavam-se as minhocas remanescentes que eram então lavadas, secadas em papel toalha e pesadas para determinação da biomassa fresca recuperada. Enquanto procedia-se a limpeza das raízes separavam-se e contavam-se os nódulos. A parte aérea, raízes e nódulos foram secados em estufa a 65 °C até peso constante. A determinação do nitrogênio total da matéria seca da parte aérea foi realizada utilizando-se a técnica de digestão úmida (método semi-micro Kjeldahl).

Avaliaram-se os seguintes parâmetros: matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz, matéria seca dos nódulos, matéria seca da planta (designando a soma dos parâmetros anteriores), número de nódulos e nitrogênio total da parte aérea.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e, posteriormente, caso o valor F indicasse significância na probabilidade de pelo menos 5% ($F: p \leq 0,05$), efetuada a comparação das médias (Teste de Duncan: 5%) dos parâmetros investigados considerando os fatores isolados e os tratamentos definidos pela combinação entre seus níveis. Os parâmetros referentes aos nódulos (número e matéria seca) tiveram seus dados transformados em \sqrt{x} para análise estatística. Também efetuaram-se interações entre os resultados dos parâmetros avaliados de forma a se analisar a significância de seus coeficientes de correlação linear.

3.2 EXPERIMENTO II

Foi desenvolvido em casa de vegetação também no período de 26/01 (semeadura do feijão) a 02/03/98 (corte das plantas) utilizando-se, como substrato, amostras de solo coletadas no mesmo local do experimento I sendo, porém, corrigidos os níveis de fósforo e potássio pela adição de 200 ppm de P e 100 ppm de K, por meio de uma solução contendo fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e cloreto de potássio (KCl) como fonte de P e K, respectivamente. O solo corrigido apresentou as seguintes características químicas: $\text{pH CaCl}_2 = 5,3$; $\text{Al}^{+3} = 0,0 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$; $\text{H}^+ + \text{Al}^{+3} = 4,78 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$; $\text{Ca}^{+2} = 6,7 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$; $\text{Mg}^{+2} = 4,9 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$; $\text{K}^+ = 1,66 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$; $\text{P} = 59,5 \text{ mg}/\text{dm}^3$ e $\text{C} = 34 \text{ g}/\text{dm}^3$.

O delineamento experimental utilizado foi um arranjo inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3×4 , com doze tratamentos e quatro repetições, sendo um dos fatores o inoculante, com três níveis, um controle, não inoculado (NI), inoculante em turfa, designado como inoculante pó (IP) e inoculante líquido, designado como inoculante líquido (IL). O outro fator foram as minhocas, com quatro níveis, um controle não inoculado designado como zero minhocas (0M) e inoculações de três (3M), seis (6M) e nove (9M) minhocas/tubo, quantidades equivalentes, respectivamente, a 95, 190 e 285 indivíduos/ m^2 .

Como unidades experimentais utilizaram-se tubos de PVC com 50 cm de altura e 20 cm de diâmetro, correspondendo a uma área de $0,0314 \text{ m}^2$, nos quais foram adicionados 12,3 kg do solo (base seca) previamente corrigido, peneirado e homogeneizado.

Esse experimento distinguiu-se do anterior na unidade experimental (tubos contendo maior área e volume de solo), na condição de fertilidade do solo (com correção de P e K), no ambiente (temperatura média, considerando leituras de 30 dias, variando entre $21,3 \pm 0,6 \text{ }^\circ\text{C}$ e $33,2 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$), no fator inoculante para o qual foram utilizados três níveis (não inoculado, inoculante pó e inoculante líquido) tendo-se, conseqüentemente, um maior número de tratamentos e, no maior período de tempo que as minhocas permaneceram nos tubos em relação aos vasos, sendo estas inoculadas duas semanas antes da semeadura do feijão.

Da mesma forma que no experimento anterior, foram inoculadas minhocas adultas pertencentes ao gênero *Amyntas* que antes de serem introduzidas aos tubos de acordo com seus respectivos níveis, foram lavadas em água esterilizada, secadas em papel toalha e pesadas para que fossem determinadas as biomassas correspondentes a cada densidade. O procedimento de inoculação das minhocas foi similar ao descrito no experimento I.

Como fonte suplementar de alimento para as minhocas adicionou-se a cada tubo 15 g de palhada de aveia preta (*Avena strigosa* Schreber), previamente fragmentada, secada e esterilizada. A aveia foi adicionada também, nas mesmas condições e quantidade, aos tubos sem minhocas, padronizando-se este procedimento, portanto, a todas as unidades experimentais, independente da presença ou ausência de minhocas. A quantidade utilizada dessa gramínea forrageira equivale a entre 5 e 6 t/ha de cobertura morta na superfície do solo em uma situação de plantio direto, dependendo de sua condição de umidade no ambiente natural.

Na inoculação das sementes utilizaram-se duas formulações de inoculante sendo uma em pó (turfa) e outra líquida (fluída), ambas contendo, como provável concentração bacteriana, entre 10^7 e 10^8 células de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 por grama (pó) ou mL (líquido) de inoculante. A dosagem utilizada obedeceu a proporção de 600 g de inoculante pó ou 600 mL de inoculante líquido para 50 kg de sementes. Como substância adesiva do inoculante pó às sementes, utilizou-se solução de sacarose à 20%.

Nos demais procedimentos referentes a instalação e condução do experimento assemelhou-se, também, ao experimento I diferindo, apenas, no aspecto de prevenção quanto a ocorrência de eventuais altas temperaturas a nível de solo, pelo envolvimento dos tubos com chapas de isopor com diâmetro aproximado de 5 mm.

As avaliações foram realizadas na mesma época e considerado os mesmos parâmetros do experimento anterior. A análise estatística foi também realizada de forma similar.

3.3 EXPERIMENTO III

Destinou-se a avaliação das populações do rizóbio estabelecidas no solo utilizado como substrato nos experimentos I e II, na sua condição natural de fertilidade. A estimativa do número mais provável (NMP) de células do rizóbio do solo foi realizada pelo teste de infecção em plantas descrito por ANDRADE & HAMAKAWA (1994), utilizando inóculo diluído em série.

Os procedimentos metodológicos iniciaram-se com a preparação, no Laboratório de Biologia do Solo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, de frascos vedados com papel alumínio contendo 500 mL de solução nutritiva completa isenta de nitrogênio (apêndice 1) descrita por SPECHT et al³⁵, citado por PEREIRA (1983), e papel absorvente como suporte para o crescimento da planta, dobrado, formando um canal na sua superfície superior. Os frascos preparados foram, posteriormente, esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos.

As sementes de feijão foram desinfestadas e depois de pré-germinadas em condições assépticas e temperatura controlada foram transferidas para os frascos, através de um pequeno orifício feito no papel alumínio, na mesma posição do canal existente no papel absorvente. Posteriormente, os frascos foram envoltos em papel opaco para evitar a transmissão de luz na região de desenvolvimento das raízes.

No preparo das diluições adicionou-se, primeiramente, 10 g de solo em 90 mL de solução diluente esterilizada, no caso, tampão de fosfato (8,0 g de NaCl, 0,34 g de KH₂PO₄ e 1,21 g de K₂HPO₄, em 1000 mL de água destilada) obtendo-se, assim, a suspensão matriz, a qual foi agitada durante 30 minutos para homogeneização do solo e das células. Para obtenção da primeira diluição a ser utilizada, designada como 10⁻¹, transferiu-se 1 mL da suspensão matriz para um tubo de ensaio contendo 9 mL da solução diluente esterilizada. A próxima diluição foi obtida transferindo-se

³⁵ SPECHT, A.W.; ERDMAN, L.W.; MEANS, V.M.; RESNICKY, J.W. Effect of nutrition of *Trifolium hirtum* inoculated with *Rhizobium trifolii*. Soil Science Society of America Proceedings, Madison, 1956.

1mL da diluição anterior para outro tubo de ensaio contendo 9 mL da solução diluente esterilizada. Fez-se esse procedimento sucessivamente até a obtenção da última diluição a ser utilizada, no caso 10^{-7} . Posteriormente, utilizando-se pipetas esterilizadas, transferiu-se alíquotas de 1 mL de cada diluição para os frascos de vidro contendo as sementes pré germinadas. Prepararam-se, assim, 28 frascos sendo 4 repetições de cada uma das diluições obtidas (10^{-1} a 10^{-7}). Além disso prepararam-se, como controle, mais 4 frascos sem inóculo.

A avaliação quanto a presença (+) ou ausência (-) de nódulos nas plantas foi realizada 4 semanas após a instalação do experimento e a estimativa do número de células/grama de solo obtida de acordo com SOMASEGARAN & HOBEN (1985).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 POPULAÇÕES DE RIZÓBIO

O número mais provável (NMP) de rizóbios no solo utilizado em ambos os experimentos, obtido pelo método de infecção em plantas, foi de $1,7 \times 10^4$ células/g de solo. Esse número pode ser considerado como relativamente alto se comparado aos obtidos por SAITO (1982) que, na contagem do número de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* de dois solos obteve como resultado 50 células/g solo (área pouco cultivada com feijão) e $8,5 \times 10^3$ células/g solo (área freqüentemente cultivada com feijão) considerados, respectivamente, como números relativamente baixo e alto. Também OLIVEIRA (1982) ao realizar contagem de *Bradyrhizobium japonicum* do solo obteve 26 células/g solo (área de pastagem nativa) e $1,7 \times 10^3$ células/g solo (área de cultivo de soja) os quais considerou, respectivamente, como números baixo e alto.

O número obtido ($1,7 \times 10^4$ células/g de solo) caracteriza, portanto, a ocorrência de uma alta população estabelecida de rizóbio nesse solo possivelmente devido ao fato deste ser oriundo de uma área já anteriormente cultivada com feijão. Estes rizóbios podem ser pertencentes a várias espécies capazes de promover nodulação no feijoeiro como, por exemplo, as típicas do feijoeiro como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium tropici* e *Rhizobium etli*, ou ainda alguma outra espécie considerando que segundo ARAÚJO (1994a), o feijoeiro, antes considerado uma leguminosa de nodulação específica, tornou-se hoje uma das leguminosas de nodulação mais promíscua sendo confirmado que rizóbios isolados de diversas outras leguminosas são capazes de induzir a formação de nódulos eficientes ou ineficientes no feijoeiro.

4.2 NÚMERO E BIOMASSA DE MINHOCAS

O número e biomassa de minhocas adicionadas por ocasião de sua inoculação nas unidades experimentais e recuperadas na avaliação dos experimentos pode ser observado nas tabelas 1 (experimento I) e 2 (experimento II).

Verifica-se que, no experimento desenvolvido em vasos, das 144 minhocas adicionadas recuperaram-se 120 correspondendo, portanto, a uma taxa de recuperação de 83,33% (tabela 1). No outro experimento, desenvolvido em tubos, das 216 minhocas adicionadas recuperaram-se 184 correspondendo, portanto, a uma taxa de recuperação de 85,19% (tabela 2).

Com referência à biomassa total adicionada e recuperada correspondente a cada tratamento verifica-se que no experimento desenvolvido em vasos adicionaram-se 136,12 g e recuperaram-se 127,29 g (tabela 1) enquanto que, no desenvolvido em tubos, adicionaram-se 232,78 g e recuperaram-se 232,17 g (tabela 2).

Pela relação entre a biomassa total e número total de minhocas adicionado e recuperado verifica-se que, no experimento em vasos, a biomassa média unitária adicionada foi de 0,95 g enquanto a recuperada foi de 1,06 g e, no experimento em tubos, a biomassa média unitária adicionada foi de 1,08 g enquanto a recuperada foi de 1,26 g.

Verifica-se, portanto, que em ambos os experimentos houve um acréscimo no peso médio unitário das minhocas recuperadas em relação às adicionadas sendo este de 11,58% no experimento em vasos e 16,67% no experimento em tubos. Além disso pode-se constatar também nas tabelas 1 e 2 que este acréscimo no peso médio das minhocas ocorreu em todos os tratamentos considerados em ambos os experimentos.

TABELA 1. AVALIAÇÕES QUANTITATIVAS DAS DENSIDADES E BIOMASSAS DE MINHOCAS ADICIONADAS E RECUPERADAS NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM ESTUFA UTILIZANDO VASOS COMO UNIDADES EXPERIMENTAIS. TOTAIS POR TRATAMENTO. QUATRO REPETIÇÕES.

Tratamentos	Minhocas						
	Densidade		Biomassa (g)		BMUA ⁽¹⁾	BMUR ⁽²⁾	Varição %
	Inicial	Final	Inicial	Final	A	B	(A → B)
Três Minhocas	24	14	27,63	16,25	1,15	1,16	0,87 (+)
✓ Não Inoculado	12	5	15,45	6,90	1,29	1,38	6,98 (+)
✓ Inoculante Pó	12	9	12,18	9,35	1,02	1,04	1,96 (+)
Seis Minhocas	48	45	42,03	49,92	0,88	1,11	26,14 (+)
✓ Não Inoculado	24	23	22,61	25,73	0,94	1,12	19,15 (+)
✓ Inoculante Pó	24	22	19,42	24,19	0,81	1,10	35,80 (+)
Nove Minhocas	72	61	66,46	61,12	0,92	1,00	8,70 (+)
✓ Não Inoculado	36	29	31,21	28,17	0,87	0,97	11,49 (+)
✓ Inoculante Pó	36	32	35,25	32,95	0,98	1,03	5,10 (+)
Total	144	120	136,12	127,29	0,95	1,06	11,58 (+)

⁽¹⁾ Biomassa Média Unitária Adicionada (g)

⁽²⁾ Biomassa Média Unitária Recuperada (g)

TABELA 2. AVALIAÇÕES QUANTITATIVAS DAS DENSIDADES E BIOMASSAS DE MINHOCAS ADICIONADAS E RECUPERADAS NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO UTILIZANDO TUBOS COMO UNIDADES EXPERIMENTAIS. TOTAIS POR TRATAMENTO. QUATRO REPETIÇÕES.

Tratamentos	Minhocas						
	Densidade		Biomassa (g)		BMUA ⁽¹⁾	BMUR ⁽²⁾	Variação %
	Inicial	Final	Inicial	Final	A	B	(A → B)
Três Minhocas	36	33	35,09	45,75	0,97	1,39	43,30 (+)
✓ Não Inoculado	12	12	11,19	15,85	0,93	1,32	41,94 (+)
✓ Inoculante Pó	12	11	11,82	15,85	0,99	1,44	45,45 (+)
✓ Inoculante Líquido	12	10	12,08	14,05	1,01	1,41	39,60 (+)
Seis Minhocas	72	57	75,63	71,33	1,05	1,25	19,05 (+)
✓ Não Inoculado	24	18	23,51	22,05	0,98	1,23	25,51 (+)
✓ Inoculante Pó	24	20	26,73	26,81	1,11	1,34	20,72 (+)
✓ Inoculante Líquido	24	19	25,39	22,47	1,06	1,18	11,32 (+)
Nove Minhocas	108	94	122,06	115,09	1,13	1,22	7,96 (+)
✓ Não Inoculado	36	32	45,20	45,44	1,26	1,42	12,70 (+)
✓ Inoculante Pó	36	32	41,98	38,65	1,17	1,21	3,42 (+)
✓ Inoculante Líquido	36	30	34,88	31,00	0,97	1,03	6,19 (+)
Total	216	184	232,78	232,17	1,08	1,26	16,67 (+)

⁽¹⁾ Biomassa Média Unitária Adicionada (g)

⁽²⁾ Biomassa Média Unitária Recuperada (g)

A alta taxa de recuperação do número de minhocas, superior a 80% em ambos os experimentos, evidencia que um número considerável de minhocas permaneceu em atividade no transcorrer do desenvolvimento dos mesmos e que as unidades experimentais conferiram um ambiente extremamente favorável ao acréscimo de sua biomassa média unitária.

O maior acréscimo na biomassa média unitária verificado no experimento em tubos (16,67%) em relação ao experimento em vasos (11,58%) pode ser devido ao fato das minhocas terem permanecido um maior período de tempo nos tubos do que nos vasos uma vez que foram inoculadas nos tubos uma semana antes da inoculação nos vasos. Além disso o maior volume de solo nos tubos em relação aos vasos proporcionou uma maior disponibilidade de alimento derivado da matéria orgânica do solo e, conseqüentemente, menor concorrência pelo mesmo do que nos vasos onde o menor volume de solo provavelmente resultou em uma maior concorrência tanto por alimento quanto por espaço.

4.3 PARÂMETROS DO FEIJOEIRO

4.3.1 ANÁLISE DAS MÉDIAS

Os resultados referentes aos parâmetros avaliados no experimento desenvolvido em estufa, em vasos e no desenvolvido em casa de vegetação, em tubos, encontram-se nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

TABELA 3. EFEITO DE MINHOCAS E INOCULANTE NOS PARÂMETROS AVALIADOS NO FEIJOEIRO, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM ESTUFA, USANDO VASOS COMO UNIDADES EXPERIMENTAIS. MÉDIAS DE QUATRO REPETIÇÕES. DUAS PLANTAS/VASO ⁽¹⁾.

Inoculante (I)	Minhocas (M)				Média (I) ⁽⁵⁾
	0 M	3 M	6 M	9 M	
Matéria Seca da Parte Aérea (g) ⁽²⁾					
Não Inoculado (N I)	3,15 A	1,87 B	1,99 B	1,57 B	2,15
Inoculante Pó (I P)	2,80 A	1,64 B	1,78 B	1,24 B	1,86
Média (M) ⁽⁴⁾	2,97 A	1,75 B	1,89 B	1,41 B	2,01 ⁽⁶⁾
Matéria Seca da Raiz (g) ⁽²⁾					
Não Inoculado (N I)	0,707 A	0,438 B	0,508 B	0,379 B	0,508
Inoculante Pó (I P)	0,641	0,459	0,461	0,479	0,510
Média (M) ⁽⁴⁾	0,674 A	0,449 B	0,485 B	0,429 B	0,509 ⁽⁶⁾
Matéria Seca dos Nódulos (g) ^{(2) (3)}					
Não Inoculado (N I)	0,0227 A	0,0031 B	0,0050 B	0,0056 B	0,0091
Inoculante Pó (I P)	0,0133	0,0048	0,0020	0,0023	0,0056
Média (M) ⁽⁴⁾	0,0180 A	0,0039 B	0,0035 B	0,0040 B	0,0074 ⁽⁶⁾
Matéria Seca da Planta (g) ⁽²⁾					
Não Inoculado (N I)	3,88 A	2,31 B	2,51 B	1,96 B	2,66
Inoculante Pó (I P)	3,45 A	2,10 B	2,24 B	1,72 B	2,38
Média (M) ⁽⁴⁾	3,67 A	2,21 B	2,37 B	1,84 B	2,52 ⁽⁶⁾
Número de Nódulos (unid.) ^{(2) (3)}					
Não Inoculado (N I)	258 A	75 B	99 B	74 B	127
Inoculante Pó (I P)	166	89	64	55	93
Média (M) ⁽⁴⁾	212 A	82 B	81 B	65 B	110 ⁽⁶⁾
Nitrogênio Total da Parte Aérea (mg) ⁽²⁾					
Não Inoculado (N I)	104,62 A	57,96 B	68,12 B	55,48 B	71,54
Inoculante Pó (I P)	86,44	58,10	67,88	45,67	64,52
Média (M) ⁽⁴⁾	95,53 A	58,03 B	68,00 B	50,57 B	68,03 ⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Em cada parâmetro, médias na mesma linha acompanhadas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. F não significativo para médias na mesma coluna e para médias não seguidas de letras na mesma linha. Análise de variância em anexo nos apêndices 2 e 3.

⁽²⁾ Coeficiente de variação (CV) para matéria seca da parte aérea, 25,09%, matéria seca da raiz, 22,65%, matéria seca dos nódulos, 48,64%, matéria seca da planta, 23,03%, número de nódulos, 31,04% e nitrogênio total da parte aérea, 29,72%.

⁽³⁾ Dados originais que foram transformados em \sqrt{X} para análise estatística.

⁽⁴⁾ Média dos tratamentos com e sem inoculação de rizóbio (8 repetições).

⁽⁵⁾ Média dos tratamentos com e sem inoculação de minhocas (16 repetições).

⁽⁶⁾ Média geral do parâmetro.

TABELA 4. EFEITO DE MINHOCAS E INOCULANTE NOS PARÂMETROS AVALIADOS NO FEIJOEIRO, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO, USANDO TUBOS DE PVC COMO UNIDADES EXPERIMENTAIS. MÉDIAS DE QUATRO REPETIÇÕES. DUAS PLANTAS/TUBO ⁽¹⁾.

Inoculante (I)	Minhocas (M)				Média (I) ⁽⁵⁾
	0 M	3 M	6 M	9 M	
Matéria Seca da Parte Aérea (g) ⁽²⁾					
Não Inoculado (N I)	11,13 Aa	7,68 B	7,10 B	8,50 B	8,60
Inoculante Pó (I P)	8,32 b	7,36	7,64	7,65	7,74
Inoculante Líquido (I L)	8,05 b	7,20	8,61	7,58	7,86
Média (M) ⁽⁴⁾	9,16 A	7,41 B	7,78 B	7,91 B	8,07 ⁽⁶⁾
Matéria Seca da Raiz (g) ⁽²⁾					
Não Inoculado (N I)	1,753 Aa	1,120 B	1,091 B	1,372 Ba	1,334 a
Inoculante Pó (I P)	1,282 b	1,067	1,053	1,017 b	1,105 b
Inoculante Líquido (I L)	1,374 b	1,024	1,153	0,930 b	1,120 b
Média (M) ⁽⁴⁾	1,470 A	1,070 B	1,099 B	1,106 B	1,186 ⁽⁶⁾
Matéria Seca dos Nódulos (g) ^{(2) (3)}					
Não Inoculado (N I)	0,0281	0,0216	0,0157	0,0123	0,0194
Inoculante Pó (I P)	0,0065	0,0192	0,0112	0,0170	0,0134
Inoculante Líquido (I L)	0,0108	0,0071	0,0167	0,0112	0,0114
Média (M) ⁽⁴⁾	0,0151	0,0159	0,0145	0,0135	0,0148 ⁽⁶⁾
Matéria Seca da Planta (g) ⁽²⁾					
Não Inoculado (N I)	12,91 Aa	8,82 B	8,21 B	9,88 B	9,96
Inoculante Pó (I P)	9,60 b	8,45	8,70	8,68	8,86
Inoculante Líquido (I L)	9,44 b	8,23	9,78	8,52	8,99
Média (M) ⁽⁴⁾	10,65 A	8,50 B	8,90 B	9,03 B	9,27 ⁽⁶⁾
Número de Nódulos (unid.) ^{(2) (3)}					
Não Inoculado (N I)	234	246	151	205	209
Inoculante Pó (I P)	154	168	156	151	157
Inoculante Líquido (I L)	196	128	193	115	158
Média (M) ⁽⁴⁾	195	181	166	157	175 ⁽⁶⁾
Nitrogênio Total da Parte Aérea (mg) ⁽²⁾					
Não Inoculado (N I)	409,33 Aa	263,58 B	240,30 B	284,40 B	299,40
Inoculante Pó (I P)	320,02 b	241,70	272,03	260,75	273,62
Inoculante Líquido (I L)	268,61 b	264,58	277,62	293,50	276,08
Média (M) ⁽⁴⁾	332,65 A	256,62 B	263,32 B	279,55 B	283,04 ⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Em cada parâmetro, médias acompanhadas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. F não significativo para médias não seguidas de letras na mesma linha e/ou coluna. Análise de variância em anexo nos apêndices 4 e 5.

⁽²⁾ Coeficiente de variação (CV) para matéria seca da parte aérea, 15,65%, matéria seca da raiz, 19,34%, matéria seca dos nódulos, 49,23%, matéria seca da planta, 15,19%, número de nódulos, 30,20% e nitrogênio total da parte aérea, 15,35%.

⁽³⁾ Dados originais que foram transformados em \sqrt{X} para análise estatística.

⁽⁴⁾ Média dos tratamentos com e sem inoculação de rizóbio (12 repetições).

⁽⁵⁾ Média dos tratamentos com e sem inoculação de minhocas (16 repetições).

⁽⁶⁾ Média geral do parâmetro.

Pode-se observar nas tabelas 3 e 4 que, de um modo geral, em ambos os experimentos e em todos os parâmetros avaliados, as maiores médias obtidas, considerando-se as combinações entre os níveis de minhocas e inoculante, foram as do tratamento controle (OM x NI), sem minhocas e sem inoculante. Além disso, observando-se o efeito isolado apenas do inoculante, na última coluna de cada parâmetro, obtido pela média dos tratamentos com e sem minhocas, ou somente das minhocas, na última linha de cada parâmetro, obtido pela média dos tratamentos inoculados e não inoculados com rizóbio, verifica-se que, de um modo geral, as maiores médias obtidas foram as do nível NI (não inoculado) e OM (sem minhocas), correspondentes, respectivamente, aos tratamentos controle do inoculante e das minhocas. Também verifica-se que, em ambos os experimentos, as médias do tratamento controle (OM x NI) da combinação minhoca x inoculante foram superiores a média geral de todos os tratamentos, em todos os parâmetros avaliados.

Verifica-se que no experimento em vasos (tabela 3), em todos os parâmetros avaliados, não houveram diferenças significativas entre os níveis de inoculante (NI e IP) qualquer que fosse o nível de minhocas considerado (OM, 3M, 6M ou 9M). No experimento em tubos (tabela 4) houveram diferenças significativas entre os níveis de inoculante (NI, IP e IL) apenas no nível OM (sem minhocas) na matéria seca da parte aérea, da raiz e da planta e no nitrogênio total da parte aérea sendo, as melhores médias, correspondentes ao nível NI (não inoculado). Além disso, constatou-se diferença significativa entre os níveis de inoculante no nível 9M (nove minhocas), na matéria seca da raiz, sendo a melhor média também referente ao nível NI (não inoculado).

Observa-se ainda na tabela 3 (experimento em vasos) que houveram diferenças significativas entre os níveis de minhoca (OM, 3M, 6M e 9M) em todos os parâmetros avaliados, principalmente nos tratamentos não inoculados com rizóbio (nível NI) sendo, as melhores médias, relacionadas ao nível OM (sem minhocas). Da

mesma forma, na tabela 4 (experimento em tubos) verifica-se que houveram diferenças significativas entre os níveis de minhoca (0M, 3M, 6M e 9M) em todos os parâmetros avaliados, exceto nos referentes aos nódulos (número e matéria seca), restritas estas porém aos tratamentos não inoculados com o rizóbio (nível NI), sendo as melhores médias correspondentes também ao nível 0M (sem minhocas).

Analisando-se o efeito isolado das minhocas e do inoculante os resultados de ambos os experimentos mostram que as diferenças identificadas entre as médias dos tratamentos definidos pela combinação dos níveis destes fatores foram devidas quase que exclusivamente as minhocas uma vez que, considerando apenas o efeito do inoculante, obtido pela média dos tratamentos com e sem minhocas, conforme se observa na tabela 3 para vasos e 4 para tubos, na última coluna de cada parâmetro, verifica-se que embora a média do nível NI (não inoculado) tenha superado as dos demais níveis (IP para vaso e IP e IL para tubo) em todos os parâmetros avaliados (exceto matéria seca da raiz no experimento em vasos) só foram detectadas diferenças significativas entre as mesmas na matéria seca da raiz do experimento em tubos sendo, a melhor média, referente ao nível NI (não inoculado).

Por outro lado, considerando apenas o efeito das minhocas, obtido pela média dos tratamentos inoculados e não inoculados com rizóbio, observa-se nas tabelas 3 e 4, na última linha de cada parâmetro, que no experimento desenvolvido em vasos (tabela 3) verificaram-se diferenças significativas em todos os parâmetros avaliados sendo a melhor média correspondente ao nível 0M (sem minhocas) e, da mesma forma, no experimento desenvolvido em tubos (tabela 4) constataram-se diferenças significativas em todos os parâmetros avaliados, exceto nos referentes aos nódulos (número e matéria seca), sendo a melhor média também referente ao nível 0M (sem minhocas). Desta forma, na

maioria dos parâmetros avaliados, em ambos os experimentos, as médias definidas pela ausência de minhocas (nível 0M) superaram, significativamente, as obtidas na sua presença em níveis de 3, 6 ou 9 indivíduos/unidade experimental.

Comparando-se os resultados de um mesmo parâmetro entre os dois experimentos observa-se que, embora tratem-se de plantas de mesma idade e do mesmo tipo de solo, as médias obtidas no experimento desenvolvido em tubos foram extremamente maiores do que as do experimento em vasos. Esta diferença deve-se, as condições distintas a nível de fertilidade do solo, ambiente e unidade experimental em que foram realizados estes experimentos sendo, porém, provavelmente devida, principalmente, a variação na condição química do solo utilizado como substrato aos experimentos.

Assim, a correção dos níveis de fósforo e potássio efetuada no solo utilizado no experimento desenvolvido em tubos, possibilitou uma condição química muito mais favorável à nutrição das plantas do que a do solo do experimento em vasos onde não foi realizada adição suplementar de P e K. Assim, comparando-se as médias gerais dos 8 tratamentos do experimento desenvolvido em vasos (tabela 3) com as médias dos 12 tratamentos do experimento desenvolvido em tubos (tabela 4) verifica-se que a dos tubos foram maiores que a dos vasos em 301,5% para matéria seca da parte aérea, 133,0% para matéria seca da raiz, 100,0% para matéria seca dos nódulos, 267,9% para matéria seca da planta, 59,1% para número de nódulos e 316,1% para nitrogênio total da parte aérea. Estes dados confirmam resultados anteriores obtidos por VILA et al. (1996) que observaram redução no número de nódulos e na matéria seca dos nódulos e da planta de feijoeiro pela ausência de fósforo e potássio.

Os resultados de ambos os experimentos evidenciam que, de um modo geral, tanto as minhocas (*Amyntas* spp.) quanto o inoculante (*Rhizobium tropici* SEMIA 4077), em seu efeito isolado ou combinado, causaram reduções em praticamente

todos os parâmetros avaliados, tendo os tratamentos com sua presença valores médios muitas vezes bastante reduzidos se comparados com os tratamentos controle definidos pela sua ausência. Entretanto, os resultados obtidos, em ambos os experimentos, deixam claro também que a magnitude na redução dos parâmetros avaliados foi pouco expressiva e, geralmente não significativa, no que se refere a inoculação das sementes com o rizóbio e, ao contrário, muito expressiva e, geralmente significativa, no que se refere a inoculação das minhocas.

Efeitos negativos no crescimento de plantas devido a presença de minhocas já foram, também, observados por PASHANASI et al. (1992) para pupunha, DOUBE et al. (1997) para feijão fava e cevada, VAN RHEE³⁶ citado por DOUBE et al. (1997) para ervilha e DOUBE & WILLIAMS (dados não publicados) citado por DOUBE et al. (1997) para azevém e trevo. Entretanto, são mais comuns na literatura relatos de efeitos positivos das minhocas e mais raras as referências quanto a seus efeitos negativos no crescimento e produção das plantas.

O feijoeiro possui um sistema radicular considerado superficial e limitado, distribuído em sua maioria nos primeiros 20 cm de profundidade do solo (VIEIRA, 1983; DEBOUCK & HIDALGO, 1985; PORTES, 1988; VIEIRA & HEMP, 1992).

Efeitos negativos de minhocas no crescimento de plantas com sistema radicular deficiente já foram observados por PASHANASI et al. (1992) que atribuíram os resultados desfavoráveis das minhocas no crescimento de mudas de pupunha, como inerentes tanto a fisiologia da planta como, também, a condição rizosférica e seu sistema radicular, dominado por raízes relativamente curtas e grossas, com restrita capacidade de exploração do solo. Ao contrário, obtiveram efeitos extremamente positivos em mudas de urucum que, com raízes relativamente finas e longas, puderam melhor se beneficiar dos nutrientes mobilizados pela atividade das minhocas.

³⁶ VAN RHEE, J.A. Earthworm activity and plant growth in artificial cultures. *Plant and Soil*, v. 22, p. 45-48, 1965.

O solo utilizado como substrato em ambos os experimentos era de textura argilosa, com 47% de argila e, resultados negativos no crescimento das plantas devidos a presença e atividade das minhocas neste tipo de solo, já foram constatados em outros experimentos. DOUBE et al. (1997) obtiveram redução no crescimento e produção de plantas de cevada nesse tipo de solo, devidos a presença e atividade das minhocas *Aporrectodea trapezoides* e *Aporrectodea rosea*. Ao contrário, com as mesmas espécies de minhoca, verificaram aumento no crescimento e produção da cevada em solo franco arenoso. Também DOUBE & WILLIAMS (dados não publicados) citados por DOUBE et al. (1997) observaram, também com as mesmas espécies de minhoca, um aumento significativo no crescimento de azevém e trevo em solo arenoso, mas não em solo franco e argiloso. Segundo os autores, os aumentos no crescimento das plantas em solos de textura mais leve e a influência negativa mais pronunciada nos solos de textura mais pesada, sugere que a textura do solo pode interagir com as minhocas e induzir efeitos no crescimento das plantas.

Embora a expectativa no desenvolvimento dos experimentos fosse de que as minhocas possibilitassem uma maior dispersão do rizóbio no solo contribuindo assim para uma maior colonização radicular, nodulação e quantidade de nitrogênio fixado biologicamente, os resultados obtidos evidenciam um efeito contrário. As tabelas 5 (vasos) e 6 (tubos) indicam que, em ambos os experimentos, não só houve uma redução no número de nódulos devido à presença das minhocas como, também, em todos os demais parâmetros avaliados. Entretanto, embora existam relatos de aumento na nodulação devidos as minhocas, estes acréscimos nem sempre conduzem a um aumento no nível de nitrogênio foliar ou no crescimento das plantas. Tal fato foi constatado por DOUBE et al. (1994) quando verificaram que, embora minhocas da espécie *Aporrectodea trapezoides* tenham ocasionado maior dispersão de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* e possibilitado, em relação a sua ausência, um aumento cinco vezes maior na nodulação de trevo subterrâneo, esta nodulação adicional, não afetou o nitrogênio foliar ou o crescimento das plantas.

TABELA 5. VARIAÇÕES PERCENTUAIS NOS PARÂMETROS DO FEIJOEIRO, DEVIDO A INOCULAÇÃO DE MINHOCAS, EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE (NÍVEL 0M), SEM MINHOCAS, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM VASOS ⁽¹⁾.

Número de Minhocas	Matéria Seca				Número de Nódulos	Nitrogênio Total da Parte Aérea
	Parte Aérea	Raiz	Nódulos	Planta		
	%					
Três	41,08 (-) ⁽²⁾	33,38 (-)	78,33 (-)	39,78 (-)	61,32 (-)	39,25 (-)
Seis	36,36 (-)	28,04 (-)	80,56 (-)	35,42 (-)	61,79 (-)	28,82 (-)
Nove	52,53 (-)	36,35 (-)	77,78 (-)	49,86 (-)	69,34 (-)	47,06 (-)
Variação Média	43,32 (-)	32,59 (-)	78,89 (-)	41,69 (-)	64,15 (-)	38,38 (-)

⁽¹⁾ Variações considerando a média dos tratamentos com e sem inoculação de rizóbio.

⁽²⁾ (-) = Decréscimo.

TABELA 6. VARIAÇÕES PERCENTUAIS NOS PARÂMETROS DO FEIJOEIRO, DEVIDO A INOCULAÇÃO DE MINHOCAS, EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE (NÍVEL 0M), SEM MINHOCAS, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM TUBOS ⁽¹⁾.

Número de Minhocas	Matéria Seca				Número de Nódulos	Nitrogênio Total da Parte Aérea
	Parte Aérea	Raiz	Nódulos	Planta		
	%					
Três	19,10 (-) ⁽²⁾	27,21 (-)	5,30 (+) ⁽³⁾	20,19 (-)	7,18 (-)	22,86 (-)
Seis	15,07 (-)	25,24 (-)	3,97 (-)	16,43 (-)	14,87 (-)	20,84 (-)
Nove	13,65 (-)	24,76 (-)	10,60 (-)	15,21 (-)	19,49 (-)	15,96 (-)
Variação Média	15,94 (-)	25,74 (-)	3,09 (-)	17,28 (-)	13,85 (-)	19,89 (-)

⁽¹⁾ Variações considerando a média dos tratamentos com e sem inoculação de rizóbio.

⁽²⁾ (-) = Decréscimo.

⁽³⁾ (+) = Acréscimo.

Também observa-se nas tabelas 5 e 6, comparando-se os níveis percentuais médios de redução nos parâmetros avaliados, dos tratamentos com minhocas, em relação ao tratamento controle sem minhocas que, no experimento realizado em vasos as reduções médias percentuais foram muito mais expressivas do que as verificadas no experimento realizado em tubos. Tal resultado pode ser devido ao fato de que a menor área e volume de solo seco dos vasos em relação aos tubos, em 16,56% e 84,55%, respectivamente, tenha possibilitado nestes um maior contato das minhocas com as raízes das plantas e, assim, um efeito negativo mais evidente de sua atividade nas plantas dos vasos do que nas dos tubos. Nos tubos a maior área e volume de solo garantiram um maior espaço físico para as minhocas sem que estas necessariamente entrassem tão intimamente em contato com as raízes das plantas.

Embora no experimento em tubos, em função apenas do efeito das minhocas, não tenham sido detectadas diferenças significativas no número de nódulos, conforme se observa na tabela 4, na última linha deste parâmetro, a média do tratamento controle (nível 0M) sem minhocas, superou a dos tratamentos com minhocas enquanto que, no experimento desenvolvido em vasos, conforme se observa na tabela 3, na última linha deste parâmetro, a média do tratamento controle (nível 0M) sem minhocas, não só superou a dos tratamentos com minhocas como, também, a diferença entre as mesmas foi altamente significativa.

O decréscimo no número de nódulos foi, em geral, considerando a média dos tratamentos inoculados com as diferentes densidades de minhocas (3, 6 ou 9), em relação ao tratamento controle (nível 0M), sem minhocas, conforme se verifica nas tabelas 5 e 6, menor em 64,15% no experimento em vasos e em 13,85% no experimento em tubos. Estes resultados, a princípio, podem indicar que as minhocas contribuíram para uma redução nas populações dos rizóbios capazes de induzir nodulação no feijoeiro, fossem estas estabelecidas ou a introduzida pela

inoculação. As minhocas podem, assim, terem tido um efeito antagônico aos rizóbios, diminuindo sua sobrevivência no solo.

A redução na sobrevivência de bactérias do gênero *Rhizobium* já foi constatada por STEPHENS et al. (1994) quando demonstraram que minhocas da espécie *Aporrectodea trapezoides* embora possam aumentar a colonização de raízes de alfafa por *Rhizobium meliloti* podem, também, reduzir a habilidade dessas bactérias em sobreviver no solo. Segundo esses autores as minhocas podem ter reduzido a sobrevivência de *Rhizobium meliloti* no solo, causando sua morte por ingestão ou produzido condições desfavoráveis para a sobrevivência das bactérias nos excrementos ou paredes de suas galerias.

De forma análoga, ROUELLE (1983), embora tenha constatado maior dispersão de *Bradyrhizobium japonicum* na presença de *Lumbricus terrestris*, observou que na sua ausência os nódulos foram mais numerosos, porém restritos a parte superior do sistema radicular.

Além da redução no número de nódulos indicar uma possível redução nas populações de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro, verifica-se que o nível de 3 minhocas já foi suficiente para se constatar tal fato causando, em relação ao tratamento controle, sem minhocas, um pequeno decréscimo no número de nódulos no experimento em tubos (7,18%) e uma acentuada redução no experimento em vasos (61,32%). Também, no experimento desenvolvido por STEPHENS et al. (1994), embora tenham trabalhado com níveis de 1 (157/m²), 3 (471/m²) e 5 (785/m²) minhocas por vaso, verificaram que o nível mais baixo foi suficiente para reduzir em 84% o número de *Rhizobium meliloti* no solo em comparação ao número detectado na ausência das minhocas. Isso indica que somente a presença das minhocas, independente de seu número, é suficiente para comprometer a sobrevivência dos rizóbios no solo podendo, conseqüentemente, reduzir o nível de nodulação.

Em ambos os experimentos não constataram-se diferenças significativas nos parâmetros avaliados entre os níveis com minhocas (3, 6 e 9) e sim, para todos os parâmetros avaliados, exceto os referentes aos nódulos (número e matéria seca) no experimento em tubos, entre estes níveis e o tratamento controle sem minhocas sendo, as melhores médias, obtidas na ausência destes animais.

Uma possível explicação para os tratamentos sem minhocas terem superado os tratamentos com sua presença, na maioria dos parâmetros avaliados, em ambos os experimentos, é o fato destas, através dos processos de digestão (atividade enzimática, reações bioquímicas, etc), excreção (coprólitos, urina, secreções, etc), eliminação do líquido celomático que, segundo RIGHI (1966) e MEINICKE (1983), pode ter efeito desinfestante, combatendo bactérias e outros parasitas que se depositam sobre a superfície do corpo das minhocas, da atividade escavadora de galerias, etc, poderem ter afetado a dinâmica das populações microbianas do solo, principalmente a nível rizosférico, seja prejudicando a sobrevivência de espécies microbianas benéficas ao crescimento e produção das plantas como rizóbios, fungos micorrízicos ou rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, seja favorecendo a sobrevivência de espécies microbianas capazes de limitar o crescimento e produção das plantas como, por exemplo, patógenos subclínicos.

Além disso, prováveis mudanças nas populações e biomassa microbiana do solo e da rizosfera provocadas pelas minhocas podem ter comprometido processos biológicos do solo como a decomposição da matéria orgânica e a fixação biológica e mineralização do nitrogênio interferindo, assim, nas características de crescimento e produção das plantas como, também, de fatores associados como nodulação, acúmulo de nitrogênio, etc.

As reduções constatadas em todos os parâmetros avaliados, em ambos os experimentos, pela presença das minhocas, em relação a sua ausência, podem ser devidas, também, a sua atividade ter ocasionado uma diminuição no solo do nitrogênio disponível às plantas. Tal fato já foi constatado por DEVLIEGHER &

VERSTRAETE (1997) quando observaram que minhocas da espécie *Lumbricus terrestris* causaram redução não só na concentração de nitrato no solo mas, também, no processo de nitrificação, na biomassa e atividade microbiana e na produção de matéria seca e conteúdo de nitrogênio de plantas de espinafre. Segundo os autores, a redução no crescimento das plantas foi causada pela diminuição da disponibilidade de nitrogênio no solo pela atividade das minhocas uma vez que, durante o trânsito de solo e matéria orgânica no seu intestino este material sofre ação de enzimas, reações bioquímicas, etc, que, no caso, provocaram os efeitos redutores observados.

Efeitos contrários na dinâmica no nitrogênio são sugeridos por PASHANASI et al. (1992) pois, segundo os mesmos, a inoculação de minhocas geralmente resulta em aumento não só da disponibilidade de nitrogênio mineral como, também, da biomassa microbiana. Entretanto, WOLTERS & JOERGENSEN (1992) ao manterem minhocas da espécie *Aporrectodea caliginosa* em seis diferentes tipos de solo por 21 dias observaram que a biomassa microbiana, comparada ao tratamento controle sem minhocas, foi menor em cinco dos seis solos.

Segundo SIQUEIRA (1994) o feijoeiro é considerada uma planta dependente do estabelecimento de associações micorrízicas para seu crescimento e produção. Desta forma, prováveis mudanças provocadas pelas minhocas na dinâmica da população microbiana do solo, podem vir a ter causado uma redução na colonização radicular por fungos micorrízicos tal como ocorreu com PATTINSON et al. (1997) quando, na presença de *Aporrectodea trapezoides* em trevo subterrâneo, obtiveram um significativo decréscimo na colonização das raízes pelo fungo micorrízico vesículo-arbuscular *Glomus intraradices*. Além disso a porcentagem de colonização micorrízica nas raízes, decresceu na medida que a densidade de minhocas aumentou. Segundo os autores os resultados indicam que as minhocas podem reduzir a infectividade do solo com respeito à colonização das raízes por fungos micorrízicos vesículo-arbusculares.

No experimento desenvolvido em tubos, onde foram testadas duas formas de apresentação do inoculante, não foram constatadas diferenças significativas nos resultados dos parâmetros avaliados entre as formulações de inoculante pó (em turfa) e líquido (fluído), conforme se verifica na tabela 4.

As tabelas 7 para vasos e 8 para tubos mostram que a inoculação com *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 via inoculante pó ou líquido no experimento desenvolvido em tubos ou apenas inoculante pó no experimento desenvolvido em vasos, resultou, em relação ao tratamento controle, não inoculado (nível NI), em reduções em todos os parâmetros avaliados, em ambos os experimentos, exceto na matéria seca da raiz, no experimento em vasos. Entretanto a redução foi significativa apenas na matéria seca de raiz, no experimento desenvolvido em tubos.

Observa-se ainda nas tabelas 7 e 8 que as maiores reduções, em ambos os experimentos foram nos parâmetros referentes aos nódulos (número e matéria seca) que, constituem-se em parâmetros diretamente relacionados à eficiência na fixação do nitrogênio e a capacidade competitiva por sítios de infecção nodular dos rizóbios estabelecidos ou introduzidos. Assim, as elevadas populações de rizóbios estabelecidas no solo, estimadas em $1,7 \times 10^4$ células/g de solo, podem ter interagido com os rizóbios introduzidos, causando uma menor colonização radicular por parte destes últimos. Além disso, os rizóbios inoculados, como não estão adaptados às condições do solo onde foram introduzidos, podem ter tido sua sobrevivência comprometida pela presença de microrganismos que lhe são antagônicos. Provavelmente os rizóbios estabelecidos sofram menor efeito antagônico pelo fato de já estarem plenamente adaptados às condições do solo.

A não obtenção de acréscimos nos parâmetros avaliados em função da inoculação das sementes pode, também, estar associada a uma possível ineficiência da combinação simbiótica *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 x variedade de feijoeiro FT Nobre, nas condições edafo-climáticas prevalentes nas unidades experimentais. Desta forma uma condição distinta de solo e ambiente poderia ter possibilitado um melhor desempenho por parte do inoculante.

TABELA 7. VARIAÇÕES PERCENTUAIS NOS PARÂMETROS DO FEIJOEIRO, DEVIDO A INOCULAÇÃO DE *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, VIA INOCULANTE PÓ (TURFA), EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE (NÍVEL NI), NÃO INOCULADO, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM VASOS ⁽¹⁾.

Formulação do Inoculante	Matéria Seca				Número de Nódulos	Nitrogênio Total da Parte Aérea
	Parte Aérea	Raiz	Nódulos	Planta		
%						
Pó (Turfa)	13,49 (-) ⁽²⁾	0,39 (+) ⁽³⁾	38,46 (-)	10,53 (-)	26,77 (-)	9,81 (-)

⁽¹⁾ Variações considerando a média dos tratamentos com e sem minhocas.

⁽²⁾ (-) = Decréscimo.

⁽³⁾ (+) = Acréscimo.

TABELA 8. VARIAÇÕES PERCENTUAIS NOS PARÂMETROS DO FEIJOEIRO, DEVIDO A INOCULAÇÃO DE *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, VIA INOCULANTE PÓ (TURFA) E LÍQUIDO (FLUIDO), EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO CONTROLE (NÍVEL NI), NÃO INOCULADO, NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM TUBOS ⁽¹⁾.

Formulação do Inoculante	Matéria Seca				Número de Nódulos	Nitrogênio Total da Parte Aérea
	Parte Aérea	Raiz	Nódulos	Planta		
%						
Pó (Turfa)	10,00 (-) ⁽²⁾	17,17 (-)	30,93 (-)	11,04 (-)	24,88 (-)	8,61 (-)
Líquido (Fluido)	8,60 (-)	16,04 (-)	41,24 (-)	9,74 (-)	24,40 (-)	7,79 (-)
Variação Média	9,30 (-)	16,60 (-)	36,08 (-)	10,39 (-)	24,64 (-)	8,20 (-)

⁽¹⁾ Variações considerando a média dos tratamentos com e sem minhocas.

⁽²⁾ (-) Decréscimo.

VILA et al. (1996) também observaram que a inoculação do feijoeiro com três estirpes de *Rhizobium tropici* não promoveu acréscimos no número de nódulos e na matéria seca dos nódulos e da planta sendo, inclusive, as médias dos tratamentos inoculados inferiores, embora não significativamente, ao tratamento controle. Segundo esses autores, a inoculação com as estirpes de *Rhizobium tropici* não foi capaz de maximizar a fixação biológica no feijão provavelmente devido à baixa competitividade por sítios de infecção nodular com estirpes estabelecidas ineficientes. Resultados semelhantes foram obtidos por FERRAZ et al. (1997) que verificaram serem ineficientes as simbioses do feijoeiro das variedades Gordo e ESAL-508 com as estirpes *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4064.

De um modo geral, os experimentos citados em literatura sobre efeitos de diferentes espécies de minhocas em diferentes espécies de plantas, não apresentaram resultados conclusivos em relação aos mecanismos que conduziram a efeitos positivos ou negativos no crescimento e produção das plantas.

Entretanto, embora os mecanismos responsáveis por aumentos ou reduções no crescimento e produção das plantas, devido à presença de minhocas ainda não estejam definitivamente esclarecidos, sabe-se que existe grande variabilidade no comportamento dos resultados entre diferentes espécies de minhocas e de plantas, sendo que a presença e atividade de uma determinada espécie de minhoca pode ser positiva em uma determinada espécie vegetal e, em outra, ser negativa ou não ter efeito algum no seu crescimento e produção. Da mesma forma uma determinada espécie vegetal pode reagir favoravelmente a uma determinada espécie de minhoca e a outra ter uma resposta insignificante ou até mesmo negativa causando redução no seu crescimento e produção. Essas variações devem-se, provavelmente, a diferenças nos aspectos fisiológicos tanto entre espécies de minhocas quanto de plantas.

Respostas diferenciadas entre espécies vegetais distintas em função da mesma espécie de minhoca são relatadas por PASHANASI et al. (1992) para *Pontoscolex corethurus* e por MEINICKE (1983) para *Allolobophora caliginosa*. Ao contrário respostas diferenciadas na mesma espécie vegetal em função de espécies distintas de minhoca (*Aporrectodea rosea* e *Aporrectodea trapezoides*), porém pertencentes ao mesmo gênero, são relatadas por DOUBE et al. (1997) e BAKER et al. (1997).

Se já há grande dificuldade em se dimensionar o efeito isolado das minhocas no crescimento e produção das plantas maior dificuldade ainda há de se precisar seu efeito associado a uma determinada espécie microbiana. De um modo geral as interações entre as minhocas e os rizóbios podem provocar reações variáveis no crescimento e produção das plantas, dependendo estas não só das espécies envolvidas e condições ambientais e edáficas a que estão submetidos esses organismos mas, também, de uma série de fatores físicos, químicos e biológicos que interagem entre si definindo o comportamento da planta.

Os resultados dos experimentos realizados com o feijoeiro comprovam que o efeito das minhocas, seja isolado ou combinado aos rizóbios introduzidos pela inoculação das sementes, nem sempre é positivo. Todavia há de se considerar que a atividade das minhocas nos tubos e vasos utilizados pode ser bem diferente da que ocorre em campo, sob influência das condições naturais uma vez que, nas unidades experimentais, as minhocas estavam confinadas a uma determinada área e volume de solo em um contato relativamente íntimo com as raízes das plantas o que não ocorre a nível de campo onde, além de estarem sujeitas às condições naturais do ambiente, podem deslocar-se livremente no solo na busca de alimento ou entre suas galerias.

4.3.2 ANÁLISE DOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR

A tabela 9 mostra, para ambos os experimentos que, entre os parâmetros avaliados, foram obtidas correlações significativas a 1% para a maioria das interações entre os mesmos. Entretanto, os maiores valores dos coeficientes de correlação, relacionam-se as seguintes interações: matéria seca da parte aérea e matéria seca da planta, matéria seca da parte aérea e nitrogênio total da parte aérea, matéria seca da raiz e matéria seca da planta, matéria seca dos nódulos e número de nódulos e, finalmente, matéria seca da planta e nitrogênio total da parte aérea. O fato de valores de coeficientes de correlação relativamente baixos terem sido significativos ao nível de confiança de 1% deve-se, provavelmente, ao grande número de pares de pontos de correlação considerados, sendo 48 para os tubos e 32 para os vasos.

Os menores coeficientes de correlação obtidos, em ambos os experimentos, foram devidos a interação entre o nitrogênio total da parte aérea e o número e matéria seca dos nódulos. Tal fato sugere que os parâmetros referentes aos nódulos (número e matéria seca) não constituíram-se em bons indicadores do acúmulo de nitrogênio no tecido vegetal, ou seja, considerando-se todos os tratamentos e suas respectivas repetições, maiores resultados obtidos em termos de número e matéria seca de nódulos não necessariamente conduziram a maiores valores em termos de acúmulo de nitrogênio na parte aérea.

Sabendo-se que os parâmetros referentes aos nódulos (número e matéria seca) dependem quase que exclusivamente das características dos rizóbios, sejam estes estabelecidos ou introduzidos, as interações ocorridas a nível rizosférico, entre essas bactérias e as minhocas ou entre estas e outras populações microbianas, podem ter contribuído para um menor eficiência da simbiose com essa variedade de feijão. Baixas correlações entre matéria seca dos nódulos e nitrogênio total da parte

aérea, em feijão, já foram obtidas também por PEREIRA (1983), GONZÁLEZ (1984) e LOVATO (1984). De acordo com DÖBEREINER et al.³⁷ citados por PEREIRA (1983) a avaliação da eficiência das estirpes em fixar nitrogênio através da matéria seca dos nódulos pode induzir a erros de interpretação. Com relação ao número de nódulos, segundo ARAUJO (1994a), a correlação entre a maior nodulação e o aumento na fixação de nitrogênio pelo feijoeiro não é linear.

Comparando-se os valores de correlação, para uma mesma interação, entre os dois experimentos, verifica-se que os obtidos no experimento em vasos foram sempre maiores que os obtidos no experimento em tubos. Tal fato pode estar associado ao menor número de pontos de correlação considerados no experimento desenvolvido em vasos em relação ao experimento desenvolvido em tubos.

³⁷ DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N.B.; PENTEADO, A.F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 1, p. 233-238, 1966.

TABELA 9. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS NO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM TUBOS (INTERAÇÃO ENTRE 48 PARES DE PONTOS – 12 TRATAMENTOS X 4 REPETIÇÕES) E VASOS (INTERAÇÃO ENTRE 32 PARES DE PONTOS – 8 TRATAMENTOS X 4 REPETIÇÕES).

INTERAÇÃO	Coeficientes de Correlação	
	Tubos	Vasos
matéria seca da parte aérea x matéria seca da raiz	0,7233**	0,7770**
matéria seca da parte aérea x matéria seca dos nódulos	0,3788**	0,4974**
matéria seca da parte aérea x matéria seca da planta	0,9928**	0,9941**
matéria seca da parte aérea x número de nódulos	0,3679*	0,6836**
matéria seca da parte aérea x nitrogênio total da parte aérea	0,8288**	0,8924**
matéria seca da raiz x matéria seca dos nódulos	0,4735**	0,5958**
matéria seca da raiz x matéria seca da planta	0,8006**	0,8403**
matéria seca da raiz x número de nódulos	0,5538**	0,7492**
matéria seca da raiz x nitrogênio total da parte aérea	0,5094**	0,6482**
matéria seca dos nódulos x matéria seca da planta	0,4167**	0,5372**
matéria seca dos nódulos x número de nódulos	0,8450**	0,9053**
matéria seca dos nódulos x nitrogênio total da parte aérea	0,1300 ^{ns}	0,2757 ^{ns}
matéria seca da planta x número de nódulos	0,4196**	0,7217**
matéria seca da planta x nitrogênio total da parte aérea	0,8061**	0,8779**
número de nódulos x nitrogênio total da parte aérea	0,0752 ^{ns}	0,4829**

ns não significativo

* significativo ao nível de confiança de 5%

** significativo ao nível de confiança de 1%

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O pequeno intervalo de tempo decorrido desde a inoculação das minhocas até o corte das plantas em ambos os experimentos, embora nos tubos as minhocas tenham permanecido por um maior período do que nos vasos, provavelmente restringiu a possibilidade de ocorrência de eventuais efeitos favoráveis ao feijoeiro, vinculados a presença e atividade das minhocas, diretamente relacionados a uma suposta melhoria nas propriedades físicas ou químicas do solo. Entretanto, possíveis efeitos favoráveis das minhocas poderiam ocorrer, seja através de efeitos indiretos na condição de fertilidade do solo, derivados de suas complexas interações com as populações microbianas do solo, seja a nível de um provável acréscimo nos parâmetros avaliados, derivado particularmente de sua interação com microrganismos benéficos do solo, principalmente, com o rizóbio inoculado às sementes.

Entretanto, se os prováveis efeitos favoráveis das minhocas não ocorressem, a expectativa seria de que estas não tivessem efeito algum nos parâmetros avaliados, ou seja, de que sua presença provocasse um efeito semelhante a sua ausência. Todavia, além dos esperados efeitos favoráveis das minhocas nos parâmetros avaliados em ambos os experimentos não terem acontecido, os tratamentos controle, definidos pela ausência de minhocas tiveram, de um modo geral, resultados significativamente maiores do que os tratamentos com sua presença nos níveis de 3, 6 ou 9 indivíduos/unidade experimental. Porém, embora as reduções nos parâmetros avaliados evidenciem um efeito negativo das minhocas sobre as plantas, não ficaram claros os mecanismos que conduziram a este resultado.

Desta forma a obtenção de respostas mais conclusivas quanto aos mecanismos que podem levar as minhocas, no seu efeito isolado ou combinado aos rizóbios introduzidos pela inoculação das sementes, a uma influência positiva ou negativa no crescimento e produção das plantas, depende de investigações mais rigorosas e detalhadas, com utilização de técnicas apuradas como, por exemplo, nitrogênio marcado, redução do acetileno para avaliação da atividade da nitrogenase, tipificação sorológica dos nódulos para verificar se a nodulação é

devida as populações de rizóbios estabelecidas ou a introduzida, contagem do rizóbio estabelecido de todas as unidades experimentais no início e término do experimento, análises microbiológicas do trato digestivo das minhocas em termos de identificar as espécies microbianas presentes, bem como analisar o efeito antagônico destas com os rizóbios estabelecidos e introduzidos ou ainda com outros microrganismos benéficos (fungos micorrízicos, rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, etc), a população e biomassa microbiana nos excrementos e galerias das minhocas, identificação das populações de rizóbios estabelecidas, bem como seu grau de eficiência na fixação do nitrogênio e capacidade competitiva por sítios de infecção nodular com os rizóbios introduzidos, as populações microbianas favorecidas e prejudicadas pelo processo de digestão e atividade das minhocas como, também, as mudanças provocadas pelas mesmas na mineralização e fixação do nitrogênio, etc. Além disso é importante a experimentação a campo para se observar o comportamento da interação entre as minhocas, rizóbios e planta quando expostos as condições naturais.

Embora esse trabalho descreva dois experimentos que, realizados em condições distintas de fertilidade do solo, ambiente e unidade experimental, promoveram resultados similares em termos dos efeitos das minhocas e do inoculante nos parâmetros avaliados, é importante para o enriquecimento da pesquisa nessa área de estudo, a repetição de outros experimentos semelhantes ao realizado, variando um ou outro componente do sistema como, por exemplo, a variedade de feijão, a espécie de minhoca ou a estirpe de rizóbio ou ainda a própria espécie leguminosa e o tipo de solo. A simples mudança para uma variedade de feijão de grãos com coloração bege ou amarela, por exemplo, talvez já fosse suficiente para a obtenção de resultados completamente diferentes já que estas, supostamente, poderiam melhor se beneficiar da fixação biológica do nitrogênio pois, segundo ARAUJO et al. (1996), cultivares de grãos de coloração bege ou amarela apresentam maior potencial de nodulação nas raízes secundárias do que os de grãos com coloração preta.

5 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais estabelecidas nesse trabalho foi possível concluir que:

- A presença do Oligochaeta edáfico *Amyntas* spp, considerando os parâmetros avaliados, caracterizou-se em efeitos negativos ao feijoeiro da variedade FT-Nobre.
- A inoculação das sementes com *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 não foi capaz de promover acréscimos nos parâmetros avaliados no feijoeiro da variedade FT-Nobre.
- Os efeitos negativos ao feijoeiro da variedade FT-Nobre derivados da interação entre o Oligochaeta edáfico *Amyntas* spp. e *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 foram devidos quase que exclusivamente às minhocas.
- O decréscimo na nodulação do feijoeiro em função das minhocas indica que as mesmas, embora possivelmente possam promover melhoria na dispersão dos rizóbios, provavelmente podem, também, causar redução nas populações destas bactérias capazes de induzir nodulação na planta.
- As formulações de inoculante pó (em turfa) e líquida (fluída) não apresentaram diferença significativa entre si, influenciando de forma similar nos parâmetros avaliados no feijoeiro da variedade FT-Nobre.

APÊNDICE

APÊNDICE 1. SOLUÇÃO NUTRITIVA (SPECHT et al., 1956)

Solução A: 1 mL por litro da solução final

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 178,2 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 256,5 g
- Água Destilada Esterilizada 1000,0 mL

Solução B: 1 mL por litro da solução final

- K_2HPO_4 164,7 g
- K_2SO_4 82,4 g
- Água Destilada Esterilizada 1000,0 mL

Solução C: 10 mL por litro da solução final

- Na EDTA 3,72 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,78 g
- Água Destilada Esterilizada 1000,0 mL

Obs.: Dissolver Na EDTA + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 900 mL de água destilada esterilizada, aquecendo a 80^o C até dissolução total. Completar volume com água.

Solução D: 3 mL por litro da solução final

- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 63,33 g
- Água Destilada Esterilizada 1000,0 mL

Solução E: 0,5 mL por litro da solução final

- $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7,24 g
- H_3BO_3 5,72 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9,32 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,44 g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
- Água Destilada Esterilizada 1000,0 mL

**APÊNDICE 2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM VASOS.
FATOR INOCULANTE DENTRO DOS NÍVEIS DE MINHOCA.**

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio					
		MSPA ⁽¹⁾	MSR ⁽²⁾	MSN (\sqrt{X}) ⁽³⁾	MSP ⁽⁴⁾	NN (\sqrt{X}) ⁽⁵⁾	NTPA ⁽⁶⁾
Minhoca (M)	3	3,666**	0,10106**	0,00984**	5,058**	74,449**	3096,047**
IdtM _{1(0M)}	1	0,256 ^{ns}	0,00878 ^{ns}	0,00345 ^{ns}	0,375 ^{ns}	25,141 ^{ns}	661,548 ^{ns}
IdtM _{2(3M)}	1	0,101 ^{ns}	0,00092 ^{ns}	0,00017 ^{ns}	0,081 ^{ns}	0,230 ^{ns}	0,039 ^{ns}
IdtM _{3(6M)}	1	0,090 ^{ns}	0,00442 ^{ns}	0,00076 ^{ns}	0,138 ^{ns}	5,151 ^{ns}	0,114 ^{ns}
IdtM _{4(9M)}	1	0,221 ^{ns}	0,01960 ^{ns}	0,00042 ^{ns}	0,112 ^{ns}	0,804 ^{ns}	192,300 ^{ns}
Tratamentos	7	1,667	0,04813	0,00490	2,269	36,382	1448,877
Resíduo	24	0,253	0,01330	0,00126	0,337	9,165	408,921

^{ns} F não significativo
* F significativo a 5%
** F significativo a 1%

**APÊNDICE 3. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM VASOS.
FATOR MINHOCA DENTRO DOS NÍVEIS DE INOCULANTE.**

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio					
		MSPA ⁽¹⁾	MSR ⁽²⁾	MSN (\sqrt{X}) ⁽³⁾	MSP ⁽⁴⁾	NN (\sqrt{X}) ⁽⁵⁾	NTPA ⁽⁶⁾
Inoculante (I)	1	0,636 ^{ns}	0,00003 ^{ns}	0,00219 ^{ns}	0,643 ^{ns}	14,825 ^{ns}	394,569 ^{ns}
MdtI _{1(NI)}	3	1,926**	0,08148**	0,00756**	2,849**	57,249**	2064,960**
MdtI _{2(IP)}	3	1,751**	0,03081 ^{ns}	0,00315 ^{ns}	2,230**	22,701 ^{ns}	1184,231 ^{ns}
Tratamentos	7	1,667	0,04813	0,00490	2,269	36,382	1448,877
Resíduo	24	0,253	0,01330	0,00126	0,337	9,165	408,921

⁽¹⁾ Matéria Seca da Parte Aérea
⁽²⁾ Matéria Seca da Raiz
⁽³⁾ Matéria Seca dos Nódulos (Dados Transformados para \sqrt{X})
⁽⁴⁾ Matéria Seca da Planta
⁽⁵⁾ Número de Nódulos (Dados Transformados para \sqrt{X})
⁽⁶⁾ Nitrogênio Total da Parte Aérea

**APÊNDICE 4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM TUBOS.
FATOR INOCULANTE DENTRO DOS NÍVEIS DE MINHOCA.**

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio					
		MSPA ⁽¹⁾	MSR ⁽²⁾	MSN (\sqrt{X}) ⁽³⁾	MSP ⁽⁴⁾	NN (\sqrt{X}) ⁽⁵⁾	NTPA ⁽⁶⁾
Minhoca (M)	3	6,945*	0,43153**	0,00006 ^{ns}	10,770**	6,225 ^{ns}	14242,924**
IdtM _{1(0M)}	2	11,604**	0,24996*	0,00603 ^{ns}	15,316**	6,932 ^{ns}	20281,697**
IdtM _{2(3M)}	2	0,245 ^{ns}	0,00915 ^{ns}	0,00464 ^{ns}	0,365 ^{ns}	26,308 ^{ns}	668,846 ^{ns}
IdtM _{3(6M)}	2	2,351 ^{ns}	0,01000 ^{ns}	0,00067 ^{ns}	2,595 ^{ns}	4,899 ^{ns}	1620,908 ^{ns}
IdtM _{4(9M)}	2	1,040 ^{ns}	0,21869*	0,00092 ^{ns}	2,201 ^{ns}	18,870 ^{ns}	1143,184 ^{ns}
Tratamentos	11	4,665	0,20638	0,00225	6,660	12,063	8196,185
Resíduo	36	1,595	0,05263	0,00292	1,982	14,663	1888,191

- ^{ns} F não significativo
* F significativo a 5%
** F significativo a 1%

**APÊNDICE 5. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO DESENVOLVIDO EM TUBOS.
FATOR MINHOCA DENTRO DOS NÍVEIS DE INOCULANTE.**

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio					
		MSPA ⁽¹⁾	MSR ⁽²⁾	MSN (\sqrt{X}) ⁽³⁾	MSP ⁽⁴⁾	NN (\sqrt{X}) ⁽⁵⁾	NTPA ⁽⁶⁾
Inoculante (I)	2	3,473 ^{ns}	0,26217*	0,00496 ^{ns}	5,713 ^{ns}	25,245 ^{ns}	3238,380 ^{ns}
MdtI _{1(NI)}	3	12,637**	0,37661**	0,00207 ^{ns}	17,406**	11,120 ^{ns}	22781,339**
MdtI _{2(IP)}	3	0,656 ^{ns}	0,05738 ^{ns}	0,00150 ^{ns}	1,036 ^{ns}	0,305 ^{ns}	4453,799 ^{ns}
MdtI _{3(IL)}	3	1,497 ^{ns}	0,14795 ^{ns}	0,00136 ^{ns}	2,170 ^{ns}	15,975 ^{ns}	658,622 ^{ns}
Tratamentos	11	4,665	0,20638	0,00225	6,660	12,063	8196,185
Resíduo	36	1,595	0,05263	0,00292	1,982	14,663	1888,191

- ⁽¹⁾ Matéria Seca da Parte Aérea
⁽²⁾ Matéria Seca da Raiz
⁽³⁾ Matéria Seca dos Nódulos (Dados Transformados para \sqrt{X})
⁽⁴⁾ Matéria Seca da Planta
⁽⁵⁾ Número de Nódulos (Dados Transformados para \sqrt{X})
⁽⁶⁾ Nitrogênio Total da Parte Aérea

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERINI, J.L.; LOLLATO, M.A.; KRANZ, W.M. Escolha e zoneamento de cultivares. In: IAPAR. **Cultura do feijão no Estado do Paraná**. Londrina: IAPAR, 1980. p. 17-20.
2. ALEXANDER, M. **Introducción a la microbiología del suelo**. México: AGT Editor, 1980.
3. ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculantes por infecção em planta In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: CNPAF/CNPSO-EMBRAPA, 1994. p. 63-94.
4. ANDREOLA, F. Fixação simbiótica de nitrogênio pelo feijoeiro. In: EPAGRI. **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 1992. p. 115-136.
5. ARAUJO, F.F.; MUNHOZ, R.E.V.; HUNGRIA, M. Início da nodulação em sete cultivares de feijoeiro inoculadas com duas estirpes de *Rhizobium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 435-443, 1996.
6. ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (eds). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: CNPAF-CNPSO/EMBRAPA, 1994a. p. 91-120.

7. _____. Quantificação da competitividade nodular de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: CNPAF/CNPSo-EMBRAPA, 1994b. p. 239-248.
8. ARAUJO, R.S.; HENSON, R.A. Fixação biológica de nitrogênio In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (eds). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 213-227.
9. ASSAD, M.L.L. Fauna do solo In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (eds) **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 363-443.
10. BAKER, G.H.; WILLIAMS, P.M.L.; CARTER, P.J.; LONG, N.R.; EDWARDS, C. A. Influence of lumbricid earthworms on yield and quality of wheat and clover in glasshouse trials. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 3-4, p. 599-602, 1997.
11. BALDISSERA, I.T. & SCHERER, E.E. Correção da acidez do solo e adubação da cultura do feijão. In: EPAGRI. **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 1992. p. 115-136.
12. BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo: Roca, 1984.

13. BARRADAS, C.A.; BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Seleção de cultivares e estirpes de *Rhizobium* para nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 13, p. 169-179, 1989.
14. BLAIR, J.M.; PARMELEE, R.W.; LAVELLE, P. Influences of earthworms on biogeochemistry. In: HENDRIX, P.J. (ed). **Earthworm ecology and biogeography in North America**. EUA: Lewis Publishers, 1995, p.127-158.
15. BOHLEN, P.J.; EDWARDS, W.M.; EDWARDS, C.A. Earthworm community structure and diversity in experimental agricultural watersheds in Northeastern Ohio. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, p. 233-239, 1995.
16. BRADY, N.C. **Natureza e propriedades dos solos**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1979.
17. BROWN, G.G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? **Plant and Soil**, Dordrecht, v.170, p. 209-231, 1995.
18. COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: CNPAF/CNPSO-EMBRAPA, 1994. p. 383-418.

19. CONROY, F. Unearthing the potential of worms. **Rural Research**, v. 163, p. 19-23, 1994.
20. DANSO, S.K.; BOWEN, G.D. Methods of inoculation and how they influence nodulation patterns and nitrogen fixation using two contrasting strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 21, p. 1053-1058, 1989.
21. DEBOUCK, D.G.; HIDALGO, R. Morfología de la planta de frijol comum. In: LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHOONHOVEN, A.V. (eds). **Frijol: investigación y producción**. CIAT/PNUD, 1985. p. 7-60.
22. DEVLIEGHER, W.; VERSTRAETE, W. The effect of *Lumbricus terrestris* on soil in relation to plant growth: effects of nutrient-enrichment processes (NEP) and gut-associated processes (GAP). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 341-346, 1997.
23. DÖBEREINER, J. **A biologia do solo na agricultura brasileira**. Brasília: EMBRAPA-UAPNPBS, 1986.
24. DOUBE, B.M.; RYDER, M.H.; DAVOREN, C.W.; STEPHENS, P.M. Enhanced root nodulation of subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in the presence of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Lumbricidae). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 18, p. 169-174, 1994.

25. DOUBE, B.M.; WILLIAMS, P.M.L.; WILLMOTT, P.J. The influence of two species of earthworm (*Aporrectodea trapezoides* and *Aporrectoedeia rosea*) on the growth of wheat, barley and faba beans in three soil types in the greenhouse. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 3-4, p. 503-509, 1997.
26. DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (eds). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 19-65, 1997.
27. EDWARDS, C.A.; BOHLEN, P.J. **Biology and ecology of earthworms**. 3^a ed. London: Chapman & Hall, 1996.
28. EDWARDS, C.A.; BOHLEN, P.J.; LINDEN, D.R.; SUBLER, S. Earthworms in agroecosystems. In: HENDRIX, P.J. (ed). **Earthworm ecology and biogeography in North America**. EUA: Lewis Publishers, 1995. p. 185-213.
29. EDWARDS, C.A.; FLETCHER, K.E. Interactions between earthworms and microorganisms in organic matter breakdown. In: EDWARDS, C.A.; STINNER, B.R.; RABATIN, S. (eds). **Biological interactions in soil**. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 235-247.

30. FERNÁNDEZ, F.; GEPTS, P.; LÓPEZ, M. Etapas de desarrollo en la planta de frijol. In: LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHOONHOVEN, A.V. (eds). **Frijol: investigación y producción**. CIAT/PNUD, 1985. p. 61-71.
31. FERRAZ, E.B.; MARTÍNEZ, C.R.; FIGUEIREDO, M.V.B.; SILVA, M.L.R.B.; SILVA, O.R. Especificidade hospedeira do feijoeiro na fixação simbiótica do N₂. In: **XXVI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**. Anais, Rio de Janeiro, 1997.
32. FRANCO, A. A. & NEVES, M. C. P. Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p. 219-242.
33. FRANCO, A. A. Nutrição nitrogenada na cultura do feijoeiro. **Informações Agronômicas**, p. 4-5, 1995.
34. FREIRE, J. **Microbiologia do solo**. Porto Alegre: UFRGS, 1975.
35. FREIRE, J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p. 121-140.
36. FREITAS, S.S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: CNPAF/CNPSo-EMBRAPA, 1994. p. 369-376.

37. GONZÁLEZ, G.T. Efeito do uso de inóculos múltiplos de *Rhizobium phaseoli* sobre a fixação de nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 1984.
38. HARDARSON, G.; GOLBS, M.; DANSO, S.K. Nitrogen fixation in soybean (*Glicine max* L. Merrill) as affected by nodulation patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 21, p. 783-787, 1989.
39. HEIJNEN, C.E.; MARINISSEN, J.C.Y. Survival of bacteria introduced into soil by means of transport by *Lumbricus rubellus*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 20, p. 63-69, 1995.
40. HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: CNPAF/CNPSO-EMBRAPA, 1994a. p. 45-61.
41. _____. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (eds) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: CNPAF/CNPSO-EMBRAPA, 1994b. p. 249-283.

42. HUNGRIA, M ARAUJO, R.S. Relato da VI RELARE In: Microbiologia do Solo: Desafios para o Século XXI: Anais do III Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo e VI Reunião de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, Londrina: IAPAR/EMBRAPA/CNPSO, 1995. p. 476-488.
43. HUNGRIA, M.; NEVES, M.C. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 9-24, 1986.
44. HUNGRIA, M.; RUSCHEL, A.P. Atividade da nitrogenase e evolução do hidrogênio pelos nódulos de *Phaseolus vulgaris*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 11, p. 269-274, 1987.
45. HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (eds). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 189-294.
46. HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.A.R; PERES, J.R.R.; MENDES, I.C. Identificação de parâmetros relacionados com a eficiência e capacidade competitiva do rizóbio In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: CNPAF/CNPSO-EMBRAPA, 1994a. p. 285-325.

47. HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (eds). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: CNPAF-CNPSo/EMBRAPA, 1994b, p. 9-89.
48. IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**, v. 57, Rio de Janeiro, 1997.
49. JORGE, J.A. **Solo: manejo e adubação**. 2ª ed. São Paulo: Nobel, 1988.
50. JUÁREZ, J.R. **Isolamento e caracterização de variantes de *Rhizobium phaseoli***. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 1984.
51. KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo: Ceres, 1985.
52. KÜKENTHAL, W.; MATTHES, E.; RENNER, M. **Guia de Trabalhos práticos de zoologia**. 19ª ed. Coimbra: Livraria Almedina, 1986.
53. LEE, K.E. **Earthworms: Their ecology and relationships with soils and land use**. New York: Academic Press, 1985.
54. LONGO, A.D. **Minhoca: de fertilizadora do solo a fonte alimentar**. São Paulo: Ícone, 1987.
55. LOPES, A.S. **Manual de fertilidade do solo**. São Paulo: ANDA/POTAFOS, 1989.

56. LOVATO, P. E. **Sobrevivência e competição de estirpes de *Rhizobium phaseoli* em solo e na rizosfera de feijão**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 1984.
57. LOVATO, P.E.; PEREIRA, J.C.; VIDOR, C. Flutuação populacional de *Rhizobium phaseoli* em solos com e sem calagem. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 9, p. 9-12, 1985.
58. MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980.
59. MALAVOLTA, E. Nutri-Fatos. **Arquivo do Agrônomo**, n. 10, Piracicaba: POTAFOS, 1996.
60. MARIOT, E.J. Ecofisiologia do feijoeiro. In: IAPAR. **O feijão no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1989. p. 25-41.
61. MEINICKE, A.C. **As minhocas**. Ponta Grossa: Coopersul, 1983.
62. MELLO, F.A.F.; SOBRINHO, M.O.C.B.; ARZOLLA, S.; SILVEIRA, R.I.; NETTO, A.C.; KIEHL, J.C. **Fertilidade do solo**. 3ª ed. São Paulo: Nobel, 1989.
63. MINNICH, J. **The earthworm book: How to raise and use earthworms for your farm and garden**. EUA: Rodale Press, 1977.

64. MIRANDA, J.C.C.; MIRANDA, L.N. Micorriza arbuscular. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (eds) **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 69-123.
65. MORAES, J.F.V. Calagem e adubação. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (eds). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 261-301.
66. NEVES, M.C.P.; RUMJANECK, N. G. Bioquímica e fisiologia da fixação de nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p. 141-155.
67. OLIVEIRA, I.P.; THUNG, M.D.T. Nutrição mineral In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (eds). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 175-212.
68. OLIVEIRA, L. A. **Eficiência, capacidade competitiva e sobrevivência de estirpes de *Rhizobium japonicum***. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 1982.
69. OLMOS, I.L.J.; CARDOSO, A.; CARVALHO, A.P.; HOCHMÜLER, D.P.; FASOLO, P.J.; RAÜEN, M.J. Levantamento de reconhecimento dos solos do Estado do Paraná. Londrina: EMBRAPA/SNLCS/SUDESUL/IAPAR, 1984.

70. PARRA, M.S. Nutrição e adubação. In: IAPAR. **O feijão no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1989. p. 79-100.
71. PASHANASI, B.; MELENDEZ, G.; SZOTT, L.; LAVELLE, P. Effect of inoculation with the endogeic earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae) on N availability, soil microbial biomass and the growth of three tropical fruit tree seedlings in a pot experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1655-1659, 1992.
72. PATTINSON, G.S.; SMITH, S.E.; DOUBE, B.M. Earthworm *Aporrectodea trapezoides* had no effect on the dispersal of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus intraradices*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 7, p 1079-1088, 1997.
73. PEREIRA, D. **Ação das minhocas no solo**. São Paulo: Nobel, 1988.
74. PEREIRA, J.C. **Obtenção e avaliação de mutantes espontâneos de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos e fungicidas**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 1983.
75. PEREIRA, P.A.A.; ARAUJO, R.S.; ROCHA, R.E.M.; STEINMETZ, S. Capacidade de genótipos de feijoeiro de fixar N₂ atmosférico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 7, p. 811-815, 1984.

76. PORTES, T.A. Ecofisiologia. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (eds). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 125-156.
77. RAIJ, B.V. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: POTAFOS/Ceres, 1991.
78. RIGHI, G. **Invertebrados: A minhoca**. Coleção Cientistas de Amanhã. São Paulo: Instituto Brasileiro de Educação Ciência e Cultura, 1966.
79. RIGHI, G. **Minhocas da América Latina: diversidade, função e valor**. São Paulo: Departamento de Zoologia. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 1997.
80. ROSOLEN, C.A.; MARUBAYASHI, O.M. Seja o doutor do seu feijoeiro. **Arquivo do Agrônomo**, n. 7, Piracicaba: POTAFOS, 1994.
81. ROUELLE, J. Introduction of amoebae and *Rhizobium japonicum* into the gut of *Eisenia fetida* (Sav.) and *Lumbricus terrestris* L. In: SATCHELL, J.R. (ed) **Earthworm ecology: from Darwin to vermiculture**. London: Chapman & Hall, 1983. p. 351- 364.
82. SAITO, S.M.T. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 17, n. 7, p. 999-1006, 1982.

83. SATCHELL, J.E. Earthworm microbiology. In: SATCHELL, J.R. (ed.) **Earthworm ecology: from Darwin to vermiculture**. London: Chapman & Hall, 1983. p. 351- 364.
84. SATCHELL, J.E. Lumbrídeos. In: BURGESS, A.; RAW, F. (eds) **Biología del suelo**. Barcelona: Omega, 1971. p. 307-378.
85. SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p. 257-282.
86. SIQUEIRA, J.O. **Biología do solo**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1993.
87. SIQUEIRA, J.O. Micorrizas arbusculares. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (eds). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: CNPAF-CNPSO/EMBRAPA, 1994. p. 151-194.
88. SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 1988.
89. SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília: CNPAF-CNPSO/EMBRAPA, 1994.

90. SKOT, L.; ARAUJO, R.S. Introdução de genes de *Rhizobium* In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: CNPAF/CNPSO-EMBRAPA, 1994. p. 201-226
91. SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Methods in legume-Rhizobium technology**. Hawaii: Niftal, 1985.
92. STEPHENS, P.M.; DAVOREN, C.W.; RYDER, M.H.; DOUBE, B.M. Influence of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Lumbricidae) on the colonization of alfafa (*Medicago sativa* L.) roots by *Rhizobium meliloti* L5-30R and the survival of *R. meliloti* L5-30R in soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.18, p. 63-70, 1994.
93. STONE, L.F.; SARTORATO, A. **O cultivo do feijão: recomendações técnicas**. Brasília: CNPAF/EMBRAPA, 1994.
94. STORER, T.I. ; USINGER, R.L.; **Zoologia geral**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1974.
95. TOMLIN, A.D.; SHIPITALO, M.J.; EDWARDS, W.M.; PROTZ, R. Earthworms and their influence on soil structure and infiltration. In: HENDRIX, P.J. (ed). **Earthworm ecology and biogeography in North America**. EUA: Lewis Publishers, 1995. p.159-183.

96. URENHA, L.C.; PRADELLA, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; BONOMI, A. Produção de biomassa celular de rizóbio In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: CNPAF/CNPSo-EMBRAPA, 1994. p. 95-137.
97. VARGAS, A.A.T.; SILVEIRA, J.S.M.; ATHAYDE, J.T.; ATHAYDE, A.; PACOVA, B.E.V. Comparação entre genótipos de feijão quanto à capacidade nodulante e à produtividade com inoculação com rizóbios e/ou adubação de N-Mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 15, p. 267-272, 1991.
98. VASCONCELOS, J.I.; ALMEIDA, R.T. **Microbiologia do solo**. Apostila. Fortaleza: Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Fitotecnia. Universidade Federal do Ceará, 1978.
99. VIDOR, C.; KOLLING, J.; FREIRE, J.; SCHOLLES, D.; BROSE, E.; PEDROSO, M.H.T. **Fixação biológica do nitrogênio pela simbiose entre *Rhizobium* e leguminosas**. Porto Alegre: IPAGRO, 1983.
100. VIEIRA, C. **Cultura do feijão**. 2ª ed. Viçosa: UFV, 1983.
101. VIEIRA, J.C.; HEMP, S. Taxonomia e morfologia do feijoeiro In: EPAGRI. **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 1992. p. 37-51.

102. VIEIRA, M.I. **Criação de minhocas**. São Paulo: Nobel, 1986.
103. VIEIRA, S.M. Efeitos isolados ou associados de nitrogênio, molibdênio e inoculante sobre o rendimento e seus componentes de duas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Dissertação de Mestrado. Curitiba: UFPR, 1995.
104. VILA, E.P.; MIGUEL, D.L.; PEDROSO, F.L.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Inoculação de rizóbio e aplicação foliar de Mo em *Phaseolus vulgaris* L. no sul de Minas Gerais. In: **Solo Suelo – XIII Congresso Latino Americano de Ciência do Solo**. Anais, São Paulo, 1996.
105. VILHORDO, B.W.; BURIN, M.E. GANDOLFI, V.H. Morfologia. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (eds). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 87-123.
106. VILLEE, C.A.; WALKER JR, W.F.; BARNES, R.D. **Zoologia geral**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985.
107. VOSS, M. Fixação biológica de nitrogênio. In: IAPAR. **O feijão no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1989. p. 101-114.

108. WOLTERS, V.; JOERGENSEN, R.G. Microbial carbon turnover in beech forest soil worked by *Aporrectodea caliginosa* (Savigny) (Oligochaeta: Lumbricidae). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 171-177, 1992.
109. WOLYN, D.J.; ATTEWELL, J.; LUDDEN, D.W.; BLISS, F.A. Indirect measures of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field conditions: the role of lateral root nodules. **Plant Soil**, v. 113, p. 181-187, 1989.
110. ZIMMERMAN, M.J.O.; TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (eds). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 79-85.