

INTERAÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS DO SOLO, FEIJOEIRO E MILHO EM MONOCULTURA OU CONSÓRCIO¹

MARIANGELA HUNGRIA², DIVA DE S. ANDRADE, ARNALDO COLOZZI-FILHO³
e ÉLCIO LIBORIO BALOTA⁴

RESUMO - Os sistemas de cultivo afetam a microbiota do solo e, neste estudo, procurou-se investigar algumas interações entre microrganismos de importância agrícola e o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e milho (*Zea mays*) em monocultura ou consórcio. Em condições controladas, tanto os exsudatos de feijão como os de milho estimularam a sobrevivência, o crescimento e a indução do genes *nod* de *Rhizobium*, a nodulação e o acúmulo de N no feijoeiro e a sobrevivência de *Azospirillum lipoferum*. Em um solo cultivado por dois anos com feijoeiro e milho em monocultura e consórcio, a população de *Azospirillum* spp. foi elevada e não diferiu entre os tratamentos, enquanto a população de *Rhizobium tropici*, os oxidantes do nitrito e a biomassa microbiana foram favorecidas pela presença do feijoeiro em consórcio ou monocultura. A espécie *Rhizobium elii* representou cerca de 15% da população rizobiana, exceto na monocultura de milho, em que esteve ausente e na qual predominou *Rhizobium* spp., capaz de nodular somente leucaena (*Leucaena leucocephala*). Extratos de solo sob consórcio apresentaram teores mais elevados de compostos fenólicos indutores dos genes *nod* de *Rhizobium*. Os tratamentos não afetaram o número de esporos de fungos micorrízico-arbusculares, embora o feijoeiro em monocultura tenha proporcionado maior diversidade de espécies fúngicas.

Termos para indexação: *Azospirillum*, bactérias diazotróficas, biomassa microbiana, fixação biológica do nitrogênio, fungos micorrízicos, microrganismos amonificadores, microrganismos oxidantes do nitrito, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium*, *Zea mays*.

INTERACTIONS AMONG SOIL MICROORGANISMS AND BEAN AND MAIZE GROWN IN MONOCULTURE OR INTERCROPPED

ABSTRACT - Differences in crop systems reflect in soil microorganisms and in this work some interactions among agronomically important microorganisms and common bean (*Phaseolus vulgaris*) and maize (*Zea mays*) grown in monoculture or intercropped were studied. Under controlled conditions, both bean and maize exudates stimulated rhizobial survival, growth, and *nod* gene inducing activity, bean nodulation and N accumulation in tissues, and *Azospirillum lipoferum* survival. After two years with bean and maize in monoculture or intercropped, *Azospirillum* spp. population was high and did not differ between treatments, while *Rhizobium tropici*, nitrite oxidizers and soil biomass were favored by bean plants. *Rhizobium elii* represented, on average, 15% of rhizobial population, except for soils with maize grown alone, where this species was absent, predominating *Rhizobium* spp., which nodulate exclusively leucaena (*Leucaena leucocephala*). Soil extracts from the intercropped system showed higher content of *nod* gene inducing phenolic compounds. Mycorrhizal spore number was not affected by the treatments, although bean in monoculture favored species diversity.

Index terms: amonifiers, *Azospirillum*, biological nitrogen fixation, diazotrophic bacteria, microbial mass, mycorrhizal fungi, nitrifiers, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium*, *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

O consórcio de culturas, como feijoeiro/milho, feijoeiro/cana-de-açúcar, soja/milho, e a rotação de culturas, como soja/trigo, soja/milho e feijoeiro/milho, são utilizadas em larga escala. Os benefícios da associação de culturas compreendem o suprimento energético e de nutrientes balanceado, maximização

¹ Aceito para publicação em 26 de novembro de 1996.

² Eng. Agr., Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. Bolsista do CNPq.

³ Eng. Agr., M.Sc., Instituto Agronômico do Paraná, Caixa Postal 1331, CEP 86001-970 Londrina, PR.

⁴ Biólogo, Ph.D., Instituto Agronômico do Paraná. Bolsista do CNPq.

das fontes protéicas, utilização eficiente da água, controle de ervas daninhas e doenças a um baixo custo, controle da erosão, melhoria da fertilidade do solo e aumento da produtividade (Wahua & Miller, 1978a, 1978b; Saito, 1982; Faris et al., 1983; Siqueira et al., 1994; Hungria et al., 1995).

Como as leguminosas fixadoras de N_2 são, normalmente, componentes dos sistemas de rotação e consórcio, formou-se a crença geral de que os principais benefícios ocorram devido à transferência do N_2 fixado pela leguminosa para a gramínea (Wilson, 1940). De fato, há relatos de transferência de N de leguminosas para não-leguminosas que crescem em consórcio (Ruschel et al., 1979; Giller et al., 1991), que pode ocorrer tanto por excreção de compostos nitrogenados, que são assimilados pela planta não-fixadora (Ruschel et al., 1979), como por decomposição dos nódulos e raízes durante a senescência (Saito, 1982). Entretanto, constata-se, freqüentemente, transferência não-expressiva de N entre as culturas, como no estudo com milho e feijoeiro consorciados, em que Bonetti (1991) observou que a taxa máxima de transferência da leguminosa para a gramínea foi de 4 kg.ha⁻¹ de N.

Ademais, os efeitos da associação de gramíneas na nutrição nitrogenada das leguminosas não são claros e requerem maiores investigações. Há diversos relatos de aumentos na nodulação, na atividade específica dos nódulos e no aumento do N total em leguminosas consorciadas ou cultivadas após gramíneas (Wahua & Miller, 1978a, 1978b; Embrapa, 1984; Crookston et al., 1988, 1991; Bonetti, 1991), cujas bases biológicas, no entanto, não são totalmente compreendidas.

A nutrição nitrogenada das plantas consorciadas pode, ainda, ser afetada pelos processos de mineralização e imobilização, mediados por microrganismos que também podem ser influenciados pelos exsudatos da rizosfera (Nye, 1979; Curl & Trvelove, 1985; Rao, 1990). Conseqüentemente, os fatores responsáveis pelos efeitos da interação entre plantas e microrganismos não estão bem esclarecidos e devem ser investigados, para se poder explorar o potencial agrícola desses sistemas e obter incrementos na produtividade das culturas.

A simbiose entre plantas e fungos micorrízico-arbusculares (FMA) é outro fator que pode afetar o

balanço nutricional da relação entre gramíneas e leguminosas em consórcio (Munns & Mosse, 1980; Barea & Azcon-Aguilar, 1983), o que pode ocorrer, por exemplo, pela transferência de nutrientes de uma planta para outra, através das hifas dos fungos, que permitem a interconexão entre as plantas (Heap & Newman, 1980; Francis et al., 1986).

O feijoeiro é uma cultura de grande importância social no Brasil, sendo, geralmente, cultivado em consórcio com o milho. Na América Latina, 80% da produção de feijão ocorre em plantios consorciados, principalmente com o milho (Francis et al., 1982). Na região de Irati, no Paraná, onde o ensaio foi conduzido, 79% da cultura está sob consórcio, ocupando 70% da área com culturas temporárias e, freqüentemente, a produtividade do feijoeiro consorciado supera a da monocultura. Este trabalho avaliou alguns fatores microbiológicos relacionados com os benefícios proporcionados pelo consórcio feijoeiro/milho, com o objetivo de incrementar a produção desse sistema e reduzir, concomitantemente, a utilização de insumos agrícolas.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos conduzidos em laboratório e casa de vegetação

Efeito da adição dos exsudatos de sementes de milho e feijão na nodulação do feijoeiro

O experimento foi conduzido em vasos de Leonard modificados, contendo areia e vermiculita (1/2, v/v) esterilizadas (Vincent, 1970). Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), cv. Negro Argel, foram desinfetadas com álcool e hipoclorito de sódio a 20%. Foi inoculada a estirpe de *R. tropici* CIAT 899 na proporção de 1 mL de inóculo (10^8 células.mL⁻¹) por semente. Os exsudatos foram obtidos pela incubação das sementes de feijão, cvs. Negro Argel, Carioca, Carioca-80 e Rio Tibagi, e de milho (*Zea mays*), cvs. Centralmex, Sintético APEAX, AG 162 e Agroman 2001, em água deionizada e estéril, sob agitação, para permitir aeração, durante 24 horas. Os exsudatos de cada 15 sementes foram liofilizados, ressuspensos em 10 mL de água estéril e adicionados às sementes na hora da inoculação. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso, com quatro repetições. As plantas foram coletadas aos 30 dias após a emergência (DAE). Foi avaliada a massa de nódulos e da parte aérea seca e o N total da parte aérea.

Efeito da adição de exsudatos de sementes de feijão e milho na indução dos genes da nodulação de *Rhizobium*

Os exsudatos de feijão e milho foram obtidos com quatro repetições, conforme já descrito, durante 24 horas, e foram utilizados para a avaliação sem serem submetidos à liofilização. A indução foi avaliada pela atividade da β -galactosidase, conforme descrito por Hungria et al. (1991a), utilizando-se a estirpe RBL 1283 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, que contém uma fusão *nodA-lacZ* em seu plasmídeo simbiótico.

Efeito da adição de exsudatos de sementes de feijão e milho no crescimento *in vitro* de *Rhizobium*

A estirpe CIAT 899 de *R. tropici* foi transferida de tubos que continham meio com extrato de levedura e manitol (yeast manitol, YM) (Vincent, 1970) para um meio mínimo, com 1g.L⁻¹ de manitol (Hartwig et al., 1991), onde foi mantida antes do início dos experimentos. Os exsudatos de cada dez sementes foram obtidos em água estéril, sob agitação, durante 24 horas, procedendo-se, então, à liofilização e à ressuspensão em 1 mL de água estéril e adição ao meio, após esterilização por filtração em membranas de nitrocelulose (0,22 μ m). Os ensaios foram conduzidos em frascos com 20 mL do meio mínimo, com quatro repetições, conforme descrito por Hartwig et al. (1991). A contagem do número de células viáveis foi realizada pelo método do Número Mais Provável, NMP (Vincent, 1970), após diluição em solução estéril com NaCl a 0,85% e plaqueamento em meio extrato de levedura-manitol-ágar (yeast manitol agar, YMA) com vermelho Congo a 0,05% (Vincent, 1970).

Sobrevivência de *Rhizobium* e *Azospirillum* na rizosfera do feijoeiro e do milho

Foram preparados inóculos de *R. tropici* CIAT 899 e *A. lipoferum* Sp242 na concentração de 10⁸ células.mL⁻¹. Sementes de feijão, das cultivares Negro Argel, Carioca, Carioca-80 e Rio Tibagi, e de milho, das cultivares

Centralmex, Sintético IPEAX, AG162 e Agroman 2001, foram desinfectadas e semeadas em vasos de Leonard modificados, conforme já descrito. No momento do plantio, adicionaram-se 5 mL de inóculo de *Rhizobium* ou *Azospirillum* a cada vaso, cujas plantas foram desbastadas após a emergência, deixando-se duas plantas por vaso. Aos vinte dias após a semeadura, retiraram-se 10 g do substrato dos vasos, procedendo-se, então, à diluição em solução estéril com NaCl, a 0,85%. O número de células de *Rhizobium* foi avaliado pelo método de NMP em plantas, utilizando-se feijoeiro, cv. Negro Argel. O número de células de *Azospirillum* foi avaliado pela inoculação em meio NFb (N free broth), isento de N e semi-sólido (Moreira, 1994), verificando-se o crescimento com a formação da película típica dessa bactéria e constatando-se, em microscópio, características morfológicas típicas da espécie.

Experimento conduzido em campo

O experimento foi conduzido com quatro repetições, em blocos ao acaso, em um Cambissolo na região de Cerro da Ponte Alta, Irati, Paraná. As amostras foram retiradas após dois anos de cultivo com os seguintes tratamentos: 1- milho, com espaçamento de 1,0 m e 5-7 plantas.m⁻¹ linear; 2 - feijoeiro, com espaçamento de 0,5 m, com 15 plantas.m⁻¹ linear; e 3- feijoeiro e milho consorciados, sendo o milho semeado na fase de pré-florescimento do feijoeiro, com arranjo de duas linhas de feijoeiro para uma linha de milho, em linhas espaçadas por 0,5 m e com as mesmas densidades de plantio dos tratamentos 1 e 2. A cultivar de feijoeiro utilizada foi a IAPAR-20 e a de milho, a BR-201. Segundo registros da área, ela nunca foi submetida à inoculação de *Rhizobium*. Um mês após a coleta do milho, retiraram-se amostras de solo, da profundidade de 0 cm a 15 cm, dos diversos tratamentos, passando-se as amostras do solo por peneira de 4 mm. Para a análise química (Tabela 1), realizada segundo Pavan et al. (1992), as amostras de solo foram combinadas. As análises microbiológicas foram realizadas em amostras de cada parcela, avaliando-se os seguintes parâmetros relacionados com a atividade microbiológica:

TABELA 1. Composição química do solo antes do plantio do experimento.

Profundidade (cm)	P (mg/dm ³)	C (%)	pH CaCl ₂	Al H+Al Ca Mg K S T V AI								
				(cmol _c /dm ³)								—— (%) ——
0-20	6,5	0,78	4,3	1,13	6,50	4,03	1,41	0,27	5,71	12,21	46,76	16,52
20-40	3,4	0,65	4,1	2,43	9,25	3,07	1,26	0,22	4,55	13,80	32,97	34,81

Biomassa microbiana

O N da biomassa microbiana foi extraído com K_2SO_4 0,25 M (Brookes et al., 1985; Vance et al., 1987) de 20 g de solo úmido, fumigado com $CHCl_3$ (Jenkinson & Powlson, 1976). Os extratos foram congelados, para análise posterior do N total por Kjeldahl.

População de amonificadores e oxidantes do nitrito

Diluições do solo em solução salina esterilizada (NaCl a 0,85%) foram inoculadas em meios líquidos específicos e os números de células dos microrganismos amonificadores e das bactérias oxidantes do nitrito foram avaliados segundo Andrade et al. (1994), expressando-se os resultados com base no solo seco. O potencial nitrificante foi determinado em 100 g de solo, suplementado com N na forma de $(NH_4)_2SO_4$, e incubado por 21 dias a 25°C, tendo-se, como controle, o solo sem adição de N. Os teores de nitrato e amônio foram avaliados segundo Andrade et al. (1994).

Teor de compostos fenólicos do solo

Foi obtido segundo modificação do método de Pedersen et al. (1991). Amostras com 100 g de solo e 100 mL de $Ca(OH)_2$ 40,5 mM foram agitadas por 48 horas, seguindo-se um período de 12 horas para sedimentação a 4°C. O sobrenadante foi filtrado e centrifugado a 2.500 rpm por 30 minutos, procedendo-se a diversas filtrações. O teor total de compostos fenólicos foi, então, calculado pelo coeficiente de extinção da genistéina ($\log \epsilon = 4,50$ a 263 nm), após leitura da densidade óptica dos extratos a 263 nm. Os resultados obtidos foram convertidos para massa de solo seco.

Indução dos genes da nodulação de *Rhizobium* pelos extratos de solo

Foi avaliada pela atividade da β -galactosidase, com a bactéria RBL1283. Os extratos de solo foram coletados, medindo-se o volume do sobrenadante e, então, liofilizados, ressuspensos em água deionizada estéril e incubados com a bactéria para o ensaio, que foi realizado conforme já mencionado.

População de *Rhizobium*

Dez gramas do solo foram diluídos em solução com NaCl a 0,85% esterilizada para avaliação do número de células viáveis pelo método do NMP. A população de *R. tropici* foi avaliada por inoculação das diluições do solo em leucena (*Leucaena leucocephala*), seguida pelo isolamento das bactérias de dois nódulos da última diluição de cada

repetição positiva e pela reinoculação desses isolados em feijoeiro. As bactérias capazes de nodular a leucena e o feijoeiro foram classificadas como *R. tropici*, e aquelas que nodularam somente a leucena foram classificadas como *Rhizobium* spp. A população de *R. etli* foi avaliada pela inoculação das diluições do solo em plântulas de feijoeiro, cv. Negro Argel pois, como os conhecimentos atuais indicam que as estirpes que nodulam exclusivamente o feijoeiro, nas Américas do Sul e Central, pertencem à espécie *R. etli* e não à *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (Segovia et al., 1993), considerou-se que as estirpes que nodularam exclusivamente o feijoeiro pertencem à espécie *R. etli*. Os resultados foram corrigidos para a massa em gramas de solo seco.

Isolamento de estirpes eficientes de *Rhizobium*

Cinco vasos de 1,5 L de capacidade foram preenchidos com solo de cada um dos três tratamentos e quatro repetições, no total de 60 vasos. Sementes de feijão, cv. Negro Argel, foram desinfectadas e semeadas deixando-se, após o desbaste, uma planta por vaso. Aos 30 DAE foram escolhidos três nódulos eficientes por planta (pelo diâmetro, de cerca de 2 mm e coloração interna vermelha intensa), procedendo-se ao isolamento das bactérias. Na etapa seguinte, os três isolados foram inoculados, individualmente, em feijoeiro, cv. Negro Argel, em vasos de Leonard modificados, selecionando-se, de cada três vasos, aos 30 DAE, aqueles que proporcionaram maior acúmulo de N total nas plantas. Isolaram-se, então, bactérias de um nódulo eficiente por planta, no total de 20 isolados por sistema de cultivo. Esses isolados foram novamente inoculados na cultivar Negro Argel, em vasos de Leonard modificados, avaliando-se o N total acumulado pelas plantas aos 30 DAE.

População de *Azospirillum* spp.

Utilizaram-se 10 g de solo em diluições sucessivas e a população foi avaliada pelo método do NMP pela inoculação em meio NFb semi-sólido e isento de N (Moreira, 1994).

Número de esporos e classificação das espécies de fungos micorrízico-arbusculares

Os esporos de fungos micorrízico-arbusculares (FMA) foram extraídos do solo por peneiramento úmido e centrifugação em água e sacarose a 45%, sendo contados em microscópio estereoscópico (aumento de 80X). Para a identificação, os FMA foram multiplicados em vasos de cultivo que continham solo do experimento e feijoeiro e milho como hospedeiros e observados em lâminas microscópicas (Colozzi-Filho & Balota, 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados obtidos em laboratório e casa de vegetação

Quando o feijoeiro, cv. Negro Argel, submetido à inoculação da estirpe CIAT 899, recebeu exsudatos de sementes de diversas cultivares de feijoeiro e milho, observou-se incremento na nodulação e no acúmulo de N total na parte aérea, particularmente com os exsudatos das cultivares de feijoeiro Negro Argel e Carioca e das cultivares de milho Centralmex e AG162 (Tabela 2). Esses resultados indicam que tanto nos exsudatos da leguminosa como nos da gramínea estava presente algum fator capaz de incrementar a nodulação do feijoeiro pela estirpe CIAT 899.

Em investigação posterior, procurou-se detectar se esses exsudatos possuíam atividade indutora dos genes da nodulação (genes *nod*, *nol* e *noe*) de *Rhizobium*. Observou-se, então, que os exsudatos

que permitiram maior nodulação também apresentaram maior atividade da β -galactosidase, que avalia, indiretamente, a expressão desses genes (Fig. 1). Sabe-se que os exsudatos de sementes e raízes de leguminosas possuem substâncias indutoras dos genes da nodulação de *Rhizobium* e os indutores do feijoeiro foram identificados como compostos fenólicos, flavonóides, pertencentes às classes das antocianinas, flavonóis, isoflavonóides e flavanonas (Hungria et al., 1991a, 1991b). Há um único relato de exsudatos de gramíneas que ativam os genes da estirpe de *Rhizobium* NGR234, que possui amplo espectro de nodulação (Le Strange et al., 1990). Desse modo, os resultados encontrados neste experimento, em que exsudatos de sementes de algumas cultivares de milho foram capazes de induzir a atividade da β -galactosidase em níveis próximos aos exsudatos de algumas cultivares de feijoeiro indicam que, em consórcio, o milho tam-

TABELA 2. Efeito da adição de exsudatos aquosos estéreis de sementes de feijão e de milho na nodulação e acúmulo de N pelo feijoeiro, cv. Negro Argel, submetido à inoculação da estirpe de *R. tropici* CIAT 899. As plantas foram coletadas aos 30 dias após a emergência. Os valores representam médias de quatro repetições e, quando seguidos pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Treatamento	Massa de nódulos secos (mg planta ⁻¹)	N total da parte aérea (mg N.planta ⁻¹)
Controle	40d	85cd
Exsudato de feijão		
cv. Negro Argel	97a	115ab
cv. Carioca	88ab	132a
cv. Carioca-80	63c	90cd
cv. Rio Tibagi	50cd	88cd
Exsudato de milho		
cv. Centralmex	74bc	104bc
cv. Sintético IPEAX	50cd	80d
cv. AG162	69c	86cd
cv. Agroman 2001	45d	75d
C.V. (%)	8,1	10,2

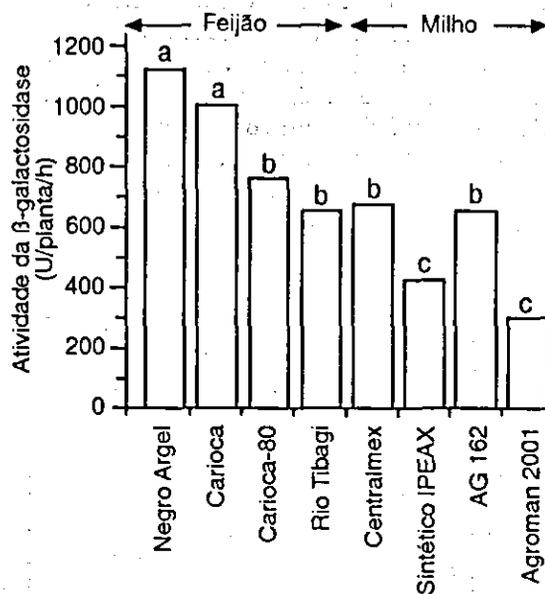


FIG. 1. Indução dos genes da nodulação, avaliada pela atividade da β -galactosidase da estirpe RBL 1283 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (contendo uma fusão plasmídica *nodA-lacZ*) pelos exsudatos aquosos estéreis liberados pelas sementes de cultivares de feijoeiro e de milho durante as primeiras 24 horas de embebição. Médias de quatro repetições. Barras com a mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

bém pode estar contribuindo para a fixação biológica do N_2 , através da exsudação de indutores dos genes da nodulação. Os resultados obtidos neste experimento confirmam, também, observações de que a nodulação do feijoeiro poderia estar limitada pela quantidade de indutores dos genes da nodulação liberados pelas sementes, podendo ser incrementada pela suplementação desses compostos (Hungria & Phillips, 1993).

Estudos com os exsudatos de sementes de feijão e milho indicaram, ainda, que em meio mínimo eles podem incrementar a taxa de crescimento de *Rhizobium*. Na Fig. 2, estão representados os efeitos mais favoráveis ao incremento no número de células, que foram obtidos com as cvs. Negro Argel e Centralmex, respectivamente de feijoeiro e milho. Em um trabalho pioneiro, Hartwig et al. (1991) observaram que os indutores dos genes da nodulação de *Rhizobium meliloti* também eram capazes de incrementar o crescimento dessa bactéria em um meio mínimo. Esse efeito não se relacionou com o suprimento de carbono, uma vez que ocorreu nas primeiras horas de multiplicação, quando ainda havia carbono suficiente para o crescimento das bactérias, o que levou os autores a concluir que o efeito positivo desses compostos no crescimento do *Rhizobium* deveria estar relacionado a outro fa-

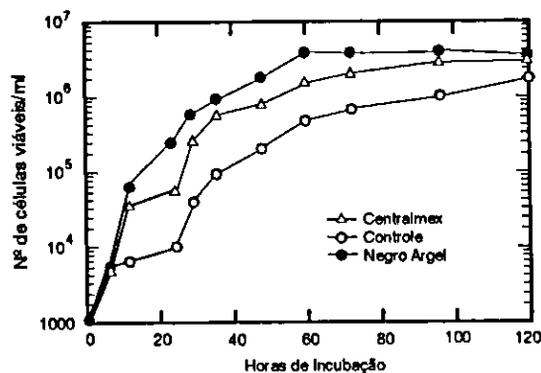


FIG. 2. Crescimento de *R. tropici*, estirpe CIAT 899, em meio mínimo contendo 1 g.L⁻¹ de manitol e suplementado com 1 mL de exsudato de sementes de feijão, cv. Negro Argel, ou de milho, cv. Centralmex. Os pontos representam médias de quatro repetições.

tor ainda não conhecido, talvez um sinal molecular (Hartwig et al., 1991). É importante salientar, ainda, que o solo normalmente representa um meio mínimo, isto é, sem nutrientes em excesso. Com o início da germinação das sementes, esses compostos presentes nos exsudatos seriam liberados para o solo, permitindo o incremento na taxa de crescimento das bactérias e a indução dos genes da nodulação, o que poderia explicar as maiores nodulações encontradas após a adição dos exsudatos (Tabela 2).

A sobrevivência das bactérias na rizosfera das plantas também é um fator de grande importância que deve ser investigado. As cultivares de milho Centralmex e AG162 foram capazes de, durante o período de 20 dias, manter populações de *Rhizobium tropici* em níveis comparáveis aos de Carioca-80 e Rio Tibagi (Tabela 3). Do mesmo modo, as cultivares de feijoeiro Negro Argel e Carioca permitiram a sobrevivência de *Azospirillum lipoferum*, principal bactéria fixadora de N_2 que se associa ao milho (Magalhães et al., 1979), em níveis comparáveis ao do milho. Bactérias do gênero *Azospirillum* têm sido relacionadas a gramíneas, tanto pelo número

TABELA 3. Contagem da população de *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e *Azospirillum lipoferum* estirpe Sp242 na rizosfera de genótipos de feijoeiro e milho aos 20 dias após a inoculação. Os valores representam médias de quatro repetições e, quando seguidos pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), que foi realizado com os dados não transformados.

Tratamento	<i>R. tropici</i> (log n° células.g ⁻¹ substrato)	<i>A. lipoferum</i> (log n° células.g ⁻¹ substrato)
Controle sem planta	3,80e	4,25c
Feijoeiro		
cv. Negro Argel	7,15a	6,83a
cv. Carioca	7,05a	6,88a
cv. Carioca-80	6,45bc	5,82b
cv. Rio Tibagi	6,03bcd	5,50b
Milho		
cv. Centralmex	6,52b	7,33a
cv. Sintético IPEAX	5,97cd	6,98a
cv. AG162	6,38bc	7,21a
cv. Agroman 2001	5,81d	6,97a
C.V. (%)	18,12	23,14

elevado de células na rizosfera dessas plantas, como pela ocorrência nos espaços extra e intercelulares do córtex e intercelulares da endoderme e do xilema (Patriquin et al., 1983). Apesar de tais observações sugerirem uma relação íntima bactéria-plantas, não deve ser descartada a possibilidade de que as plantas que não apresentem essa relação possam também estimular a população de *Azospirillum* spp., através da exsudação de metabólitos, como foi o caso do número de células na rizosfera de milho após a adição de exsudatos de feijão (Tabela 3). Essas observações com *Rhizobium* e *Azospirillum* podem indicar um mecanismo evolutivo, para permitir a sobrevivência das bactérias no solo, na ausência de seu hospedeiro principal.

Resultados obtidos no experimento de campo

O rendimento do feijoeiro foi de 894 kg.ha⁻¹, quando em monocultura, e de 1.133 kg.ha⁻¹ em consórcio, enquanto, para o milho, esses rendimentos foram de 1.758 kg.ha⁻¹ e 1.955 kg.ha⁻¹, respectivamente para a monocultura e o consórcio. Além dessas diferenças no rendimento, constatou-se que, após dois anos de cultivo sem a introdução de qualquer microrganismo, foram encontradas diferenças acentuadas na população microbiana do solo.

O índice de biomassa microbiana foi significativamente maior no solo cultivado com feijoeiro solteiro ou em consórcio com o milho em relação ao milho solteiro (Tabela 4). Os menores valores encontrados com milho solteiro podem estar relacionados com a qualidade do substrato, uma vez que a biomassa microbiana é controlada não só pelo teor

de matéria orgânica acrescentada ao solo, mas também pelo teor de N desses resíduos (Barford & Lajtha, 1992; Wardle & Hungria, 1994).

Embora não tenham sido detectadas diferenças no número de oxidantes do nitrito e de amonificadores entre os sistemas de cultura, o potencial nitrificante foi mais elevado com o feijoeiro em monocultura, o que também deve estar relacionado com a relação C:N desse material. Nos solos com feijoeiro houve maior acúmulo de fenólicos (Fig. 3) e, embora alguns estudos tenham demonstrado que compostos fenólicos e taninos exsudados pelas raízes podem inibir o processo de nitrificação (Rice & Pancholy, 1973), isso foi contestado por outros autores (McCarty & Bremner, 1986), que não observaram inibição do processo de nitrificação, mesmo com quantidades superiores de fenólicos às encontradas no solo.

A ocorrência de *Azospirillum* spp. tem sido normalmente associada a gramíneas (Patriquin et al., 1983), mas sua presença é generalizada, o que fica constatado pela população elevada desse gênero mesmo na presença do feijoeiro em monocultura (Tabela 4).

Observaram-se alterações qualitativas e quantitativas na população de rizóbio nos solos sob diferentes cultivos (Tabela 4 e Fig. 4). O número total de células de *Rhizobium* viáveis no solo foi sempre superior na presença do feijoeiro, não diferindo entre o sistema de monocultura e consórcio (Tabela 4). Em um trabalho conduzido com *R. meliloti* em sistemas de rotação de cultura, também foi observado que a população era influencia-

TABELA 4. Biomassa microbiana total, potencial nitrificante e população de microrganismos oxidantes do nitrito, amonificadores e de *Azospirillum* spp. após o cultivo de milho e feijoeiro em monocultura ou consórcio na região de Irati, PR. Os valores representam médias de quatro parcelas e, quando seguidos pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P 0,05).

Sistema de cultivo	Teor de N da biomassa — (µg N.g ⁻¹ de solo)	Potencial nitrificante	Oxidantes do nitrito	Amonificadores (log n° de células.g ⁻¹ de solo)	<i>Azospirillum</i> spp.	<i>Rhizobium</i> spp.
Milho	29,38b	52,21b	3,77a	5,74a	6,50a	2,18b
Feijoeiro	41,65a	70,42a	3,27a	5,94a	6,30a	2,70a
Milho/feijoeiro	45,07a	56,19b	3,41a	6,02a	6,45a	2,69a
CV (%)	19,01	8,86	20,62	6,74	5,51	5,80

da pela presença da leguminosa (Triplett et al., 1993). Intrigantes, porém, foram as diferenças encontradas, entre os sistemas de cultivo, nas espécies de *Rhizobium* presentes no solo (Fig. 4). No solo sob monocultura de milho, *R. etli*, a espécie caracteriza-

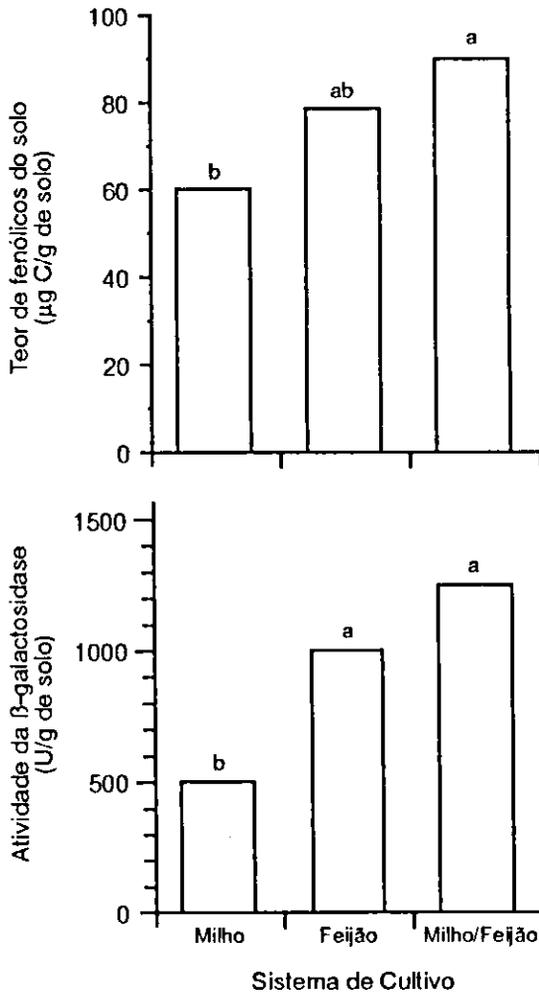


FIG. 3. Teor de compostos fenólicos nos extratos de solos sob cultivo com feijoeiro e milho em monocultura e consórcio e atividade dos extratos de solos na indução dos genes da nodulação de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, RBL 1283, avaliada pelo método indireto de atividade da β -galactosidase. Médias de quatro repetições. Barras com a mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

da por nodular apenas o feijoeiro e que apresenta menor estabilidade genética do que *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991; Segovia et al., 1993) esteve ausente. Nos solos onde o feijoeiro cresceu em monocultura e consórcio, essa mesma espécie de rizóbio representou, em média, 15% da população de *Rhizobium* capaz de nodular o feijoeiro. Nesses solos, houve predominância de *Rhizobium tropici*, capaz de nodular o feijoeiro e a leucena, e mais estável geneticamente (Martínez-Romero et al., 1985, 1991). Pouco se sabe sobre os fatores que determinam a dominância de uma das espécies capazes de nodular o feijoeiro. Há relatos no México (Martínez-Romero et al., 1985) e em Burundi, na África (Amarger et al., 1993), de que *R. etli* representaria quase que a totalidade da população rizobiana que nodula o feijoeiro, enquanto, no Kênia (Giller et al., 1993), há predominância de *R. tropici*. Número elevado de bactérias da espécie

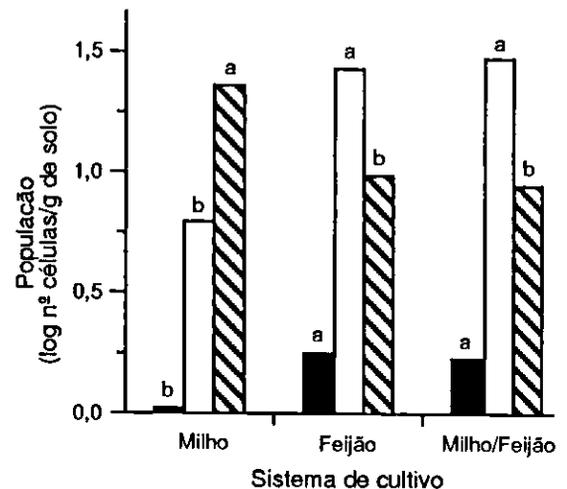


FIG. 4. População de ■ *Rhizobium etli*, □ *Rhizobium tropici* e ▨ *Rhizobium* spp. em solo sob cultivo com feijoeiro e milho em monocultura ou consórcio. O número de células viáveis foi avaliado pelo método do Número Mais Provável (NMP) com contagem em plantas de feijoeiro e leucena. Os valores representam médias de quatro parcelas do campo. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

R. tropici também foi observado em solos dos Cerrados brasileiros (Mercante, 1993). Giller et al. (1993) constataram, ainda, que solos ácidos parecem favorecer a predominância de *R. tropici* o que, devido ao baixo pH do solo onde este experimento foi conduzido, poderia explicar a predominância dessa espécie. Na monocultura de milho, houve um incremento na população de *Rhizobium* spp., isto é, de rizóbio capaz de nodular somente leucena.

Os extratos de solo dos três sistemas de cultura mostram que, na presença do feijoeiro, houve um maior acúmulo de compostos fenólicos no solo (Fig. 3). O maior teor de fenólicos, encontrado no solo sob consórcio, correlacionou com a maior atividade da β -galactosidase (Fig. 3), indicando que esses fenólicos incluíam sinais indutores dos genes da nodulação e não substâncias inibidoras dessa atividade.

Depois de três etapas de seleção das estirpes mais eficientes, que foram isoladas dos três sistemas de cultivo, constatou-se que as bactérias provenientes dos tratamentos com feijoeiro em consórcio ou monocultura foram as mais eficientes, promovendo maior nodulação e acúmulo de N na parte aérea (Tabela 5). Estudos mais detalhados sobre esses isolados estão sendo realizados.

O número de esporos de fungos micorrízico-arbusculares foi superior no tratamento com feijoeiro em monocultura (203 esporos.100 mL⁻¹ de solo) do que com milho solteiro (91 esporos) ou em consórcio (96 esporos), embora o milho seja reconhecido como

excelente hospedeiro para multiplicação de FMA. Os efeitos de exsudatos radiculares sobre os fungos MA só começaram a ser estudados recentemente e Siqueira et al. (1991) relataram que os isoflavonóides formononetina e biocanina, exsudados por raízes de trevo, estimularam o crescimento micelial e a colonização das raízes. Neste trabalho, a presença do feijoeiro em monocultura ou consórcio tendeu a incrementar o teor de fenólicos totais no solo (Fig. 3), o que pode ter conduzido à maior esporulação de fungos. Embora o número de esporos seja importante para determinar o potencial de inóculo do solo, ele não determina a eficiência simbiótica dos fungos MA, pois a capacidade de esporular é própria de cada espécie e pode ser afetada pelas características do solo e pelas culturas. No caso dos sistemas agrícolas em estudo neste experimento, constatou-se que o feijoeiro, particularmente em monocultura, proporcionou também maior número de espécies de FMA (Tabela 6).

Esses resultados indicam que a microflora do solo é bastante afetada pelos sistemas de cultivo. A presença de uma leguminosa, o feijoeiro, estimulou a biomassa microbiana, o potencial nitrificante, a população de rizóbio e de FMA. Em algumas classes de microrganismos, como os rizóbios e os FMA, o feijoeiro também estimulou a diversificação de espécies. Parte desses efeitos pode estar relacionada com a maior exsudação de compostos fenólicos pelas sementes e raízes, resultando em acúmulo na rizosfera. Isto fica evidenciado pelas observações

TABELA 5. Massa e teor de N acumulado na parte aérea de feijoeiro, cultivar Negro Argel, submetido à inoculação dos isolados de rizóbio mais eficientes provenientes das parcelas com milho ou feijoeiro em monocultura ou em consórcio. Médias de 20 repetições coletadas aos 30 dias após a emergência. Valores seguidos pela mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Sistema de cultivo de onde procederam os isolados	Massa da parte aérea seca (g.pl ⁻¹)	Teor de N da parte aérea (%)	N total da parte aérea (mg N.pl ⁻¹)
Milho	2,58b	3,33a	83,80b
Feijoeiro	3,74a	3,36a	127,17a
Milho/feijoeiro	4,44a	2,89b	126,26a
Testemunha ¹	3,82	2,90	110,65
C.V. (%)	18,28	7,84	21,57

¹ Plantas não submetidas à inoculação; receberam adubação com 80 mg.planta⁻¹.semana⁻¹ de N; os valores correspondentes não foram considerados na análise estatística.

TABELA 6. Espécies de fungos micorrízico-arbusculares (FMA) isolados da rizosfera de feijoeiro e milho cultivados em monocultura ou consórcio na região de Irati, PR.

Espécies de FMA	Feijoeiro	Milho	Feijoeiro/milho
<i>Scutellopora heterogama</i> (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders	+ ²	+	+
<i>Scutellopora pellucida</i> (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders	+	+	+
<i>Gigaspora</i> sp. ¹	+	+	+
<i>Glomus</i> sp. ¹	+	- ²	-
<i>Acaulospora scrobiculata</i> (Trappe)	+	-	+

¹ Espécies sem identificação confirmada.

² (+) presença e (-) ausência de FMA.

de que os exsudatos de feijoeiro e de milho incrementaram as taxas de multiplicação de *Rhizobium* e de *Azospirillum*, ativaram a indução dos genes da nodulação de *Rhizobium* e estimularam a nodulação e fixação biológica do nitrogênio no feijoeiro

CONCLUSÕES

1. Exsudatos de sementes de feijão e de milho incrementam as taxas de multiplicação de *Rhizobium* e de *Azospirillum*, a indução dos genes da nodulação de *Rhizobium* e estimulam a nodulação e a fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro.

2. A presença do feijoeiro em monocultura ou em consórcio com o milho incrementa, em relação à monocultura com milho, a biomassa microbiana, o número de células e a biodiversidade de *Rhizobium* e o número de espécies de fungos micorrízico-arbusculares.

AGRADECIMENTOS

Ao Engenheiro Agrônomo Francisco Paulo Chaimson, pelo auxílio no experimento de campo; aos técnicos Maria Aparecida M. Bonfim, Lígia Maria de O. Chueire, Oswaldo Machinesk, Aresmundinei Dias e João Gonçalves e aos auxiliares de laboratório Clarisse de S. Andre e Marcos Paulo da Silva, pelo auxílio na condução dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- AMARGER, N.; MAZURIER, S.I.; GENIAUX, E.; LAGUERRE, G. Indigenous populations of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (Eds.). *New horizons in nitrogen fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1993. p.593.
- ANDRADE, D.S.; MIYAZAWA, M.; HAMAKAWA, P.J. Microrganismos amonificadores e nitrificadores. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.). *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: Embrapa-SPI. 1994. p.355-367.
- BAREA, J.M.; AZCON-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Advances in Agronomy*, New York, v.36, p.1-47. 1983.
- BARFORD, C.; LAJTHA, K. Nitrification and nitrate reductase activity along a secondary successional gradient. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.145, p.1-10. 1992.
- BONETTI, R. *Transferência de nitrogênio do feijão para o milho consorciado: avaliação pelo método de diluição isotópica do ¹⁵N e efeito da associação micorrízica*. Piracicaba: USP-ESALQ, 1991. 63p. Tese de Doutorado.
- BROOKES, P.C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D.S. Chloroform and fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.17, p.837-842, 1985.
- COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.). *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.383-418.
- CROOKSTON, R.K.; KURLE, J.E.; COPELAND, P.J.; FORD, J.H.; LUESCHEN, W.E. Rotational cropping sequence affects yield of corn and soybean. *Crop Science*, Madison, v.83, p.108-113, 1991.
- CROOKSTON, R.K.; KURLE, J.E.; LUESCHEN, W.E. Relative ability of soybean, fallow and triaccontanol to alleviate yield reductions associated with growing corn continuously. *Crop Science*, Madison, v.28, p.145-147, 1988.
- CURL, E.A.; TRVELOVE, B. *The rhizosphere*. Berlin: Springer-Verlag, 1985. 288p.

- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (Goiânia, GO). **Relatório Científico**. Goiânia: 1984. p.311-334.
- FARIS, M.A.; ARAÚJO, M.R.A. de; LIRA, M.D.A.; ARCOVERDE, A.S.S. Yield stability in intercropping studies of sorghum (*Sorghum bicolor*) or maize (*Zea mays*) with cowpea (*Vigna unguiculata*) or common bean (*Phaseolus vulgaris*) under different fertility levels in Northeastern Brazil. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.63, p.789-800, 1983.
- FRANCIS, R.; FINLAY, R.; READ, D.J. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. IV. Transfer of nutrients in inter and intra-specific combinations of host plants. **New Phytologist**, Cambridge, v.103, p.103-111, 1986.
- FRANCIS, C.A.; PRAGER, G.; TEJADA, G. Effects of relative planting dates in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and maize (*Zea mays* L.) intercropping patterns. **Field Crops Research**, Netherlands, v.5, p.45-94, 1982.
- GILLER, K.E.; ANYANGO, B.; BEYNON, J.; WILSON, K. Relative abundance of *Rhizobium tropici* and *Phaseolus* type I rhizobia in Kenyan soils of contrasting pH. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (Eds.). **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1993. p.615.
- GILLER, K.E.; ORMESCHER, J.; AWAH, F.M. Nitrogen transfer from *Phaseolus* bean to intercropped maize measured using ¹⁵N-enrichment and ¹⁵N-isotope dilutions methods. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, p.339-345, 1991.
- HARTWIG, U.A.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, Rockville, v.95, p.797-803, 1991.
- HEAP, A.J.; NEWMAN, E.I. Links between roots by hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, Cambridge, v.85, p.169-171, 1980.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; SANTOS, J.C.F. Ecologia microbiana em solos sob cultivo na Região Sul do Brasil. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. (Eds.). **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/Embrapa-CNPSo, 1995. p.234-270.
- HUNGRIA, M.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.751-758, 1991a.
- HUNGRIA, M.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.759-764, 1991b.
- HUNGRIA, M.; PHILLIPS, D.A. Effects of a seed color mutation on rhizobial *nod*-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.6, p.418-422, 1993.
- JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.8, p.209-213, 1976.
- LE STRANGE, K.K.; BENDER, G.L.; DJORDJEVIC, M.A.; ROLFE, B.G.; REDMOND, J.W. The *Rhizobium* strain NGR234 *nodD1* gene product responds to activation by the simple phenolic compounds vanillin and isovanillin present in wheat seedling extracts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.3, p.214-220, 1990.
- MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.39, p.587-596, 1979.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PARDO, M.A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M.A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, London, v.131, p.1779-1786, 1985.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington DC, v.41, p.417-426, 1991.
- MCCARTY, G.W.; BREMNER, J.M. Effects of compounds on nitrification in soil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.50, p.920-921, 1986.
- MERCANTE, F.M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro**. Itaguaí: UFRRJ, 1993. 149p. Tese de Mestrado.

- MOREIRA, F.M. de S. Métodos de isolamento e identificação de microrganismos associativos fixadores. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.337-353.
- MUNNS, D.N.; MOSSE, B. Mineral nutrition of legume crops. In: SUMMERFIELD, J.; BUNTING, A.H. (Eds.). **Advances in legume sciences**. Kew (UK): Royal Botanic Gardens, 1980. p.115-125.
- NYE, P.H. Soil properties controlling the supply of nutrients to root surface. In: HARLEY, J.R.; RUSSEL, R.S. (Eds.). **The soil-root interface**. London: Academic Press, 1979. p.39-49.
- PATRIQUIN, D.G.; DÓBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.900-915, 1983.
- PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F.; ZEMPULSKI, H.D.; MIYAZAWA, M.; ZOCOLER, D.C. **Manual de análise química do solo e controle de qualidade**. Londrina: IAPAR, 1992. 40p.
- PEDERSEN, C.T.; SAFIR, G.R.; SIQUEIRA, J.O.; PARENT, S. Effect of phenolic compounds on asparagus mycorrhiza. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, p.491-494, 1991.
- RAO, A.S. Root flavonoids. **The Botanical Review**, Bronx, v.56, p.1-84, 1990.
- RICE, E.L.; PANCHOLY, S.K. Inhibition of nitrification by climax ecosystems. II. Additional evidence and possible role of tannins. **American Journal of Botany**, v.60, p.691-702, 1973.
- RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B.; VICTORIA, R.L.; SALATI, E. Comparison of isotope techniques and non-nodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on dinitrogen fixation in soybean, *Glycine max*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.53, p.513-525, 1979.
- SAITO, S.M.T. The nitrogen relationships of maize/bean associations. In: GRAHAM, P.H.; HARRIS, S.C. (Eds.). **Biological nitrogen fixation**. Cali: CIAT, 1982. p.631-639.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington DC, v.43, p.374-377, 1993.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M. de S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.). **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 142p.
- SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R.; NAIR, M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, Cambridge, v.118, p.87-93, 1991.
- TRIPLETT, E.W.; ALBRECHT, K.A.; OPLINGER, E.S. Crop rotation effects on populations of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium meliloti*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, p.781-784, 1993.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.703-707, 1987.
- VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p.
- WAHUA, T.A.T.; MILLER, D.A. Effects of intercropping on soybean N₂-fixation and plant composition on associated sorghum and soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v.70, p.292-295, 1978a.
- WAHUA, T.A.T.; MILLER, D.A. Relative yield totals and yield components of intercropped sorghum and soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v.70, p.287-291, 1978b.
- WARDLE, D.A.; HUNGRIA, M. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.195-216.
- WILSON, P.W. **The biochemistry of symbiotic fixation**. Madison: The Univ. of Wisconsin Press, 1940.