**EFEITO DA INOCULAÇÃO DO FUNGO ENDOMICORRÍZICO
G. leptotrichum NA ABSORÇÃO DE P, FIXAÇÃO DE N₂ E
CRESCIMENTO EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

RUBEM MARCONDES FERREIRA

Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Dra. SIU MUI TSAI SAITO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração em Energia Nuclear na Agricultura.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1987

F383e

Ferreira, Rubem Marcondes, 1956-

Efeito da inoculação do fungo endomicorrízico *G. leptotrichum* na absorção de P, fixação de N₂ e crescimento de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, 1987.
81 p. : il.

Diss. (Mestre) - Cena
Bibliografia

1. Feijão - Adubação. 2. Feijão - Crescimento. 3. Feijão - Micorriza. 4. Feijão - Nutrição. 5. Micorriza - Inoculação. 6. Nitrogênio - Fixação. I. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba. II. Título.

CDD 635.652
CDU 635.652:851.13

EFEITO DA INOCULAÇÃO DO FUNGO ENDOMICORRÍZICO
G. leptotrichum NA ABSORÇÃO DE P, FIXAÇÃO DE
N₂ E CRESCIMENTO EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

RUBEM MARCONDES FERREIRA
ENGENHEIRO AGRÔNOMO

Aprovada em: 10 de Julho de 1987

COMISSÃO JULGADORA:

. Profª Drª Siu Mui Tsai Saito	CENA/USP
Prof. Dr. Tasso Leo Krugner	ESALQ/USP
. Prof. Dr. Takashi Muraoka	CENA/USP
. Prof. Dr. Virgílio Franco do Nascimento Filho	CENA/USP
. Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira	CENA/USP

Profª. Drª Siu Mui Tsai Saito
Orientadora

Dedico a

Suzana por tudo que ela
e e representa para mim,
e a **Aline**, nossa filha.

AGRADEÇO

- . À Dra. Siu Mui Tsai Saito, minha orientadora;
- . Ao CENA, na pessoa do Dr. Frederico Wiendl;
- . Ao Dr. Takashi Muraoka pelas sugestões;
- . Aos amigos Paulo e Lili pelo grande incentivo e ajuda;
- . Aos amigos Marli, Beto, Verinha, Regina, Lígia, Gustavo e Lídice pelo estímulo;
- . Ao Chiquinho pela ajuda na realização das análises químicas;
- . À Beatriz, funcionária da PUBLIQUE, pelo trabalho datilográfico;
- . Aos funcionários da Seção de Microbiologia do Solo, Sr. Mário e Iraci;
- . Aos Professores da ESALQ e do CENA;
- . Ao CNPq e CNEN pela concessão de bolsas de estudo;
- . A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	3
2.1. Fungos micorrízicos	3
2.1.1. Aspectos gerais.	3
2.1.2. Fisiologia dos fungos MVA.	6
2.1.3. Influência de fungos micorrízicos em legu- minosas.	11
2.2. Influência do fósforo na FBN do feijoeiro . . .	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Planta.	18
3.2. Solo.	18
3.3. Marcação do fósforo do solo com P-32.	21
3.4. Vasos	21
3.5. Tratamentos	22
3.6. Delineamento experimental	23
3.7. Plantio	24
3.8. Parâmetros avaliados.	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Produção de matéria seca e acúmulo de fósforo e de nitrogênio	26

4.2. Razão raiz/parte aérea e percentagem de infec-	
ção micorrízica	38
4.3. Fixação biológica de nitrogênio (FBN) . . .	44
4.4. Atividade específica do P-32.	53
4.5. Distribuição do P-32 na planta.	57
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

EFEITO DA INOCULAÇÃO DO FUNGO ENDOMICORRÍZICO
G. leptotichum NA ABSORÇÃO DE P, FIXAÇÃO DE N₂ E CRESCIMENTO
EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Autor: RUBEM MARCONDES FERREIRA

Orientadora: Dr^a SIU MUI TSAI SAITO

RESUMO

Visando avaliar a influência de um fungo micorrízico vesicular-arbuscular (MVA) considerado eficiente no desenvolvimento, na absorção de fósforo e na fixação biológica de nitrogênio atmosférico pelo feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) variedade Carioca, montou-se um experimento em casa de vegetação.

Foi utilizado solo hidromórfico, proveniente de varzea, com alto teor de fósforo (53 ppm) e de nitrogênio mineral (36 ppm). Os tratamentos empregados foram: 1) controle (solo fumigado com brometo de metila); 2) solo natural (com fungos MVA nativos; 3) solo fumigado com brometo de metila inoculado com *Glomus leptotichum*; 4) solo natural inoculado com *G. leptotichum*.

O delineamento experimental usado foi em esquema fatorial 4 x 4 (amostragens x tratamentos), com 6 repetições e inteiramente casualizado.

As amostragens foram realizadas aos 24, 35, 44 e 56 dias após a emergência. Todos os tratamentos foram inoculados com a estirpe C-05II de *Rhizobium phaseoli*. Em todos os tratamentos o fósforo do solo foi marcado com P-32, visando avaliar se a presença de fungo MVA alteraria a atividade específica do P-32 na planta.

Em cada amostragem avaliou-se a atividade de redução de acetileno, o peso da matéria seca, o teor de nitrogênio e fósforo e a atividade do P-32 na parte aérea e nos nódulos. Também procedeu-se à contagem do número de nódulos.

As principais conclusões a que se chegou são que a presença de fungos MVA aumentou a fixação biológica de nitrogênio do feijoeiro devido à maior absorção de fósforo pela planta, possibilitando o aumento do número e da massa de nódulos; o estabelecimento de simbiose eficiente *Rhizobium* x feijoeiro só foi possível devido à presença de fungos MVA; a simbiose tríplice *Rhizobium* x feijoeiro x fungo MVA favoreceu o desenvolvimento da planta; o *G. leptotichum* foi mais eficiente na absorção de fósforo do que os fungos MVA nativos.

EFFECT OF ENDOMYCORRHIZAL FUNGUS *G. leptotichum* INOCULATION
ON THE UPTAKE OF P, N₂-FIXATION, AND GROWTH OF
COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

Author: RUBEM MARCONDES FERREIRA

Adviser: Dr. SIU MUI TSAI SAITO

SUMMARY

A greenhouse experiment was performed to evaluate the influence of an efficient VAM fungus on phosphorus uptake, biological nitrogen fixation, and development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Carioca. The hydromorphic soil used was collected from an ESALQ "varzea", and showed high levels of phosphorus (53 ppm) and mineral nitrogen (36 ppm). Treatments included: 1) control (soil fumigated with methylbromide; 2) natural soil (with native VAM fungi); 3) soil fumigated with methylbromide and inoculated with *Glomus leptotichum*; 4) natural soil inoculated with *G. leptotichum*.

The experimental design used was a 4x4 (samplings x treatments) factorial, with 6 replicates. Samplings were taken at 24, 35, 44, and 56 days after emergence. All treatments were inoculated with *Rhizobium phaseoli*, strain C-05II. Soil phosphorus was labelled with P-32 for all treatments, to

evaluate the P-32 specific activity in the plants.

Acetylene reduction, dry matter weight, nitrogen and phosphorus levels, and P-32 activity in shoots, pods and nodules, were evaluated for each sampling. Number of nodules was also counted.

It was concluded that the presence of MVA fungus increased the biological nitrogen fixation of beans due to the higher phosphorus uptake by plant, this leading to an increase in both number and weight of nodules; the establishment of efficient symbiosis *Rhizobium* x beans was possible only due to the presence of the VAM fungus; the triple symbiosis *Rhizobium* x beans x VAM fungus favoured plant development; *G. leptotichum* was more efficient than the native VAM fungi, in phosphorus uptake.

1. INTRODUÇÃO

Apesar da sua importância social, o feijão mantém a condição de cultura marginal no Brasil, com limitado interesse como atividade empresarial e com baixos investimentos no emprego de tecnologia, mantendo-se como cultura de subsistência (TEIXEIRA, 1987).

Tendo em vista os aspectos sócio-econômicos desta cultura, e tendo já sido amplamente demonstrada a capacidade do feijoeiro em suprir parte das suas necessidades de nitrogênio através da fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (RUSCHEL & RUSCHEL, 1975; SAITO, 1982; RUSCHEL et alii, 1982; FONSECA, 1985), fica clara a importância que adquire a FBN do contexto da produção de feijão.

Dentre os principais problemas nutricionais do feijoeiro, com reflexos na intensidade da FBN, está o baixo nível de fósforo disponível no solo, sendo a deficiência deste nutriente o problema mais comum desta cultura na América Latina (THUNG et alii, 1985). No Brasil, a deficiência de fósforo limita o rendimento da cultura em muitas áreas de cultivo (GUAZELLI, 1983), considerando-se este o principal fator limitante do desenvolvimento de culturas na região do cerrado (LOPES, 1983; MALAVOLTA & KLIEMANN, 1985).

Por se tratar de um nutriente pouco móvel no solo, o principal modo de absorção do fósforo é através

da difusão (MALAVOLTA, 1980). Em se tratando do feijoeiro, os problemas de deficiência deste nutriente se agravam, pois esta planta explora um pequeno volume de solo (INFORZATO, 1963).

As leguminosas associam-se simbioticamente com fungos do solo formadores de micorriza do tipo vesicular-arbuscular. Esses fungos apresentam um crescimento micelial extraradicular, formando uma extensa rede de hifas, conferindo à planta uma capacidade de explorar maior volume de solo (HAYMAN, 1983). O principal benefício da associação micorrízica é o aumento na absorção de nutrientes pela planta, com grande efeito na absorção de fósforo.

Tendo-se levado em consideração a capacidade do feijoeiro em associar-se simbioticamente com *Rhizobium phaseoli* e fungo micorrízico vesicular-arbuscular (MVA), objetivou-se neste trabalho avaliar a influência da introdução do fungo MVA *Glomus leptotichum* considerado eficiente na simbiose triplíce *Rhizobium phaseoli* x *Phaseolus vulgaris* x fungo MVA (SILVEIRA & CARDOSO, 1987b). Além disso, analisou-se os reflexos desta introdução, nas condições específicas deste experimento, no desenvolvimento vegetativo, na produção de vagens e na FBN do feijoeiro.

Através da marcação do fósforo do solo com P-32 e do acompanhamento da sua absorção pela planta, avaliou-se a importância dos fungos MVA, nativos e introduzido, na exploração do fósforo do solo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FUNGOS MICORRÍZICOS

2.1.1. ASPECTOS GERAIS

Vários tipos de associação simbiótica entre fungos e sistema radicular de plantas são agrupados como associações micorrízicas. Estas associações têm vários aspectos em comum: são associações relativamente constantes, isto é, a planta normalmente associa-se ao fungo; não há sintomas aparentes de doença como resultado da infecção, ou seja, são associações altamente especializadas, com baixo grau de patogenicidade (ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985); como resposta a essas associações, invariavelmente a planta apresenta um maior crescimento (SMITH, 1980).

Qualquer tipo de associação micorrízica é principalmente um processo de troca, onde o fungo fornece para a planta nutrientes minerais absorvidos do solo e o hospedeiro carboidratos provenientes da fotossíntese.

As associações micorrízicas foram inicialmente divididas em ectotróficas (geralmente chamadas de ectomicorrizas) e endotróficas, sendo que esta divisão é atribuída a A.B. Frank (BONFANTE-FASOLO, 1984), que em 1885 descreveu

e denominou de micorriza (do grego, mykes = fungo e rhiza = raiz) a associação simbiótica entre fungos do solo e raízes de plantas. Esta divisão tradicional reflete muito mais diferenças morfológicas do que diferenças fisiológicas entre esses grupos (SMITH, 1980).

Atualmente as associações micorrízicas são classificadas em cinco tipos diferentes e refletem a posição do fungo simbiote dentro da raiz (ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985). São eles: ectomicorrizas, endomicorrizas vesicular-arbusculares, ericáceas, arbutáceas e orquidáceas (LEWIS, 1975; BAREA & AZCÓN-AGUILAR, 1983; ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985).

A micorriza vesicular-arbuscular (MVA) é o tipo mais comum e importante de associação micorrízica, sendo encontrada tanto em condições naturais como em plantas cultivadas (HAYMAN, 1980; MOSSE, 1981; BAREA & AZCÓN-AGUILAR, 1983; ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985; HARLEY, 1986). A sua nomenclatura está baseada em suas estruturas típicas, as vesículas e os arbúsculos. As famílias de plantas que não formam MVA incluem Pinaceae, Betulaceae, Orchidaceae, Fumariaceae, Commelinaceae, Urticaceae e Ericaceae. Algumas famílias raramente formam MVA, estando entre elas: Cruciferae, Chenopodiaceae, Polygonaceae e Cyperaceae. As MVA ocorrem em uma infinidade de plantas daninhas, são largamente encontradas em angiospermas, gimnospermas, pteridófitas e briófitas, e são amplamente disseminadas nas gramíneas e nas leguminosas (ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985). Aliado à sua grande distribuição pelo reino vegetal, as MVA também podem ser encontradas nas

mais diversas regiões, do ártico aos trópicos (TINKER, 1980; BAREA & AZCÓN-AGUILAR, 1983; POWELL & BAGYARAJ, 1984; ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985).

Os fungos micorrízicos vesicular-arbusculares são considerados simbiontes obrigatórios, pois não é possível cultivá-los na ausência da planta hospedeira (MOSSE, 1981; POWELL & BAGYARAJ, 1984). Eles pertencem à família Endogonaceae, na qual estão incluídos os gêneros *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Sclerocystis*, *Glaziella* e *Entrophospora* (HALL, 1984; ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985; OLIVEIRA, 1986).

Este tipo de associação micorrízica é caracterizado pela presença no interior da raiz de estruturas provenientes de crescimento do fungo tanto intercelular como intracelularmente, denominadas vesículas e arbúsculos.

As vesículas são estruturas globosas e que normalmente são consideradas como órgãos temporários de armazenamento de substâncias de reserva do fungo (MOSSE, 1981; ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985). No entanto, estudos citológicos demonstram que as vesículas assemelham-se mais a propágulos em estado de dormência (HOLLEY & PETERSON, 1979; BAREA & AZCÓN-AGUILAR, 1983; BONFANTE-FASOLO, 1984).

Os arbúsculos têm como função intermediar a transferência bidirecional de nutrientes. O fungo transfere nutrientes para o hospedeiro e deste recebe fotossintetados, através dos arbúsculos (COX & TINKER, 1976; GIANINAZZI et alii, 1983; BONFANTE-FASOLO, 1984). Porém, esta atividade de troca tem uma duração muito pequena, pois os arbúsculos têm

um período de vida de aproximadamente 4 a 10 dias (COX & TINKER, 1976; HOLLEY & PETERSON, 1979; SMITH, 1980; TINKER, 1980; MOSSE, 1981; BAREA & AZCÓN-AGUILAR, 1983; ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985). Após este período, os arbúsculos entram em colapso e são digeridos pela célula hospedeira (SMITH, 1980).

O processo de infecção inicia-se com a germinação do esporo do fungo no solo que, ao atingir a superfície da raiz, penetra-a, emitindo uma estrutura de fixação denominada de apressório (BONFANTE-FASOLO, 1984). Após o estabelecimento interno da infecção, a hifa de penetração ramifica-se externamente, podendo crescer sobre a raiz, formando mais pontos de penetração, e também crescer no solo em volta da raiz, formando uma grande rede tridimensional (BAREA & AZCÓN-AGUILAR, 1983). Este desenvolvimento do fungo no solo é extremamente importante, pois representa uma superfície de absorção adicional para a planta que, dessa maneira, pode explorar um maior volume de solo (BIELESKI, 1973; MOSSE, 1981; BETHLENFALVAY et alii, 1982b; HAYMAN, 1983; CLARKSON, 1985; DIEM et alii, 1986).

2.1.2. FISIOLOGIA DOS FUNGOS MVA

As propriedades do sistema radicular regulam sua capacidade de extrair e absorver nutrientes do solo. Os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\max}$) da absorção de íons, a ex-

tensão das raízes, a quantidade e o comprimento dos pêlos radiculares, são considerados como as propriedades básicas do sistema radicular que influenciam a absorção de nutrientes pela planta. Um aspecto relevante a ser considerado é a modificação da disponibilidade dos nutrientes na rizosfera devido às interações entre o sistema radicular e os microrganismos, decorrentes da secreção de polissacarídeos que atuaram na agregação do solo, mantendo desse modo a sua porosidade. A liberação de enzimas (fosfatases) e a secreção de ácidos orgânicos podem ser importantes em relação à absorção de P em solos deficientes neste nutriente (CLARKSON, 1985). O fato do sistema radicular formar associação simbiótica com microrganismos também deve ser considerado como uma importante propriedade da planta a influenciar a sua capacidade de absorver nutrientes do solo ou manter níveis adequados de um determinado nutriente.

Vários pesquisadores são unânimes em afirmar que o fato da planta formar micorriza tem uma grande influência na sua capacidade de absorver nutrientes do solo, principalmente em relação ao P em condições de baixa disponibilidade (MOSSE, 1981; HAYMAN, 1983; JAKOBSEN, 1986; KARUNARATNE et alii, 1986; SKUJINS & ALLEN, 1986).

O aumento da absorção de P por plantas micorrizadas está associado ao fato de que as hifas externas do fungo atuam como uma extensão do sistema radicular, proporcionando dessa maneira tanto uma maior superfície de absor-

ção de nutrientes do solo, como um aumento da eficiência dessa absorção pelo sistema radicular (BIELESKI, 1973; TINKER, 1975).

O fósforo é o elemento mais favorecido pois, para ser absorvido pela planta, devido à sua baixa mobilidade no solo, é necessário que ele se difunda pela solução do solo até atingir a raiz da planta (NYE & TINKER, 1977; MALAVOLTA, 1980). A difusão pela solução do solo é lenta, e em condições de baixa disponibilidade de P sua absorção pela planta proporciona o rápido surgimento de uma região em torno das raízes onde este nutriente foi totalmente absorvido, sendo denominada de zona de depleção de P (BHAT & NYE, 1973). Frequentemente estas zonas de depleção envolvem os pêlos radiculares, mantendo-os numa região exaurida de nutrientes (CLARKSON, 1985).

As hifas externas dos fungos micorrízicos podem atingir comprimentos relativamente grandes quando comparadas ao tamanho de um pêlo radicular, chegando a alcançar 7cm de comprimento (RHODES & GERDEMANN, 1975).

A razão entre o comprimento da hifa de MVA e o comprimento da raiz depende da espécie de fungo micorrízico considerada, sendo determinada uma variação de 250-1400cm de hifa por cm de raiz de trevo subterrâneo infectado por diversas espécies de fungo micorrízico (ABBOTT & ROBSON, 1985). Este grande crescimento das hifas permite que elas atuem como uma ponte para o fosfato através da zona de depleção, ab-

sorvendo o P de uma maneira mais eficiente que os pêlos radiculares (NYE & TINKER, 1977; HAYMAN, 1983). HAYMAN (1983) considera que o efeito físico da micorriza de aumentar o volume de solo explorado pela planta explica grande parte do aumento na absorção de P, mas não completamente, considerando-se que os mecanismos fisiológicos são também importantes. Entre esses mecanismos fisiológicos destaca-se o fato de que as raízes micorrizadas permanecem ativas por mais tempo (BOWEN et alii, 1975). As raízes micorrizadas possuem um limiar de fósforo na solução do solo menor do que o das raízes não micorrizadas (MOSSE et alii, 1973). Considera-se que as raízes micorrizadas possuem mais energia metabólica para absorver fósforo num gradiente de concentração em torno de 10^{-6} - 10^{-7} M na solução do solo, para 10^{-2} - 10^{-3} M na raiz (BIELESKI, 1973).

A absorção de fósforo radioativo pelos fungos, tanto ectomicorrízicos quanto endomicorrízicos, já foi demonstrada em vários experimentos (MORRISON, 1954; MORRISON, 1957; GRAY & GERDEMANN, 1967; GRAY & GERDEMANN, 1969; HATTINGH et alii, 1973; RHODES & GERDEMANN, 1975). Também foi demonstrado que é uma absorção ativa, obedecendo a um gradiente de concentração de 1:1000, isto é, 2-4mM de P no interior da hifa para 1 a 3μ M de P inorgânico na solução do solo (TINKER, 1975). Devido ao aumento na absorção de P por plantas micorrizadas, é muito importante determinar-se quais são as fontes de P que estão disponíveis para essas plantas. Atra-

vês da marcação do fósforo do solo com P-32 e do acompanhamento da atividade específica do radioisótopo nas plantas micorrizadas e não micorrizadas, é possível determinar se as plantas micorrizadas têm acesso a fontes de P que estariam indisponíveis para as plantas não micorrizadas. Vários pesquisadores que realizaram experimentos com esta intenção são unânimes em afirmar que tanto as plantas micorrizadas como as não micorrizadas utilizam-se da mesma fonte de P do solo, sendo que a micorriza, apesar de aumentar a absorção deste nutriente pela planta, não tem acesso a fontes de P que seriam indisponíveis para as plantas não micorrizadas (SANDERS & TINKER, 1971; HAYMAN & MOSSE, 1972a; HAYMAN & MOSSE, 1972b; POWELL, 1975; GIANINAZZI-PEARSON et alii, 1981; THOMAS et alii, 1982). Algumas vezes pode-se observar que a atividade específica do P-32 nas plantas micorrizadas é menor do que nas não micorrizadas, indicando portanto que a planta micorrizada absorve fósforo de fontes outras que não o fósforo lá bil marcado com P-32. No entanto, não significa necessariamente uma solubilização do fosfato insolúvel pela micorriza, mas uma maior liberação do P pouco disponível, devido à alta absorção de fósforo pelas plantas micorrizadas, o qual não estava em equilíbrio com o P-32 adicionado (OWUSU-BENNOAH & WILD, 1980).

2.1.3. INFLUÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM LEGUMINOSAS

A coexistência de uma bactéria e um fungo como endófitos do sistema radicular de leguminosas, estabelecendo uma associação simbiótica tríplice, foi primeiramente descrita por Janse em 1886 (BAREA & AZCÓN-AGUILAR, 1983). JONES (1924), estudando fungos parasitos de ervilha e outras leguminosas, também determinou a presença de fungos associados ao sistema radicular das plantas, que já eram denominados de fungos micorrízicos.

Entre as plantas leguminosas fixadoras de nitrogênio capazes de formar associações micorrízicas estão incluídas espécies de grande importância, tanto para regiões temperadas, como tropicais, destacando-se o trevo, a alfafa, *Phaseolus*, *Vicia*, a ervilha, a soja, o caupi, o amendoim, *Stylosanthes*, *Pueraria*, *Centrosema* e *Leucaena*, todas formando micorriza do tipo vesicular-arbuscular (HAYMAN, 1986).

A ocorrência de micorriza VA tem sido observada em leguminosas crescendo numa grande variedade de habitats. No Brasil, a ocorrência natural de micorriza VA, associada com leguminosas nativas ou introduzidas, já foi constatada em várias regiões (SAITO et alii, 1983; VASCONCELLOS et alii, 1984; ALMEIDA et alii, 1985; ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985).

Apesar do conhecimento sobre a associação tríplice *Rhizobium* x leguminosa x MVA ser antigo, somente em

1944, devido ao trabalho de T. Asai, houve a sugestão de que a nodulação de várias leguminosas dependia da sua associação com fungos micorrízicos (MOSSE, 1977; BAREA & AZCÓN-AGUILAR, 1983; BAGYARAJ, 1984). Uma relação definitiva entre produção de leguminosas e infecção micorrízica foi estabelecida na década de 70, quando importantes trabalhos foram realizados com esta finalidade.

Numa série de trabalhos, DAFT & EL-GIAHMI (1974, 1975, 1976), utilizando *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa* e *Arachis hypogaea*, demonstraram que a presença de fungo micorrízico aumentou o crescimento, o número e o peso de nódulos, a taxa de redução de acetileno, o teor de leghemoglobina, o fósforo total e o conteúdo de proteína. Também observaram que a aplicação de fósforo solúvel simula os efeitos do fungo micorrízico. Pode-se citar ainda vários trabalhos que demonstram o benefício dos fungos micorrízicos para o desenvolvimento adequado de leguminosas e uma eficiente fixação biológica de nitrogênio, tais como: CARLING et alii (1978), GODSE et alii (1978), ASIMI et alii (1980), BAREA et alii (1980), REDENTE & REEVES (1981), ROSE & YOUNGBERG (1981), BONETTI (1984), MANJUNATH et alii (1984).

O estudo da associação tríplice *Rhizobium* x leguminosa x MVA demonstra que existe um sinergismo entre *Rhizobium* e micorriza, resultando em benefício para o sistema como um todo.

O estabelecimento de *Hedysarum coronarium*, u-

ma leguminosa forrageira, em um habitat novo só foi possível graças à presença de ambos os simbiossantes que, juntos, foram superiores aos tratamentos convencionais de N-P-K (AZCÓN - AGUILAR et alii, 1982).

Em um experimento de campo, onde se utilizou o método do valor A para determinar a percentagem de N da planta derivada da fixação, demonstrou-se que a soja inoculada com *Rhizobium japonicum* e *Glomus mossae* é capaz de fixar 75% de N a mais do que a soja não inoculada com fungo micorrízico (GANRY et alii, 1982).

Em outro experimento de campo, plantas de soja inoculadas com isolados de fungo micorrízico e *Rhizobium japonicum* apresentaram maior número de vagens, produção, peso seco e altura quando comparadas com plantas inoculadas com os microsimbiossantes separadamente. Houve uma resposta extremamente significativa para a nodulação quando a inoculação com *Rhizobium* foi feita juntamente com a inoculação de isolados de fungos micorrízicos (HALOS et alii, 1982).

EL-HASSANIN & LIND (1985), estudando a influência da fertilidade do solo na simbiose tríplice entre *Rhizobium* x *Vicia faba* x MVA, determinaram que ambos, *Rhizobium* e micorriza, são essenciais para a obtenção de altos níveis de produção e de fixação de N_2 . O crescimento da parte aérea e da massa de nódulos aumentou dez vezes, e a atividade da nitrogenase cerca de sete vezes em resposta à presença de micorriza em baixos níveis de P em casa de vegetação.

Embora os fungos micorrízicos apresentem um baixo grau de especificidade, a eficiência simbiótica é afetada por fatores que controlam o crescimento das hifas do fungo no solo, pela translocação e liberação do fósforo na raiz do hospedeiro e pela patogenicidade latente do fungo (MOSSE, 1981). SILVEIRA & CARDOSO (1987b), estudando várias espécies de fungos MVA em associação com feijoeiro observaram que a espécie *Glomus leptotrichum* foi a mais eficiente em promover o crescimento e a produção do feijoeiro.

Na associação tríplice *Rhizobium* x leguminosa x MVA, as interações que ocorrem entre os simbiossiontes são principalmente relativas à demanda de carboidratos e à influência do P no desenvolvimento de cada componente individualmente (DAFT, 1978; BETHLENFALVAY et alii, 1982a; BETHLENFALVAY et alii, 1982c).

2.2. INFLUÊNCIA DO FÓSFORO NA FBN DO FEIJOEIRO

O fósforo tem várias funções na planta. Estas funções estão relacionadas com a estrutura da planta (fosfolipídeos presentes nas membranas celulares) e com o armazenamento e o fornecimento de energia através das moléculas de ATP. A energia armazenada na forma de ATP é utilizada em processos metabólicos vitais para a planta, no trabalho mecânico de penetração das raízes no solo e no crescimento geral da planta. Devido ainda ao seu papel na síntese de pro

teínas, a sua ausência resulta num subdesenvolvimento da planta (MALAVOLTA, 1980).

Observando-se a marcha de absorção de macronutrientes pelo feijoeiro, nota-se que o P é absorvido durante todo o ciclo da planta de uma maneira contínua (HAAG et alii, 1967). Pode-se concluir, portanto, que é necessário um suprimento adequado de P durante todo o ciclo da planta para que haja um bom desenvolvimento da cultura. Isto é confirmado pelo trabalho realizado por GUADRON (1985), em que foi estudada a melhor época de aplicação do P, tendo sido concluído que a aplicação no plantio é preferível à aplicação com a planta em desenvolvimento. Este autor também observou que a aplicação de P no plantio proporcionou efeitos significativos no número de vagens por planta, na matéria seca, no rendimento de grãos e ainda, dependendo do tipo de solo, houve um incremento de 38 a 125% no índice de área foliar.

O feijoeiro pode associar-se simbioticamente com bactérias do gênero *Rhizobium* e fixar parte do nitrogênio necessário para o seu desenvolvimento. A quantidade de nitrogênio fixado já foi determinada, apresentando grandes variações dependendo do método empregado para avaliá-la.

RUSCHEL & RUSCHEL (1975), usando a técnica da redução de acetileno e considerando como sendo 2 o fator de conversão de moléculas de acetileno reduzido para moléculas de N_2 reduzido, constataram que a planta pode fixar em torno de 45% das suas necessidades de nitrogênio. Westermann & Koler citados por LARUE & PATTERSON (1981), utilizando a

mesma técnica, estimaram que *Phaseolus vulgaris* é capaz de fixar 10kg N/ha. SAITO (1982) cita vários autores que, utilizando esta técnica, determinaram a capacidade fixadora de nitrogênio pelo feijoeiro.

Com o uso de técnicas mais apuradas (método da diluição isotópica do N-15), RUSCHEL et alii (1982) determinaram que, dependendo da variedade de feijão (precoce ou tardia), pode haver fixação de 37 a 68% das suas necessidades de nitrogênio. Utilizando a mesma técnica, FONSECA (1985) observou que o feijoeiro fixou até 67% das suas necessidades de nitrogênio, em média.

TRIVELIN et alii¹, trabalhando com feijão, observaram que quando as plantas foram inoculadas com estirpe eficiente de *Rhizobium*, a fixação variou de 59 a 95% do nitrogênio da planta, sendo que a variedade Carioca foi a que mais fixou.

Para que a planta possa fixar nitrogênio convenientemente é necessário um suprimento adequado de P, pois o processo de redução do N₂ a amônia requer grandes quantidades de energia na forma de ATP (LOWE et alii, 1985).

As necessidades de P não se restringem apenas ao processo bioquímico de fixação de N₂, mas este nu-

1 TRIVELIN, P.C.O.; VICTÓRIA, R.L.; SAITO, S.M.T. (Centro de Energia Nuclear na Agricultura - ESAL/USP, Piracicaba). Field estimates of nitrogen fixation in *Phaseolus bena* (*Phaseolus vulgaris* L.) using N-15 natural variation method. (Em elaboração).

triente também é requerido para um desenvolvimento adequado do tecido nodular e da planta como um todo.

MALAVOLTA et alii (1982), numa série de experimentos em solução nutritiva para avaliar os fatores nutricionais que afetam a fixação em feijão, constataram que a nodulação apresenta uma resposta linear ao P.

FLOOR (1982), em experimento realizado no Quênia, observou que a adição de P aumentou a nodulação e diminuiu consideravelmente a quantidade de água requerida para a produção de 1kg de matéria seca. Ele concluiu em seu trabalho que o P desempenha um papel importantíssimo no desenvolvimento do feijoeiro.

BONETTI et alii (1984) demonstram que os nódulos necessitam de uma grande quantidade de P e que este nutriente contribui para aumentar o número e o peso dos nódulos.

GRAHAM & ROSAS (1979), estudando a influência da adubação fosfatada na fixação de nitrogênio pelo feijoeiro, notaram que a fixação de N_2 está altamente correlacionada com a adubação, com a concentração de P nos nódulos e com o P total dos nódulos. Observaram também que é necessária uma grande concentração de P no tecido nodular para que ocorra uma atividade fixadora adequada, sendo os nódulos considerados como grandes consumidores de fósforo. Outros experimentos também concluem que o P tem grande influência tanto na nodulação quanto na fixação de N_2 (SAITO & RUSCHEL, 1978; SÁNCHEZ et alii, 1978; SINGLETON et alii, 1985).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), em Piracicaba (SP).

3.1. PLANTA

Foi utilizada a variedade Carioca de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cujas sementes foram cedidas pela EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Goiânia (GO).

3.2. SOLO

Utilizou-se um solo hidromórfico com alto teor de P, coletado em várzea localizada na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESLQ-USP), em Piracicaba (SP).

Este solo foi escolhido visando dar continuidade a estudos que já vinham sendo realizados pela Seção de Microbiologia do Solo (CENA-USP).

O solo foi seco ao ar, sendo uma amostra enviada para a execução de análise química.

A análise química foi realizada pelo Departamento de Química e Nutrição Mineral de Plantas da ESALQ-USP, e os resultados são apresentados na Tabela 1.

A este solo misturou-se areia na proporção de 1:1 (p/p), sendo posteriormente retirada uma amostra que foi enviada para o laboratório já citado. Nesta amostra foi feita nova análise para a verificação dos teores de nutrientes resultantes da mistura, cujos resultados constam na Tabela 1.

Fez-se a determinação do nitrogênio mineral presente tanto no solo como na mistura solo + areia, através do método da extração do N-mineral com KCl 2N com posterior destilação e titulação. O resultado desta análise é mostrado na Tabela 2.

Metade da mistura solo + areia, que passará a ser denominada de substrato, foi fumigada com brometo de metila para eliminação de esporos de fungos micorrízicos nativos. Para isto, o substrato foi colocado em uma caixa com 1000 l de capacidade, que foi coberta com lona plástica para promover sua vedação. Em seguida, aplicou-se 50ml de brometo de metila, deixando-o atuar por um período de 3 dias. Após este período, a vedação foi retirada e o substrato foi deixado a descoberto durante 15 dias, sendo revolvido periodicamente para eliminação de resíduos do gás empregado.

Tabela 1 - Análise química do solo proveniente de várzea e da mistura solo + areia.

P resina (mg P/ml)	pH	K	Ca	Mg	H+Al	S ¹	T ²	V ³ (%)	MC(%)
(e.mg/100g)									
Solo									
73,6	5,0	0,36	5,0	2,68	2,63	8,0	10,7	75,4	2,1
Mistura									
57,6	5,0	0,29	2,46	1,9	1,92	4,7	6,6	70,8	2,7

¹S = soma de bases;

²T = capacidade de troca catiônica;

³V(%) = percentagem de saturação de bases.

Tabela 2 - Análise do teor de N-mineral no solo e na mistura solo+areia.

	N-NH ₃	N-NO ₃ ⁻	Total
	(ppm)		
Solo	7,7	27,8	35,5
Mistura	4,3	17,9	22,2

A seguir, o substrato fumigado e não fumigado foi dividido em 96 partes de 3kg cada uma, que foram acondicionadas em sacos plásticos individuais com 0,15mm de espessura. Este procedimento fez-se necessário para possibilitar uma adequada marcação do fósforo do solo com P-32.

3.3. MARCAÇÃO DO FÓSFORO DO SOLO COM P-32

Adquiriu-se junto ao IPEN, São Paulo (SP), solução de P-32 livre de carregador, que foi diluída em uma solução contendo 3 mg P-31/ml como carregador.

Foram colocados 20g de areia em 96 frascos plásticos, distribuindo-se 1 ml da solução acima descrita por frasco. Após secagem em estufa a 60°C, o conteúdo de cada frasco foi adicionado a cada uma das partes de substrato, procedendo-se à homogeneização da mistura dentro dos próprios sacos plásticos que continham o substrato, resultando na marcação do solo em aproximadamente 65µ Ci/vaso.

3.4. VASOS

Foram utilizados vasos de barro com capacidade para 3kg de solo, nos quais foram colocados os sacos plásticos contendo o substrato.

3.5. TRATAMENTOS

Foram utilizados 4 tratamentos:

- 1) Sem micorriza (SMVA)
- 2) Fungos micorrízicos nativos (NAT)
- 3) *Glomus leptotichum* (GL)
- 4) *Glomus leptotichum* + fungos nativos (NGL)

Nos tratamentos 1 e 3 foi utilizado o substrato fumigado e nos tratamentos 2 e 4 o substrato não fumigado.

Nos tratamentos 2 e 4 a inoculação de *Glomus leptotichum* foi feita utilizando-se inóculo obtido através da sua multiplicação em feijoeiro. Para isto, em cada vaso foram colocados 50g de solo + raízes picadas + esporos (400-500 esporos/100g solo).

Nos tratamentos 1 e 3 aplicou-se um filtrado livre de esporos de MVA, obtido do solo utilizado no experimento, para recuperar a população microbiana presente neste solo.

Para eliminar possíveis interferências, foram adicionados 50g de inóculo de *G. leptotichum* esterilizado aos tratamentos 1 e 2.

Em todos os tratamentos as plantas foram inoculadas com a estirpe C-05II de *Rhizobium phaseoli* resistente a estreptomicina, selecionada na Seção de Microbiologia do Solo do CENA/USP.

A presença do carregador na solução de P-32 adicionada ao substrato correspondeu a uma adubação fosfatada de 1 ppm.

3.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi instalado em casa de vegetação num esquema fatorial 4x4, inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, 4 épocas de amostragem e 6 repetições, num total de 96 vasos.

As amostragens foram realizadas a intervalos que variaram entre 9 e 11 dias, e tiveram como ponto de referência o dia da emergência das plantas:

- 1ª amostragem: 24 dias após a emergência (DAE)
- 2ª amostragem: 35 DAE
- 3ª amostragem: 44 DAE
- 4ª amostragem: 56 DAE

Paralelamente ao experimento principal, o tratamento 2 foi repetido utilizando-se substrato sem marcação com P-32, com a finalidade de acompanhar o desenvolvimento da infecção micorrízica causada pelos fungos nativos nos nódulos do feijoeiro.

3.7. PLANTIO

Foram plantadas 6 sementes da variedade Carioca de *Phaseolus vulgaris* L. por vaso, sendo deixadas duas plantas por vaso após o desbaste.

Antes do plantio as sementes foram inoculadas com *Rhizobium* e, no desbaste, cada planta recebeu 1ml de suspensão de *Rhizobium* altamente concentrada. A inoculação de fungo micorrízico foi feita colocando-se o inóculo a cerca de 5cm de profundidade, com as sementes sendo colocadas pouco acima.

O plantio foi realizado no dia 05 de fevereiro de 1986 e as plantas emergiram no dia 10 de fevereiro. A última amostragem foi realizada no dia 21 de abril.

3.8. PARÂMETROS AVALIADOS

Em cada amostragem foram avaliados os seguintes parâmetros:

- . atividade total e específica da nitrogenase (HARDY et alii, 1968);

- . número e peso da matéria seca de nódulos;

- . percentagem de infecção do sistema radicular por fungo micorrízico (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980), colorin

do-se as raízes com trypan blue (PHILIP & HAYMAN, 1970);

. peso da matéria seca da palha, das vagens e das raízes;

. percentagem de fósforo e de nitrogênio na matéria seca da palha, das vagens, das raízes e dos nódulos;

. atividade do P-32 na palha, nas vagens, nas raízes e nos nódulos.

A determinação de fósforo e nitrogênio nas várias partes da planta foi feita através de digestão sulfúrica seguida de determinação colorimétrica (ZAGATTO et alii, 1981).

Foram usados 20ml da solução resultante da digestão sulfúrica para a determinação da atividade total do P-32 nas diversas partes da planta. Esta atividade foi determinada através do efeito Cerenkov medido em aparelho de cintilação líquida Beckman LS-230, da Seção de Radioisótopos do CENA-USP. O acompanhamento do decaimento radioativo foi feito com o uso de padrão (3 repetições) preparado a partir de 1g da areia marcada que foi adicionada ao substrato. Foi feita uma digestão sulfúrica e retirados 20ml da solução resultante para a determinação, em cada época de amostragem, da atividade do padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA E ACÚMULO DE FÓSFORO E DE NITROGÊNIO

De um modo geral, a produção de matéria seca pelo feijoeiro neste experimento foi baixa, obtendo-se no máximo 5,3g/vaso no tratamento GL. Provavelmente isto se deveu às altas temperaturas que ocorreram durante o período experimental dentro da casa de vegetação. A temperatura mínima média registrada foi de 23°C, e a máxima média foi de 36°C, chegando a extremos de 42°C.

No entanto, observando-se os resultados (Tabela 3, Figura 1), fica patente que a presença de fungo micorrízico favoreceu significativamente o crescimento do feijoeiro, confirmando desta maneira os resultados obtidos por outros pesquisadores (ZAMBOLIM et alii, 1985; SILVEIRA & CARDOSO, 1987a).

Esta influência positiva dos fungos MVA no crescimento do feijoeiro está diretamente relacionada com a maior absorção de fósforo pela planta micorrizada. A presença de fungo micorrízico fez com que a percentagem de P no tecido da planta inteira, e de suas diferentes partes, pratica

Tabela 3. Influência do fungo micorrízico no peso da matéria seca da planta inteira e das diferentes partes da planta na última amostragem (56 DAE). Média de 6 repetições.

Tratamento	Palha	Vagens	Raiz	Planta inteira
----- (g/planta) -----				
SMVA	1,67c ¹	0,74 b	0,58 a	2,99 b
NAT	2,03 bc	1,90 a	0,65 a	4,75 a
GL	2,41 a	1,97 a	0,67 a	5,28 a
NGL	2,20 ab	1,74 a	0,63 a	5,03 a
CV(%)	13,4	20,2	14,7	12,5

¹Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

mente dobrasse em relação ao tratamento SMVA (Tabela 4). Como pode ser observado nas Figuras 2, 3 e 4, a planta sem micorriza apresentou uma concentração constante de P da primeira até a última amostragem, nas suas várias partes, mostrando-se incapaz de absorver P do solo, mesmo apresentando um sistema radicular comparável ao dos demais tratamentos com fungos MVA (Tabela 3).

Segundo MALAVOLTA et alii (1974), um feijoeiro adequadamente nutrido apresenta 0,36% de P nas folhas, enquanto um feijoeiro deficiente em P possui 0,13%. O teor de P na planta inteira (Tabela 4), nos tratamentos NAT, GL e

Figura 1 - Influência da micorriza VA na produção de matéria seca em diferentes épocas de desenvolvimento do feijoeiro.

Tabela 4. Influência do fungo micorrízico na percentagem de fósforo da planta inteira e das diferentes partes da planta na última amostragem (56 DAE). Média de 6 repetições.

Tratamento	Palha	Vagens	Raiz	Planta Inteira
	----- (%) -----			
SMVA	0,10 b ¹	0,29 c	0,12 c	0,16 b
NAT	0,24 a	0,38 b	0,22 a	0,31 a
GL	0,24 a	0,45 a	0,19 b	0,32 a
NGL	0,22 a	0,37 b	0,22 a	0,30 a
CV(%)	1,3	1,4	0,8	6,1

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

NGL, pode ser considerado como normal, enquanto para o feijoeiro sem fungo micorrízico foi semelhante ao de uma planta deficiente.

Esta constatação é surpreendente, pois o substrato utilizado neste experimento apresentou altos níveis de P disponível (41 ppm), e mesmo assim a planta sem fungo MVA mostrou-se incapaz de absorver o fósforo do solo. Observa-se na Figura 5 que, enquanto nos tratamentos com fungos MVA o feijoeiro absorveu P durante todo o seu crescimento, a planta não micorrizada manteve praticamente inalterada a quanti-

Figura 2 - Influência da micorriza VA na concentração de fósforo em diferentes épocas de desenvolvimento do feijoeiro.

Figura 3 - Efeito de fungos MVA na concentração de fósforo na palha de feijoeiro em diferentes épocas de desenvolvimento.

Figura 4 - Efeito de fungos MVA na concentração de fósforo na raiz de feijoeiro em diferentes épocas de desenvolvimento.

Figura 5 - Acúmulo de fósforo nas diferentes épocas de desenvolvimento do feijoeiro submetido a tratamentos com fungos MVA.

dade de P absorvido da primeira até a última amostragem, prejudicando dessa maneira o desenvolvimento da planta (Figura 1).

Poderia ser levantada a hipótese de que a fumigação com brometo de metila teria deixado resíduos tóxicos no solo que poderiam ter atuado no sistema radicular do feijoeiro. No entanto, no tratamento GL também foi aplicado o brometo de metila, e verifica-se que neste tratamento o feijoeiro apresentou os maiores acúmulos de P (Tabela 5, Figura 5).

A percentagem de N nas plantas sem micorriza foi, de um modo geral, superior à das plantas micorrizadas (Tabela 6, Figuras 6 e 7). No entanto, o acúmulo de nitrogênio foi maior nos tratamentos NAT, GL e NGL (Tabela 7, Figura 8).

Essa maior concentração de N no tecido das plantas sem micorriza se deve ao menor crescimento da planta combinado com um grande acúmulo de N. Como pode ser notado na Figura 8, a quantidade de N acumulada pela planta inteira no tratamento SMVA diferiu muito pouco daquelas que ocorreram nos tratamentos com fungo MVA, entre a 1ª e a 3ª amostragens. Pela Figura 9 percebe-se que não houve diferença entre os tratamentos no que se refere ao parâmetro acúmulo de N na palha. Portanto, devido à baixa produção de matéria seca (Figura 1), a percentagem de N na matéria seca das plantas não micorrizadas (tratamento SMVA) foi superior à das plantas submetidas aos tratamentos com fungos MVA (NAT, GL e NGL).

Tabela 5. Influência do fungo micorrízico na quantidade de fósforo total da planta inteira e das diferentes partes da planta na última amostragem (56 DAE). Média de 6 repetições.

Tratamentos	Palha	Vagens	Raiz	Planta inteira
----- (mg/planta) -----				
SMVA	1,77 b ¹	2,09 c	0,71 b	4,57 c
NAT	4,80 a	7,19 ab	1,43 a	14,53 b
GL	5,82 a	8,57 a	1,26 a	16,95 a
NGL	4,78 a	6,52 b	1,35 a	14,96 b
CV(%)	20,2	15,3	15,2	14,9

¹Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6. Influência do fungo micorrízico na percentagem de nitrogênio da planta inteira e das diferentes partes da planta na última amostragem (56 DAE). Média de 6 repetições.

Tratamento	Palha	Vagens	Raiz	Planta inteira
----- (%) -----				
SMVA	2,92 a ¹	3,96 a	2,11 b	2,83 a
NAT	2,54 ab	2,61 b	2,27 ab	2,61 a
GL	2,32 b	2,99 b	2,49 a	2,64 a
NGL	2,23 b	2,75 b	2,35 ab	2,48 a
CV(%)	4,3	3,4	3,03	4,9

¹Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 6 - Concentração de nitrogênio em diferentes épocas de desenvolvimento do feijoeiro submetido a tratamentos com fungos MVA.

Figura 7 - Concentração de nitrogênio em diferentes épocas na palha do feijoeiro submetido a tratamentos com fungos MVA.

Tabela 7. Influência do fungo micorrízico na quantidade de nitrogênio total da planta inteira e das diferentes partes da planta na última amostragem (56 DAE). Média de 6 repetições.

Tratamento	Palha	Vagens	Raiz	Planta inteira
- - - - - (mg/planta) - - - - -				
SMVA	48,73 a ¹	26,29 b	12,20 b	84,45 b
NAT	51,87 a	49,93 a	15,31 ab	124,54 a
GL	55,76 a	58,22 a	16,57 a	138,96 a
NGL	48,86 a	47,91 a	14,70 ab	124,75 a
CV (%)	13,3	19,0	14,8	12,1

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4.2. RAZÃO RAIZ/PARTE AÉREA E PERCENTAGEM DE INFECÇÃO MICORRÍZICA

A presença de fungo MVA provocou uma diminuição significativa na razão raiz/parte aérea aos 56 DAE (Tabela 8). Não houve diferença significativa entre os tratamentos com fungo MVA.

Este resultado é amplamente confirmado pela literatura, e considera-se que seja devido às diferenças na distribuição da matéria seca entre a parte aérea e a raiz,

Figura 8 - Acúmulo de nitrogênio em diferentes épocas de desenvolvimento do feijoeiro submetido a tratamentos com fungos MVA.

Figura 9 - Quantidade de nitrogênio na palha em diferentes épocas de desenvolvimento do feijoeiro submetido a tratamentos com fungos MVA.

Tabela 8. Razão entre a matéria seca da raiz e da parte aérea e percentagem de infecção micorrízica do sistema radicular na última amostragem (56 DAE). Média de 6 repetições.

Tratamento	Razão raiz/parte aérea	Percentagem de infecção micorrízica
SMVA	0,24 a ¹	0,0
NAT	0,17 b	66,4 a
GL	0,15 b	41,7 b
NGL	0,16 b	65,4 a
CV(%)	7,4	13,3

¹Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

decorrente principalmente de fatores nutricionais (SMITH, 1980).

De fato, analisando-se a Tabela 3, verifica-se que no tratamento SMVA 19,9% da matéria seca da planta inteira foram devidos à contribuição da matéria seca da raiz. Nos tratamentos com fungo MVA, a matéria seca da raiz correspondeu a 13,7%, 12,7% e 12,5% do total de matéria seca, para os tratamentos NAT, GL e NGL, respectivamente.

O fungo *Glomus leptotrichum* proporcionou menor nível de infecção da raiz (Tabela 8, Figura 10).

Figura 10 - Infecção do sistema radicular do feijoeiro por fungos MVA em diferentes épocas do desenvolvimento da planta.

A partir da 2ª amostragem, a variação na percentagem de infecção micorrízica, mostrada na Figura 10, não foi significativa para o tratamento NGL. Nos tratamentos NAT e GL houve estabilização da percentagem de infecção micorrízica a partir da 3ª amostragem.

SILVEIRA & CARDOSO (1987 b), trabalhando com a variedade Carioca de *Phaseolus vulgaris* L. inoculada com *G. leptotrichum*, observaram que a infecção micorrízica foi de 50%.

No presente experimento, a baixa infecção micorrízica causada por *G. leptotrichum* pode ter sido devida à sua baixa adaptabilidade às condições de altos teores de fósforo. Por outro lado, os fungos nativos mostraram estar mais adaptados a esta condição, tanto assim que a percentagem de infecção micorrízica foi significativamente maior nos tratamentos com fungo nativo (NAT e NGL).

A capacidade de algumas espécies de fungo MVA em tolerar altos níveis de fósforo disponível no solo já foi detectada a nível de campo. No entanto, não se determinou se esta maior tolerância está associada a uma maior eficiência do fungo MVA em promover o crescimento do hospedeiro (DAVIS et alii, 1984).

Nota-se pela Figura 10 que a percentagem de infecção micorrízica no tratamento NGL foi semelhante à do tratamento NAT em todas as amostragens. Aparentemente, a introdução do *G. leptotrichum* não teve nenhum efeito sobre a ca

pacidade dos fungos nativos em infectar a raiz da planta hospedeira, ou seja, não houve competição entre as espécies de fungos MVA por sítios de infecção na raiz.

Observando-se as Figuras 1, 5, 8 e 10, nota-se que o tratamento com *G. leptotichum* manteve-se sempre superior ou igual aos demais tratamentos, mesmo tendo uma menor percentagem de infecção, demonstrando desta maneira que este fungo foi mais eficiente do que os fungos nativos em promover o crescimento da planta. Esta observação está em concordância com os resultados obtidos por SILVEIRA & CARDOSO (1987 b) que, trabalhando com a variedade Carioca de *Phaseolus vulgaris* L. e várias espécies de fungo MVA, determinaram ser o *G. leptotichum* a espécie mais eficiente para o feijoeiro.

Os resultados do tratamento realizado sem a marcação do solo com P-32, com a finalidade de observar a ocorrência de infecção dos nódulos por fungos micorrízicos nativos, mostram que eles não foram infectados por fungo MVA.

4.3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)

A presença de fungo MVA aumentou significativamente a atividade total da nitrogenase medida através da técnica de redução de acetileno (ARA), como pode ser visto na Figura 11, tendo também provocado um aumento no número e na massa de nódulos (Figuras 12 e 13). Devido a esse aumento,

Figura 11 - Atividade total da nitrogenase em diferentes épocas de desenvolvimento do feijoeiro submetido a tratamentos com fungos MVA.

Figura 12. Influência de fungos MVA no número de nódulos de feijoeiro em diferentes épocas de desenvolvimento da planta.

Figura 13. Influência de fungos MVA no peso da matéria seca dos nódulos do feijoeiro em diferentes épocas de desenvolvimento da planta.

houve um grande acúmulo de fósforo nos nódulos dos tratamentos com fungo MVA (Figura 14). No entanto, a presença de fungo MVA não influenciou a percentagem de P nos nódulos (Tabela 9).

Como pode ser observado, no tratamento SMVA a formação de nódulos foi muito pequena, o que levou a uma baixa ARA. Esta baixa nodulação se deveu aos níveis de N mineral no solo que, como é sabido, inibem a FBN.

Pelos resultados obtidos, nota-se o benefício trazido pelos fungos MVA à FBN, que é devido principalmente ao aumento do número e da massa de nódulos, que conseqüentemente leva a uma maior ARA. Estes resultados são plenamente confirmados pela literatura (SMITH & DAFT, 1977; SMITH et alii, 1979; KUCEY & PAUL, 1982; KAWAI & YAMAMOTO, 1986).

Os resultados obtidos para os teores de fósforo no nódulo (Tabela 9, Figura 15) confirmam as conclusões de vários autores de que o processo FBN é extremamente exigente em fósforo (GRAHAM & ROSAS, 1979; BETHLENFALVAY & YODER, 1981; BONETTI et alii, 1984; SINGLETON et alii, 1985), pois o tecido nodular mantém concentrações de P extremamente elevadas quando comparado com as concentrações deste nutriente nas outras partes da planta (Tabelas 4 e 9).

A não alteração da concentração de P nos nódulos pela inoculação com fungo MVA também foi observada por SMITH et alii (1979) trabalhando com *Trifolium subterraneum* e JAKOBSEN (1985) trabalhando com *Pisum sativum*. O mesmo nao

Figura 14. Efeito de fungos MVA no acúmulo de fósforo nos nódulos do feijoeiro em diferentes épocas de desenvolvimento da planta.

ocorreu com a soja em experimento conduzido por KAWAI & YAMAMOTO (1986).

Fica claro pelos resultados que somente ocorreu fixação de nitrogênio devido à presença de fungos MVA.

No tratamento SMVA nota-se que as plantas apresentaram altos níveis de nitrogênio e baixos níveis de fósforo (Figuras 2 e 6), mostrando um aparente desequilíbrio entre os teores destes nutrientes. De fato, estes resultados têm grande semelhança com os apresentados por MALAVOLTA et alii (1974).

Assim sendo, no tratamento SMVA as plantas não foram capazes de utilizar o N acumulado por não terem absorvido quantidades adequadas de P, sendo que o excesso de N inibiu a nodulação e, conseqüentemente, a FBN.

Estes argumentos são fortalecidos pelo fato de que mesmo as plantas micorrizadas tiveram ARA muito pequena na 1ª amostragem (Figura 11), quando justamente apresentaram teores de N e P comparáveis às plantas do tratamento SMVA (Figuras 2 e 6).

A ARA no tratamento GL caiu drasticamente aos 44 DAE (Tabela 9, Figura 11). Este fato sugere que o pico da ARA no tratamento GL foi antecipado, não sendo captado porque não foram feitas amostragens entre os 35 DAE e os 44 DAE. A baixa atividade específica da nitrogenase (Tabela 9), aliada à baixa ARA, indicam que aos 56 DAE os nódulos no tratamento GL estavam praticamente inativos. Nos tratamentos NAT e NGL

Tabela 9. Influência dos fungos micorrízicos no número e no peso de nódulos, na percentagem e na quantidade de fósforo nos nódulos e nas atividades total e específica da nitrogenase nos nódulos de feijoeiro aos 56 DAE. Média de 6 repetições.

Tratamento	Nódulos/planta (nº)	Matéria seca (mg/planta)	Fósforo (%) ($\mu\text{g/planta}$)	Atividade total da nitrogenase ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$)	Atividade específica da nitrogenase ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g.h}$)
SMVA	15 c ¹	5,36 c	0,65 a	0,4 c	65,26 a
NAT	166 b	167,65 b	0,64 a	9,7 a	58,97 a
GL	202 ab	227,82 b	0,57 a	3,4 b	15,75 a
NGL	338 a	359,8 a	0,65 a	11,3 a	31,69 ab
CV(%)	27,1	42,1	11,6	30,0	41,3

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 15. Concentração de fósforo nos nódulos do feijoeiro em diferentes épocas de desenvolvimento da planta submetida a tratamentos com fungos MVA.

a atividade de redução de acetileno atingiu o pico entre os 44 DAE e os 56 DAE (Figura 11).

Esta diferença na época de máxima fixação de nitrogênio não resultou em benefícios para a planta aos 56 DAE, pois em todos os tratamentos com fungo MVA não houve diferença no acúmulo de nitrogênio (Figura 8).

Como pode-se observar na Figura 15, a presença de *G. leptotichum* provocou um aumento no número e na massa de nódulos no tratamento NGL. No entanto, isto não se traduziu num aumento significativo da atividade de redução de acetileno neste tratamento até os 56 DAE, quando comparado ao tratamento NAT. Assim sendo, não se poderia afirmar se esse aumento refletiria num maior acúmulo de nitrogênio e, conseqüentemente, em uma maior produção de matéria seca. Do mesmo modo, também não é possível avaliar se a queda antecipada da atividade de redução de acetileno no tratamento GL refletiria numa menor produção de matéria seca.

4.4. ATIVIDADE ESPECÍFICA DO P-32

Pela Tabela 10 nota-se que a atividade específica do P-32 não foi influenciada pelos tratamentos quando se considerou a planta inteira, as vagens e a palha. Na raiz, a atividade específica do P-32 foi significativamente menor em relação aos outros tratamentos. Nos nódulos, este parâmetro tendeu a ser maior no tratamento SMVA.

Na Tabela 11 pode-se observar que houve tendência geral da atividade específica do P-32 em ser menor no tratamento SMVA.

No entanto, deve ser levada em consideração uma fonte de fósforo não marcado que proporcionou menor atividade específica nesse tratamento, que é a semente. Considerando-se que uma semente de feijão variedade Carioca pesa em média 230 mg, e que tem um teor de P de 0,50%, tem-se um total de 1150 µg de P por semente. Considerando-se ainda que cerca de 65% do P da semente são aproveitados pela planta

Tabela 10. Atividade específica do P-32 nas diferentes partes da planta na última amostragem (56 DAE). Média de 6 repetições.

Tratamento	Palha	Raiz	Nódulos	Planta inteira
- - - - - (cpm/µg P) - - - - -				
SMVA	24, 97 a ¹	16,03 b	14,96 a	27,47 a
NAT	28,79 a	23,32 a	12,66 ab	28,63 a
GL	29,78 a	21,27 a	13,25 ab	29,57 a
NGL	28,46 a	24,46 a	11,44 b	27,52 a
CV(%)	11,9	12,2	12,3	10,4

¹Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 11. Atividade específica média do P-32 de todas as amostragens nas diferentes partes da planta.

Tratamento	Palha ¹	Raiz ¹	Nódulos ²	Planta Inteira ¹
- - - - - (cpm/ μ g P) - - - - -				
SMVA	26,0 b ³	17,9 b	13,7 a	24,6 b
NAT	30,4 a	24,5 a	13,7 a	28,6 a
GL	29,6 a	22,5 a	12,8 a	27,9 a
NGL	29,3 a	24,1 a	13,4 a	26,9 a
CV (%)	11,9	12,2	12,3	10,4

¹Média de 24 repetições;

²Média de 18 repetições;

³Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

(MURAOKA)¹, conclui-se que a planta utiliza cerca de 750 μ g de P não marcado provenientes da semente.

Ao subtrair do P total da planta o P proveniente da semente, calculando-se a atividade específica do P-32 corrigida, percebe-se que as diferenças entre os tratamentos diminuem consideravelmente (Tabela 12).

¹MURACKA, T. (Centro de Energia Nuclear na Agricultura-ESALQ/USP, Piracicaba) Comunicação Pessoal, 1987.

Portanto, diante das considerações feitas, pode-se constatar que a atividade específica do P-32 não é alterada pela presença de fungo micorrízico, o que está de acordo com os resultados obtidos por outros pesquisadores (HAYMAN & MOSSE, 1972 b; MOSSE et alii, 1973; POWELL, 1975; GIANINAZZI-PEARSON et alii, 1981).

Este fato nos permite afirmar que plantas micorrízicas e não micorrízicas utilizam-se das mesmas fontes de fósforo do solo.

Chama a atenção o fato de a atividade específica do P-32 nos nódulos ser tão mais baixa do que a das demais partes da planta, não havendo uma explicação razoável para isto. Poder-se-ia supor que exista uma relação direta entre a atividade específica do P-32 no solo e a atividade específica do P-32 nos nódulos. Assim sendo, a mineralização de fontes de P do solo provocaria uma diminuição na atividade específica do solo. Como a planta absorve P continuamente

Tabela 12. Atividade específica do P-32 corrigida aos 56 DAE.

Tratamento	cpm total	P total corrigido ($\mu\text{g P}$)	Atividade específica do P-32 corrigida (cpm/ $\mu\text{g P}$)
SMVA	125.538	3.820	32,9
NAT	415.994	13.780	30,2
GL	501.212	16.200	30,9
NGL	411.699	14.210	29,0

e os nódulos são ávidos por este nutriente, a diminuição na atividade específica do P-32 no solo refletiria de imediato nos nódulos. Isto seria possível se o fósforo absorvido fosse diretamente para os nódulos, sem sofrer um processo de translocação pela planta.

4.5. DISTRIBUIÇÃO DO P-32 NA PLANTA

Devido à marcação do solo com P-32 foi possível acompanhar a distribuição deste nutriente nas diversas partes da planta durante o desenvolvimento do feijoeiro.

Pela Figura 16 nota-se que existiu uma ordem de preferência na distribuição do fósforo na planta. Aos nódulos foi destinada uma quantidade proporcionalmente maior deste nutriente, quando comparados com as outras partes da planta. Este fato está relacionado com a grande avidez de fósforo mostrada pelos nódulos (GRAHAM & ROSAS, 1979). Percebe-se ainda que, independentemente dos nódulos terem sido ou não funcionais, a planta destinou proporcionalmente mais P para eles do que para a palha e a raiz.

No tratamento SMVA o fósforo do solo foi distribuído equitativamente entre a palha e a raiz. Comparando-se este tratamento aos demais, nota-se que realmente a planta sem micorriza teve sua capacidade de absorção de fósforo do solo bastante diminuída.

Figura 16. Atividade do P-32 nas várias partes do feijoeiro em diferentes épocas de desenvolvimento da planta.

Entre os tratamentos com fungos MVA nota-se que no tratamento GL a distribuição de fósforo apresentou-se mais equilibrada entre a palha e os nódulos, sendo que proporcionalmente mais fósforo foi destinado à parte aérea do que nos demais tratamentos.

O maior desenvolvimento inicial (Figura 1) do feijoeiro neste tratamento talvez tenha sido um reflexo desse equilíbrio na distribuição de P.

Se o desequilíbrio entre os teores de N e P prejudicou o desenvolvimento das plantas no tratamento SMVA, uma maior concentração de P na parte aérea, em relação à raiz, talvez fosse favorável ao desenvolvimento das plantas, podendo ter inclusive reflexos na duração do seu ciclo.

A queda no teor de P-32 na palha e na raiz a partir dos 35 DAE para os tratamentos NAT, GL e NGL, mostra que as plantas haviam iniciado o processo de translocação de fósforo para as vagens que, como pode ser visto na Tabela 13, aos 56 DAE haviam concentrado grande parte deste nutriente.

No entanto, a queda no teor de P-32 nos nódulos não foi acompanhada por uma diminuição do fósforo total nesta parte da planta (Figura 14), existindo uma tendência de queda apenas no tratamento GL. A razão disto foi um efeito de diluição, pois proporcionalmente a massa de nódulos aumentou mais que o acúmulo de fósforo.

Tabela 13. Atividade do P-32 na unidade de peso da matéria seca nas diversas partes do feijoeiro aos 56 DAE. Média de 6 repetições.

Tratamento	Palha	Vagens	Raiz	Nódulos	Planta inteira
- - - - - (cpm/mg MS) - - - - -					
SMVA	26,3 b ¹	96,5 b	19,5 c	97,5 a	35,9 b
NAT	66,3 a	123,3 ab	50,8 ab	81,7 a	84,0 a
GL	71,9 a	148,0 a	40,2 b	73,8 a	80,7 a
NGL	65,7 a	120,2 ab	52,9 a	73,5 a	73,7 a
CV (%)	20,2	15,3	16,1	27,0	16,1

¹Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5. CONCLUSÕES

Nas condições específicas deste experimento, e com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

a) os fungos micorrízicos proporcionaram maior acúmulo de nitrogênio e fósforo no feijoeiro em todas as suas partes (parte aérea, raiz e nódulos);

b) os fungos micorrízicos foram indispensáveis ao estabelecimento de simbiose eficiente entre *Phaseolus vulgaris* L. e *Rhizobium phaseoli*, através do aumento do número e da massa de nódulos;

c) o fungo introduzido, *Glomus leptotrichum*, foi mais eficiente que os fungos nativos na absorção de fósforo do solo;

d) os feijoeiros micorrizados e não micorrizados utilizaram as mesmas fontes de fósforo do solo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist, London, 99: 245-55, 1985.
- ALMEIDA, R.T. de; FREIRE, V.P.; VASCONCELOS, I. Infecção de micorrizas vesículo-arbusculares em gramíneas e leguminosas herbáceas e arbustivas em dois solos do Estado do Ceará. Ciência Agronômica, Fortaleza, 16(1): 69-73, 1985.
- ASIMI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium* in soybeans. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 58:2200-5, 1980.
- AZCÓN-AGUILAR, C.G.; BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; OLIVARES, J. Effectiveness of *Rhizobium* and VA mycorrhiza in the introduction of *Hedysarum coronarium* in a new habitat. Agriculture and Environment, Amsterdam, 7: 199-206, 1982.

BAGYARAJ, D.J. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.J., ed. VA mycorrhiza. Boca Raton, CRC Press, 1984. p. 131-52.

BAREA, J.M. & AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. Advances in Agronomy, New York, 36: 1-54, 1983.

BAREA, J.M.; ESCUDERO, J.L.; AZCÓN-AGUILAR, C.G. Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate-fixing soils as affected by P fertilizers. Plant and Soil, The Hague, 54: 283-96, 1980.

BETHLENFALVAY, G.J.; BROWN, M.S.; PACOVSKY, R.S. Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: development of the host plant. Phytopathology, St. Paul, 72: 889-93, 1982a.

BETHLENFALVAY, G.J.; BROWN, M.S.; PACOVSKY, R.S. Relationships between host and endophyte development in mycorrhizal soybeans. New Phytologist, London, 90: 537-43, 1982b.

BETHLENFALVAY, G.J.; PACOVSKY, R.S.; BROWN, M.S. Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: development of the endophyte. Phytopathology, St. Paul, 72: 894-7, 1982c.

- BETHLENFALVAY, G.J. & YODER, J.F. The *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 52: 141-5, 1981.
- BHAT, K.K.S. & NYE, P.H. Diffusion of phosphate to plant roots in soil. I. Quantitative autoradiography of the depletion zone. Plant and Soil, The Hague, 38: 161-75, 1973.
- BIELESKI, R.L. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 24: 225-52, 1973.
- BONETTI, R. Efeito de micorrizas vesiculares arbusculares na nodulação, crescimento e absorção de fósforo e nitrogênio em siratro. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 8(3): 189-92, 1984.
- BONETTI, R.; MONTANHEIRO, M.N.S.; SAITO, S.M.T. The effects of phosphate and soil moisture on the nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris*. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 103: 95-102, 1984.

BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae.

In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.J., ed. VA mycorrhiza.

Boca Raton, CRC Press, 1984. p. 5-33.

BOWEN, G.D.; BEVEGE, D.I.; MOSSE, B. Phosphate physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizas. In: SANDERS, F.E.;

MOSSE, N.; TINKER, P.B., ed. Endomycorrhizas. London, Academic Press, 1975. p. 241-60.

CARLING, D.E.; RIEHLE, W.G.; BROWN, M.F.; JOHNSON, S.R.

Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on nitrate reductase and nitrogenase activities in nodulating and non-nodulating soybeans. Phytopathology, St. Paul, 68: 1590-6, 1978.

CLARKSON, D.T. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 36: 77-115, 1985.

COX, G. & TINKER, P.B. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer: a quantitative ultrastructural study. New Phytologist, London, 77: 371-8, 1976.

DAFT, M.J. Nitrogen fixation in nodulated and mycorrhizal crop plants. Annals of Applied Biology, London, 88(3): 461-2, 1978.

DAFT, M.J. & EL-GIAHMI, A.A. Effect of *Endogone* mycorrhiza on plant growth. VII. Influence of infection on the growth and nodulation in french bean (*Phaseolus vulgaris*). New Phytologist, London, 73: 1139-47, 1974.

DAFT, M.J. & EL-GIAHMI, A.A. Effects of *Glomus* infection on three legumes. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P. B., ed. Endomycorrhizas. London, Academic Press, 1975. p. 581-92.

DAFT, M.J. & EL-GIAHMI, A.A. Studies on nodulated and mycorrhizal peanuts. Annals of Applied Biology, London, 83: 273-6, 1976.

DAVIS, E.A.; YOUNG, J.L.; ROSE, S.L. Detection of high-phosphates tolerant VAM-fungi colonizing hops and peppermint. Plant and Soil, The Hague, 81: 29-36, 1984.

DIEM, H.G.; GUEYE, M.; DOMMERGUES, Y. The development of extraradical hyphae in relation to the response of cowpea to VA mycorrhizal infection. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAE, 1., Dijon, 1985. Proceedings. Paris, Institut National de la Recherche Agronomique, 1986. p. 227-32.

- EL-HASSANIN, A.S. & LYND, J.Q. Soil fertility effects with tripartite symbiosis for growth, nodulation and nitrogenase activity of *Vicia faba* L. Journal of Plant Nutrition, New York, 8(6): 491-504, 1985.
- FLOOR, J. Report on a pot experiment on *Rhizobium* inoculation and fertilizer application of beans (*Phaseolus vulgaris*). Thika, National Horticultural Research Station, Grain Legume Project, 1982. 14 p. (Internal Report). Apud Resúmenes Analíticos Sobre Frijol, Cali, 10(2): 103-4, 1985.
- FONSECA, S.M. Fixação biológica de N_2 e absorção de ^{15}N mineral em variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, 1985. 109 p. [Mestrado-ESALQ]
- GANRY, F.; DIEM, H.G.; DOMMERGUES, Y.R. Effect of inoculation with *Glomus mosseae* on nitrogen fixation by field grown soybeans. Plant and Soil, The Hague, 68: 321-9, 1982.
- GIANINAZZI-PEARSON, V.; FARDEAU, J.C.; ASIMI, S.; GIANINAZZI, S. Source of additional phosphorus absorbed from soil by vesicular-arbuscular mycorrhizal soybeans. Physiologie Végétale, Paris, 19(1): 33-43, 1981.

- GIANINAZZI, S.; DEXHEIMER, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.;
MARX, C. Role of the host-arbuscule interface in the
VA mycorrhizal symbiosis: ultracytological studies of
processes involved in phosphate and carbohydrate
exchange. Plant and Soil, The Hague, 71: 211-5, 1983.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for
measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in
roots. New Phytologist, London, 84: 489-500, 1980.
- GODSE, D.B.; WANI, S.P.; PATIL, R.B.; BAGYARAJ, D.J.
Response of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to
Rhizobium - VA mycorrhiza dual inoculation. Current
Science, Bangalore, 47(20): 784-5, 1978.
- GRAHAM, P.H. & ROSAS, J.C. Phosphorus fertilization and
symbiotic nitrogen fixation in common bean. Agronomy
Journal, Madison, 71: 925-6, 1979.
- GRAY, L.E. & GERDEMANN, J.W. Influence of vesicular-arbus-
cular mycorrhizas on the uptake of phosphorus-32 by
Liriodendron tulipifera and *Liquidambar styraciflua*.
Nature, London, 213: 106-7, 1967.

- GRAY, L.E. & GERDEMANN, J.W. Uptake of phosphorus-32 by vesicular-arbuscular mycorrhizae. Plant and Soil, The Hague, 30(3): 415-22, 1969.
- GUADRON, O.B. Efecto de la época de aplicación de fósforo en los rendimientos de cuatro cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Bogotá, 1985. 112 p. [MS-Universidad Nacional]. Apud Resúmenes Analíticos Sobre Frijol, Cali, 11(1): 23-4, 1986.
- GUAZELLI, R.J. A pesquisa do feijão no Brasil. Situação atual e perspectivas. In: CURSO DE PRODUÇÃO DE FEIJÃO, 2., Goiânia, 1983. Goiânia, EMBRAPA-CNPAF/CIAT, 1983. 46 p.
- HAAG, H.P.; MALAVOLTA, E.; GARGANTINI, H.; BLANCO, H.G. Absorção de nutrientes pela cultura do feijoeiro. Bragantia, Campinas, 26(30): 381-91, 1967.
- HALL, I.R. Effect of inoculant endomycorrhizal fungi on white clover growth in soil cores. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 102: 719-23, 1984.
- HALOS, P.M.; LUIS, E.M.; BORJA, M.S. Synergism between endomycorrhizas, *Rhizobium japonicum* CB 1809 and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Philippine Agriculturist, Laguna, 65: 93-102, 1982.

HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C.

The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiology, Bethesda, 43: 1185-207, 1968.

HARLEY, J.L. Mycorrhizal studies: past and future. In:

EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAE, 1., Dijon, 1985.

Proceedings. Paris, Institut National de la Recherche Agronomique, 1986. p. 25-33.

HATTINGH, M.J.; GRAY, L.E.; GERDEMANN, J.W. Uptake

and translocation of ^{32}P - labeled phosphate to onion roots by endomycorrhizal fungi. Soil Science, Baltimore, 116(5): 383-7, 1973.

HAYMAN, D.S. Mycorrhiza and crop production. Nature, London, 287: 487-8, 1980.

HAYMAN, D.S. Mycorrhizae of nitrogen-fixing legumes. MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Oxford, 2: 121-45, 1986.

HAYMAN, D.S. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 61: 944-63, 1983.

HAYMAN, D.S. & MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Increased uptake of labile P from soil. New Phytologist, London, 71: 41-7, 1972a.

HAYMAN, D.S. & MOSSE, B. The role of vesicular-arbuscular mycorrhiza in the removal of phosphorus from soil by plant roots. Revue d'Écologie et de Biologie du Sol, Paris, 9(3): 463-70, 1972b.

HOLLEY, J.D. & PETERSON, R.L. Development of a vesicular-arbuscular mycorrhiza in bean roots. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 57: 1960-78, 1979.

INFORZATO, R. Sistema radicular do feijoeiro em dois tipos de solo do Estado de São Paulo. Bragantia, Campinas, 22(38): 477-81, 1963.

JAKOBSEN, I. The role of phosphorus and VA-mycorrhiza in nitrogen fixation and dry matter production by *Pisum sativum*. Copenhagen, 1985. 127 p. [Lic. Scient.-University of Copenhagen]

JAKOBSEN, I. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in field-grown crops. III. Mycorrhizal infection and rates of phosphorus inflow in pea plants. New Phytologist, London, 104: 573-81, 1986.

- JONES, F.R. A mycorrhizal fungus in the roots of legumes and some other plants. Journal of Agricultural Research, Washington, 29(9): 459-70, 1924.
- KARUNARATNE, R.S.; BAKER, J.H.; BARKER, A.V. Phosphorus uptake by mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of soybean. Journal of Plant Nutrition, New York, 9(10): 1303-13, 1986.
- KAWAI, Y. & YAMAMOTO, Y. Increase in the formation and nitrogen fixation of soybean nodules by vesicular-arbuscular mycorrhiza. Plant and Cell Physiology, Tokyo, 27(3): 399-405, 1986.
- KUCEY, R.M.N. & PAUL, E.A. Carbon flow, photosynthesis, and N_2 fixation in mycorrhizal and nodulated faba beans (*Vicia faba* L.). Soil Biology & Biochemistry, Oxford, 14: 407-12, 1982.
- LARUE, A. & PATTERSON, T.G. How much nitrogen do legumes fix? Advances in Agronomy, New York, 34: 15-38, 1981.
- LEWIS, D.H. Comparative aspects of the carbon nutrition of mycorrhizas. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P. B., ed. Endomycorrhizas. London, Academic Press, 1975. p. 119-48.

- LOPES, A.S. Solos sob "cerrado ": características, propriedades e manejo. Piracicaba, Instituto da Potassa & Fosfato, Instituto Internacional da Potassa, 1983. 162 p.
- LOWE, D.J.; POSTGATE, J.R.; THORNELEY, R.N.F. Biochemical constraints on biological nitrogen fixation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF NITROGEN AND THE ENVIRONMENT, Lahore, 1984. Proceedings. Faisalabad, NIAB, 1985. p. 73-91.
- MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1980. 254 p.
- MALAVOLTA, E.; HAAG, H.P.; MELLO, F.A. F. de; BRASIL SOBRINHO, M.O.C. Nutrição mineral e adubação de plantas cultivadas. São Paulo, Pioneira, 1974. 752 p.
- MALAVOLTA, E. & KLIEMANN, H.J. Desordens nutricionais no cerrado. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1985. 136 p.
- MALAVOLTA, E.; PAZ, L.G. da; RUSCHEL, A.P. Mineral nutrition and nitrogen fixation in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). In: INTERNATIONAL PLANT NUTRITION COLLOQUIUM, 9., London, 1982. Proceedings. Farnham Royal, Commonwealth Agricultural Bureaux, 1982. v. 2, p. 746-50. Apud Resúmenes Analíticos Sobre Frijol, Cali, 10(1) : 16-7, 1985.

MANJUNATH, A.; BAGYARAJ, D.J.; GOWDA, H.S.G. Dual inoculation with VA mycorrhiza and *Rhizobium* is beneficial to *Leucaena*. Plant and Soil, The Hague, 78: 445-8, 1984.

MORRISON, T.M. Mycorrhiza and phosphorus uptake. Nature, London, 179: 907-8, 1957.

MORRISON, T.M. Uptake of phosphorus-32 by mycorrhizal plants. Nature, London, 174: 606-7, 1954.

MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza.X. Responses of *Stylosanthes* and maize to inoculation in unsterile soils. New Phytologist, London, 78: 277-88, 1977.

MOSSE, B. Vesicular-arbuscular mycorrhiza research for tropical agriculture. Honolulu, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, 1981. 82 p. (Research Bulletin, 194)

MOSSE, B.; HAYMAN, D.S.; ARNOLD, D.J. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza.V. Phosphate uptake by three plant species from P-deficient soils labelled with ^{32}P . New Phytologist, London, 72: 809-15, 1973.

NYE, P.H. & TINKER, P.B. Solute movement in the soil-root system. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1977. 342 p. (Studies in Ecology, v. 4)

OLIVEIRA, E. de. Taxonomia da Endogonaceae. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1., Lavras, 1985. Anais. Lavras, FAEPE, 1986. p. 100-19.

OWUSU-BENNOAH, E. & WILD, A. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the size of the labile pool of soil phosphate. Plant and Soil, The Hague, 54: 233-42, 1980.

PHILIP, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, London, 55: 158-61, 1970.

POWELL, C.L. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VIII. Uptake of P by onion and clover infected with different *Endogone* spore types in ^{32}P labelled soils. New Phytologist, London, 75: 563-6, 1975.

POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.J. VA-mycorrhizae: why all the interest? In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.J., ed. VA mycorrhiza. Boca Raton, CRC Press, 1984. p.1-3.

- REDENTE, E.F. & REEVES, F.B. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* and their effect on sweetvetch growth. Soil Science, Baltimore, 132(6): 410-5, 1981.
- RHODES, L.H. & GERDEMANN, J.W. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. New Phytologist, London, 75: 555-61, 1975.
- ROSE, S.L. & YOUNGBERG, C.T. Tripartite associations in snowbrush (*Ceanothus velutinus*): effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth, nodulation, and nitrogen fixation. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 59: 34-9, 1981.
- RUSCHEL, A.P. & RUSCHEL, R. Avaliação da fixação simbiótica de nitrogênio em feijão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 10: 11-7, 1975.
- RUSCHEL, 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, The Hague, 65: 397-407, 1982.

SAITO, S.M.T. The nitrogen relationships of maize/bean association. In: GRAHAM, P. & HARRIS, S.C., ed. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. p.631-9.

SAITO, S.M.T.; MARTINS, E.C.S.; FREITAS, J.R. de; ROSTON, A.J. Ocorrência natural de micorriza e *Rhizobium phaseoli* em áreas com feijoeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 18(8): 855-61, 1983.

SAITO, S.M.T. & RUSCHEL, A.P. Influência da calagem, adubação fosfatada e micronutrientes na nodulação natural do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 35: 545-56, 1978.

SÁNCHEZ, A.C.; ESCOBAR, R.N.; ECHEGARAY, A.A. Efecto de la fertilización con N, P, Mo, Co y Fe y del manejo de dos cepas de inoculante (*Rhizobium phaseoli*) sobre la nodulación, acumulación de N y rendimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Agrociencia, Chapingo, 27: 79-94, 1978.

SANDERS, F.E. & TINKER, P.B. Mechanism of absorption of phosphate from soil by *Endogone* mycorrhizas. Nature, London, 233: 278-9, 1971.

- SILVEIRA, A.P.D. da & CARDOSO, E.J.B.N. Efeito do fósforo e da micorriza vesículo-arbuscular na simbiose *Rhizobium*-feijoeiro. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 11(1): 31-6, 1987a.
- SILVEIRA, A.P.D. da & CARDOSO, E.J.B.N. Influência do tipo de solo e do fungo micorrízico vesículo-arbuscular no desenvolvimento de três cultivares de feijão. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 11(1): 37-43, 1987b.
- SINGLETON, P.W.; ABDELMAGID, H.M.; TAVARES, J.W. Effect of phosphorus on the effectiveness of strains of *Rhizobium japonicum*. Soil Science Society of America Journal, Madison, 49: 613-6, 1985.
- SKUJINS, J. & ALLEN, M.F. Use of mycorrhizae for land rehabilitation. MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Oxford, 2: 161-76, 1986.
- SMITH, S.E. & DAFT, M.J. Interactions between growth, phosphate content and nitrogen fixation in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Medicago sativa*. Australian Journal of Plant Physiology, Melbourne, 4: 403-13, 1977.

- SMITH, S.E.; NICHOLAS, D.J.D.; SMITH, F.A. Effect of early mycorrhizal infection on nodulation and nitrogen fixation in *Trifolium subterraneum* L. Australian Journal of Plant Physiology, Melbourne, 6: 305-16, 1979.
- SMITH, S.S.E. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. Biological Reviews, Cambridge, 55: 475-510, 1980.
- TEIXEIRA, S.M. Conjuntura econômica da produção de feijão no Brasil. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 2., Goiânia, 1987. Resumos. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, 1987. n.27.
- THOMAS, G.W.; CLARKE, C.A.; MOSSE, B.; JACKSON, R.M. Source of phosphate taken up from two soils by mycorrhizal (*Thelophora terrestris*) and non-mycorrhizal *Picea sitchensis* seedlings. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, 14: 73-5, 1982.
- THUNG, M.; ORTEGA, J.; ERAZO, O. Tamizado para identificar frijoles adaptados a suelos acidos. In: LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; VAN SCHOONHOVEN, A., ed. Frijol: investigación y producción. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1985. p.313-46.

- TINKER, P.B. Role of rhizosphere microorganisms in phosphorus uptake by plants. In: KHASAWNEH, F.E.; SAMPLE, E.C.; KAMPRATH, E.J., ed. The role of phosphorus in agriculture. Madison, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1980. p.617-54.
- TINKER, P.B. Soil chemistry of phosphorus and mycorrhizal effects on plant growth. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B., ed. Endomycorrhizas. London, Academic Press, 1975. p.353-71.
- VASCONCELLOS, I.; ALMEIDA, R.T. de; MENDES FILHO, P.F. Ocorrência de rizóbios e endomicorrizas em leguminosas arbóreas e arbustivas do Estado do Ceará, Brasil. Ciência Agronômica, Fortaleza, 15(1/2): 45-52, 1984.
- ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; REIS, B.F.; KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; PESSENDA, L.C.R.; MORTATTI, J.; GINÉ, M.F. Manual de análises de plantas e águas empregando sistemas de injeção em fluxo. Piracicaba, Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 1981. 45p.
- ZAMBOLIM, L.; OLIVEIRA, A.A.R.; RIBEIRO, A.C. Efeito da infecção por fungos micorrízicos do tipo vesicular-arbuscular sobre o desenvolvimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Ceres, Viçosa, 32(181): 252-8, 1985.

ZAMBOLIM, L. & SIQUEIRA, J.O. Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura. Belo Horizonte, EPAMIG, 1985. 36p. (Documentos, 26)