

FISIOLOGIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM SOJA - REVISÃO

FISIOLOGY OF BIOLOGIC FIXATION NITROGEN IN SOYBEAN - A REVIEW

Evandro Binotto Fagan¹; Sandro L. P. Medeiros², Paulo A. Manfron², Derblai Casaroli¹;
Jones Simon¹; Durval Dourado Neto ³; Quirijn de Jong van Lier⁴; Osmar S. Santos²; Liziany
Müller⁵

RESUMO

Os processos fisiológicos envolvendo fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja são bastante complexos, com diversas interações entre a planta e a bactéria fixadora. A eficiência da nodulação é mediada por fatores internos (fitohormônios e disponibilidade de fotoassimilados) e externos como temperatura radicular, teor de oxigênio no nódulo, disponibilidade hídrica, disponibilidade de nutrientes, que necessitam ser melhor compreendidos num sistema de cultivo, quando se busca alta produtividade e baixo custo. Por se tratar de processo dispendioso para a planta, alguns estudos mostram aumento de produtividade quando o nitrogênio é adicionado através de adubação. Entretanto, ainda existem controvérsias a esse respeito, sendo assim, é necessário a compreensão do efeito da adubação nitrogenada na fisiologia da planta, a fim de buscar equilíbrio entre a adição de N e a fixação biológica.

Palavras-chave: *Glycine max*, L., nodulação, produtividade, rizóbio

ABSTRACT

The agreement of the physiological processes involving biological nitrogen setting in the culture of the soybean is sufficiently complex, and involves diverse interactions between the plant and the fixing bacterium. The efficiency of the nodulation is mediated by internal

1. Eng. Agr. Doutorando, Pós Graduação, Agronomia. ESALQ-USP, E-mail: evbinotto@yahoo.com.br

2. Eng. Agr, Dr, Prof. Departamento de Fitotecnia, UFSM.

3. Eng. Agr. Dr, Prof. Associado, Dpto de Produção Vegetal. ESALQ-USP.

4. Prof. Associado, Dr, Prof. Associado, Ciências Exatas. ESALQ-USP.

5. Zootecnista, Pós Graduação em Agronomia, UFSM. Bolsista CNPq.

factors (hormone and availability of fotoassimilates) and external as temperature to root, rate of oxygen in the nodule, water availability, availability of nutrients, among others that they must better be understood in a culture system, when if it search's high yield and low cost. For if dealing with a cost process for the plant, some studies show productivity increase when the nitrogen is added through fertilization. However, still controversies to this respect exist, being thus, are necessary the understanding of the effect of the fertilization nitrogen in the physiology of the plant involving the nodulation in order to search a balance enter the addition of N and the biological setting.

Key words: *Glycine max*, L., nodulation, yield

INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre (em torno de 70%). Nas plantas é componente responsável por várias reações além de fazer parte da estrutura da clorofila, de enzimas e proteínas. Por ser elemento essencial, seu balanço afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e translocação de fotoassimilados e a taxa de crescimento entre folhas e raízes, sendo o crescimento foliar primeiramente afetado (RYLE *et al.*, 1979; TAIZ & ZIEGER, 2004;). A consequência disso é a diminuição do crescimento das plantas e da produtividade.

A disponibilização de nitrogênio para as culturas pode ocorrer de formas diferenciadas de acordo com a espécie vegetal. Este nutriente pode ser absorvido do solo na forma de NH_4^+ ou de NO_3^- ou através do N_2 atmosférico pela fixação biológica. Nas leguminosas o N é absorvido

na forma de N_2 e transformado em NH_4 através do processo simbiótico com bactérias (GERAHTY *et al.*, 1992; TAIZ & ZIEGER, 2004). Um caso típico desta associação é a simbiose entre leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Photorhizobium*, *Sinorhizobium* (TAIZ & ZIEGER, 2004).

Dentro destes gêneros existem várias estirpes vendidas comercialmente. Conforme CHUEIRE *et al.* (2003), as estirpes mais utilizadas na cultura da soja no Brasil são: SEMIA 587 e SEMIA 5019 (= 29 w) pertencentes à espécie *Bradyrhizobium elkanii* e SEMIA 5079 (=CPAC 15) e SEMIA 5080 (=CPAC 7) pertencentes à espécie *Bradyrhizobium japonicum*.

De acordo com SMITH & HUME (1987) a associação do *Bradyrhizobium japonicum* com a soja (*Glycine max* L. Merrill) pode resultar numa fixação de nitrogênio de até 102,9 kg de $\text{N} \cdot \text{ha}^{-1}$.

Segundo DÖBEREINER (1997) os produtores brasileiros aplicam menos de 6% do nitrogênio necessário para a soja, sendo grande parte, fixado a partir do N₂ da atmosfera, o que equivale a 150 milhões de toneladas de nitrogênio. O autor considera que a fixação biológica de nitrogênio traz uma economia financeira de 3,2 bilhões de dólares.

Em vista disso, o entendimento do processo fisiológico de fixação biológica do nitrogênio e de fatores que o controlam é de suma importância tanto para pesquisadores como para produtores, pois com esse conhecimento é possível adequar o manejo da planta visando aumentar a eficiência de utilização de N e incrementar a produtividade da cultura.

NODULAÇÃO: ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS

A fixação biológica do N envolve uma sucessão de processos que começam com a adaptação da bactéria à planta e culminam na fixação do N₂ atmosférico. A nodulação ocorre aproximadamente 2 h após o contato da bactéria com as raízes. Os nódulos primários se desenvolvem em regiões de alongamento e nas zonas de formação de pequenos pêlos radiculares, considerada a região preferencial para a infecção da bactéria fixadora (BHUVANESWARI *et al.*, 1980).

O processo de infecção pelo rizóbio envolve diferentes agentes sinalizadores entre a planta e a bactéria (GERAHTY *et al.*, 1992; TIMMERS *et al.*, 1999; TAÍZ & ZIEGER, 2004;). O modelo proposto por TIMMERS *et al.* (1999) relata que a bactéria noduladora migra em direção as raízes em função de uma resposta quimiostática (Figura 1). Essa resposta é decorrente da atração pelos isoflavonóides e betaínas secretadas pelas raízes, esses atrativos para as bactérias, ativam enzimas, a quais induzem a transcrição de genes *nod*, estes genes codificam moléculas sinalizadoras de oligossacarídeos de lipoquitina. A planta hospedeira apresenta receptores que parecem ser lecitinas especiais produzidas nos pêlos radiculares. Durante o contato as células dos pêlos liberam fatores de nodulação (Nod) causando seus enrolamentos (Figura 1). Com a evolução da infecção é formado um canal dentro do pêlo radicular, enquanto que no periciclo é iniciado o rearranjo do citoesqueleto microtubular, posteriormente acontece ativação das células na parte interna do córtex, as quais se dividem formando um primórdio. Logo após, nos pêlos radiculares ocorre a infecção, localizada distanciadamente da área radicular ativada. A ativação celular se estende progressivamente para o meio e a parte mais externa do córtex de acordo com

dois gradientes de diferenciação celular, resultando na formação de um primórdio nodular.

Para entender melhor como ocorre o crescimento e desenvolvimento do nódulo GERAHTY *et al.* (1992) explicam, de forma cronológica, como acontece a alteração anatômica nas raízes de soja após a infecção, quando são iniciados divisões celulares dentro e fora do córtex radicular gerando nódulos meristemáticos onde ocorrem sucessivas divisões mitóticas. Esses processos foram explicados de forma cronológica através de estágios de crescimento e desenvolvimento nodular (Figura 2). O estágio 0 corresponde à raiz não infectada, estágio I - início da infecção, estágio II - células corticais externas começam a se dividir, estágio III - a divisão é evidente no córtex interno e algumas células do córtex externo, estágio IV - as células são mais isodiamétricas e apresentam algumas divisões oblíquas externamente e internamente no córtex, formando um meristema nodular, estágio V - o meristema é aumentado e estágio VI - emergência do nódulo (Figura 2).

Durante o crescimento do nódulo as bactérias internalizadas são liberadas para produzir infecções no citoplasma, elas começam a se dividir e a membrana que as envolve aumenta em superfície para acomodar esse crescimento pela fusão com

vesículas menores (GERAHTY *et al.*, 1992; TIMMERS *et al.*, 1999). No estágio de crescimento V, ocorre controle na expansão do nódulo (Figura 2), considerado um mecanismo de auto-regulação, situação que conduz a maturidade do nódulo. Nesse momento as bactérias param de se dividir e começam a aumentar em tamanho e a se diferenciar em organelas endossimbióticas fixadoras de N denominadas de bacteróides (estágio VI, Figura 2), a membrana que o envolve chama-se de peribacteróide, que desenvolve sistema vascular semelhante ao das plantas, que facilitaria a troca de N fixado pelos bacteróides por nutrientes disponibilizados pela planta (TAÍZ & ZIEGER, 2004).

HORMÔNIOS E MECANISMOS DE CONTROLE

Os níveis de auxinas, citocininas e etileno estão associados à nodulação em leguminosas e possuem efeito regulatório pronunciado na divisão e expansão celular (SCHIMIDT *et al.*, 1999; NUKUI *et al.*, 2000; FEI & VESSEY, 2004). A divisão celular é modulada pelo gradiente de auxinas e citocininas, promovendo o desenvolvimento do nódulo. Todos esses processos são influenciados por fitohormônios e inibidores da parte aérea (ANOLLÉS, 1997).

Durante a infecção o rizóbio promove inibição temporária no transporte de auxina, causando seu acúmulo na região do nódulo. A regulação é feita através das lipoquitinas e oligosacarídeos induzidas pela ação deste fitohormônio. De modo geral as lipoquitinas e oligosacarídeos perturbam o fluxo da auxina na raiz durante o início da nodulação, fluxo que seria mediado por flavonóides endógenos (MATHESIUS & SCHLAMMAN, 1998).

De acordo com FEI & VESSEY (2004) elevados níveis de citocinina estão associados com aumento na nodulação, enquanto que baixos níveis são correlacionados com aumento de N no solo. Entretanto os níveis de auxinas mostram declínio após o início da nodulação, mas com incremento subsequente.

O etileno é sintetizado na região do periciclo da raiz difundindo-se para o córtex, onde bloqueia a divisão celular no lado oposto do floema da raiz (SCHIMIDT *et al.*, 1999; NUKUI *et al.*, 2000; TAÍZ & ZIEGER, 2004). Em função da diferente resposta de algumas espécies de leguminosas ao etileno, SCHIMIDT *et al.* (1999) sugeriram uma classificação em dois grupos: as espécies em que a nodulação é inibida pelo etileno (*Medicago sativa* e *Pisum sativum*) e as insensíveis ao etileno as quais incluem a soja. NUKUI *et al.* (2000) observaram que o etileno serve

como ponto regulatório na nodulação de *Lotus japonicus* e *Macroptilium atropurpureum*, onde o aumento da concentração de etileno na bainha vascular inibe a formação de nódulos. Segundo os autores a habilidade da bactéria em produzir um inibidor da síntese de etileno permite maior nodulação nestas espécies de leguminosas. Já para a soja o aumento na produção de etileno favorece a nodulação, comportamento inverso às demais espécies.

SAGANUMA *et al.* (1995) afirmam que a produção de etileno em plantas de soja inoculadas com rizóbio aumenta devido a resposta da planta ao rizóbio. Entretanto, o etileno produzido não está correlacionado com a produção de nódulos pela planta, concordando com as literaturas citadas.

O efeito da parte aérea e sistema radicular sobre a nodulação de soja foram avaliados por SHENG & HARPER (1997), os quais constataram que as folhas são órgãos que dominam a regulação da produção de sinal para nodulação em soja, sendo que, durante o crescimento vegetativo inicial, o número de nódulos não sofre ação desses fatores. Os autores ainda sugerem que dois tipos de sinais, um inibidor e o outro promotor podem estar envolvidos no número de nódulos por planta mediante processo de feedback, onde a comunicação de sinal pode ocorrer entre

raiz e parte aérea. KING & PURCELL (2005), afirmam que o acúmulo de ureídeos e aspartato na folha são os principais fatores responsáveis pelo mecanismo inibitório da parte aérea. Neste caso ocorre a inibição na fixação de nitrogênio no nódulo, uma vez que estes não são exportados para as raízes.

FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO NO NÓDULO

Na fixação biológica, o N_2 é transformado em NH_3 a custas de energia da planta (BURRIS, 1999; TAÍZ & ZIEGER, 2004). O complexo enzima nitrogenase formado por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína) são responsáveis pela fixação de nitrogênio no nódulo (BURRIS, 1999; MYLONA et al., 1995; TAÍZ & ZIEGER, 2004).

Para que ocorra a fixação biológica de nitrogênio é necessário que a nitrogenase se encontre em condições anaeróbicas. Os nódulos possuem uma heme proteína chamada de leghemoglobina que se liga ao oxigênio e que está presente em altas concentrações nos nódulos. A planta produz a porção globina em resposta a infecção da bactéria, tendo esta proteína uma alta afinidade por O_2 . Tanto a leghemoglobina como a barreira de difusão de oxigênio no nódulo são reguladores importantes na tensão de oxigênio no nódulo protegendo o

complexo enzima nitrogenase que é irreversivelmente inativado pelo oxigênio (MYLONA et al., 1995).

De acordo com DENINSON & HARTER (1995) a leghemoglobina é um importante transportador de oxigênio para as células bacterianas, sendo capaz de armazenar O_2 suficiente para a manutenção da respiração celular por alguns segundos. Os autores ainda ressaltam que o suprimento de nitrogênio causa inibição da nitrogenase devido ao decréscimo da permeabilidade da membrana do nódulo ao oxigênio e pela redução afinidade da leghemoglobina pelo oxigênio.

Na reação de redução do N_2 a nitrogenase é auxiliada por uma enzima transportadora de elétrons, a ferredoxina, originária do fotossistema I da fase fotoquímica da fotossíntese. Na fixação biológica do nitrogênio a Ferro-proteína e a Molibdênio-Ferro-Proteína comandam as reações. A Ferro-proteína freqüentemente é reduzida por um doador de elétrons, a ferredoxina reduzida (Fd). A Ferro-proteína reduzida se liga com o magnésio ATP (Mg ATP) que recebe elétrons, estes são passados para outra enzima a molibdênio ATP (Mo ATP) e desta os elétrons são passados para o nitrogênio, transformando-o em NH_3 , este é liberado por difusão do bacterióide para o citosol da célula infectada (BURRIS, 1999; TAIZ & ZIEGER, 2004).

Depois de formado, o NH_3 em contato com o substrato aquoso do citoplasma dos bacteróides é transformado em NH_4 (TAÍZ & ZIEGER, 2004). O acúmulo de NH_4 inibe a fixação de nitrogênio dentro dos bacteróides, desta forma ele é transportado para interior da célula hospedeira, no centro do nódulo. Como o NH_4 também é prejudicial a célula devido a diminuição na formação do ATP e do transporte de elétrons na cadeia respiratória, ele é incorporado em moléculas que não possuam efeito tóxico. As enzimas glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) convertem o NH_4^+ em aminoácidos. A atividade destas enzimas aumenta durante o desenvolvimento dos nódulos e com o aumento na disponibilidade de energia (ATP) no meio de reação (SILVA, 1998; BURRIS, 1999). O principal meio de transporte de nitrogênio da soja dos nódulos para a parte aérea é na forma de ureídeos, além da aspargina (KING & PURCELL, 2005).

CUSTO ENERGÉTICO PARA FIXAÇÃO BIOLÓGICA

O processo de fixação biológica de nitrogênio é muito dispendioso, pois para cada elétron transferido da Fe-proteína para a MoFe-proteína são consumidos 2 ATPs. Para reduzir uma molécula de N_2 são

necessários oito elétrons e, portanto, 16 ATPs (TAÍZ & ZIEGER, 2004).

Estudos realizados por RYLE *et al.* (1979) mostravam elevado custo energético da fixação biológica à planta. O estudo baseou-se no custo respiratório da fixação de nitrogênio em soja, feijão e trevo branco e revelou que o aumento da respiração radicular coincidiu com o aumento da atividade de fixação de nitrogênio que atingiu o máximo durante o subperíodo de florescimento, decaindo posteriormente para todas as espécies. As plantas que fixaram nitrogênio consumiram em média de 11-13% mais carbono fixado por dia para a respiração em comparação com as plantas supridas por nitrogênio. Além disso, o processo de liberação de átomos de hidrogênio, ocorre simultaneamente sendo considerado uma perda de energia, os quais poderiam ser utilizados para a produção de amônia.

Além da energia necessária para a redução do nitrogênio é necessário o fornecimento de esqueletos carbônicos para a bactéria fixadora, constando assim de um gasto extra de energia metabólica. A sacarose produzida na fotossíntese é transportada até o nódulo radicular, ao entrar na célula sofre glicólise até a forma de fosfoenolpiruvato (PEP), que é transformado em oxalacetato pela a enzima PEP carboxilase. Este composto pode

seguir várias rotas metabólicas, uma das rotas é sua transformação em malato, que entra no ciclo de Krebs formando energia e α -ceto ácidos que são esqueletos carbônicos para formação de aminoácidos através da assimilação do NH_4^+ produzido pela nitrogenase, além da formação de aminoácidos estes esqueletos carbônicos serão utilizados pela nitrogenase para seu metabolismo (COKER & SCHUBERT, 1981; BROWN *et al.*, 1995). O oxalacetato pode seguir outra rota onde este se liga ao glutamato pela ação da enzima glutamato desidrogenase (GDH) formando o aspartato que reage com a glutamina produzida pela assimilação do NH_4^+ resultando na formação da aspargina, as custas de ATP. De acordo com BROWN *et al.* (1995), a entrada e saída de produtos no bacteróide pode se dar via apoplasto através de células do periciclo adjacente ou simplasto através de plasmodesmos.

RELAÇÃO ENTRE FISIOLOGIA, FENOLÓGIA E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

O início da nodulação na soja ocorre em V₂ (emergência do segundo trifólio) atingindo o auge em R₂ (pleno florescimento), depois decresce (LAWN & BRUN 1974; RYLE *et al.*, 1979), onde inicia processo intenso de remobilização do

N das partes vegetativas para os órgãos reprodutivos.

Conforme LAWN & BRUN (1974), a atividade da nitrogenase decresce no início da frutificação devido a competição por fotoassimilados com as vagens e sementes. Este comportamento pode limitar a disponibilidade de nitrogênio necessário para crescimento de grãos, devido ao inadequado suprimento de fotoassimilados para os nódulos (LAWN & BRUN 1974). IMSANDE & SCHMDT (1998) também ressaltam que a partir do estágio de desenvolvimento de vagens ocorre decréscimo da concentração de N na fração vegetativa da planta, nitrogênio que é remobilizado para as sementes e vagens. Isso mostra que no subperíodo reprodutivo o nitrogênio é carregado para o dreno mais forte da planta, que são os grãos e vagens, ocorrendo diminuição na fixação biológica do mesmo.

No final do ciclo as células nodulares da soja são degradadas, com remobilização de moléculas orgânicas para outras partes da planta. Este processo foi estudado por FARGEIX *et al.* (2004), com cultivar de soja Maple Arrow em casa de vegetação. Os resultados mostraram que a membrana do bacteróide foi degradada, concomitantemente com o aumento da isocitrato liase e malato sintetase, sendo assim, os autores sugeriram que o ciclo do

glioxilato é a forma encontrada pelas plantas para remobilizar o carbono obtido pela fotossíntese para outras partes da planta, que ainda se encontram em crescimento.

ADUBAÇÃO NITROGENADA E NODULAÇÃO

Em leguminosas, a adição de adubos nitrogenados tem efeito adverso na fixação biológica devido a diminuição de disponibilidade de oxigênio na respiração nodular (DENINSON & HARTER, 1995) e a limitação de carboidratos ao metabolismo do nódulo (STEFENS & NEYRA, 1983). Estudos realizados por STEFENS & NEYRA (1983) mostraram que a adição de nitrogênio a plantas de soja na forma de KNO₃ decresce a atividade da nitrogenase em mais de 50%. Isso ocorre porque o nitrato e o nitrito acumulados a nível nodular inibem a fixação de nitrogênio devido a diminuição da disponibilidade de energia ao bacteróide. Entretanto, se a planta apresentar um suprimento de sacarose para os nódulos, a atividade da nitrogenase é incrementada devido ao decréscimo no nível de nitrito acumulado nos mesmos.

THIES *et al.* (1995), estudando a fenologia, crescimento e produção de soja e feijão em função de formas de nutrição mineral, observaram efeito marcante da

adição de N na produção de fitomassa de soja. Os autores observaram diferença na duração dos estágios fenológicos da soja em função dos tratamentos. O estágio R₄ apresentou maior duração nos tratamentos com suprimento de nitrogênio, mostrando assim um período mais longo de enchimento de grãos. Em média o tratamento com adubação nitrogenada atrasou 10 dias em relação a testemunha sem inoculação e sem N. Segundo os autores, a falta de N é um fator que acelera a maturação da soja. Em relação ao acúmulo de fitomassa seca o tratamento com suprimento de nitrogênio apresentou superioridade de 29% em relação a testemunha durante o estágio R₂. A produção foliar foi de 22-40% maior nas plantas inoculadas em relação a testemunha, mas 5-14% menor do que as adubadas com nitrogênio. A diminuição da produção, em função da não aplicação de nitrogênio, é ressaltada pelos autores como sendo resultado de maior custo energético requerido pela fixação biológica, valor que chega de 11-14% no incremento da respiração da planta como foi observado por RYLE *et al.* (1979), citado anteriormente.

Trabalhando com doses de nitrogênio (0, 224 e 448 kg.ha⁻¹), LAWN & BRUN (1974) evidenciaram que as taxas de redução de acetileno foram mais altas nos

tratamentos com menor disponibilidade de nitrogênio no solo, mostrando declínio da atividade biológica de fixação de nitrogênio. Entretanto, o conteúdo de proteínas e a produção de grãos foram incrementados com a adição de nitrogênio, evidenciando assim, o nódulo como forte dreno para a planta. IMANSADE & SCHMIDT (1999) também encontraram efeito positivo da adição de nitrogênio na produção de grãos e consideram importante a adição de N ou formas de manejo que proporcionem maior disponibilidade de N neste subperíodo de desenvolvimento.

No entanto, KOUTROUBAS *et al.* (1998) discordaram das constatações referidas. Os autores encontraram supremacia das plantas inoculadas no acúmulo de fitomassa seca nos estágios R₂ e R₅ sobre as que receberam aplicação de N. De acordo com o trabalho, o nitrogênio fixado pela nitrogenase é incorporado mais rapidamente aos compostos orgânicos sendo mais facilmente disponível à planta, enquanto a fixação via nitrato redutase gasta maior energia para reduzir o nitrogênio a NH₃. Constatou-se também que a produtividade de grãos esteve positivamente correlacionada com o acúmulo de fitomassa seca nos estágios de florescimento (R₂) e enchimento de grãos (R₅), que são os estágios que apresentam a maior intensidade metabólica, portanto é o

subperíodo onde a planta deve estar bem suprida de nitrogênio e fotoassimilados.

ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE NOS NÓDULOS

A nitrato redutase (NR) é uma enzima encontrada nas raízes e folhas da cultura da soja e auxilia na assimilação do nitrogênio. Esta enzima é responsável pela redução do nitrato absorvido do solo à nitrito ($\text{NO}_3^- + \text{NADP(H)} + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD(P)} + \text{H}_2\text{O}$). Através da nitrito desidrogenase, o nitrito é transformado em NH₄ ($\text{NO}_2^- + 6\text{Fd}_{\text{red}} + 8\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 6\text{Fd}_{\text{ox}} + 2\text{H}_2\text{O}$) e incorporado em esqueletos carbônicos para formação de aminoácidos (HUNTER, 1983; TAÍZ & ZIEGER, 2004).

A nitrato redutase pode ser encontrada no interior do bacteróide e auxilia na redução do nitrato, através de um sistema redutase (BURRIS, 1999; TAÍZ & ZIEGER, 2004), o que contribui para a assimilação extra de nitrogênio pelas leguminosas. HUNTER (1983), trabalhando com a cultivar de soja Tracy sob cultivo protegido em hidroponia, com inoculação de sementes por *Rizhobium japonicum*, com e sem adição de nitrato na solução nutritiva, observou que os nódulos contêm grande quantidade da enzima nitrato redutase, que se equivale a quantidade encontrada nas outras regiões das raízes. Entretanto a redução de nitrato no nódulo é menor que a

quantidade de nitrato reduzido em outras partes da raiz e na parte aérea, mostrando que o nódulo radicular não é o principal local de redução do nitrato da planta.

De acordo com LAW & BRUN (1974) e SCHIMDT & IMANSADE (1998), a presença da nitrato redutase nos nódulos poderia ser um fator importante no sentido da adubação nitrogenada servir como complemento de N à planta em períodos onde a atividade da nitrogenase é baixa, como o início da nodulação e subperíodo de florescimento e frutificação, promovendo aumento de produtividade. Embora haja evidências do benefício do suplemento de N em pequenas quantidades na produção, ainda são necessárias pesquisas que encontrem doses mais adequadas.

FATORES QUE AFETAM A NODULAÇÃO

De acordo com KAMICKER & BRILL, (1986), alguns fatores são determinantes na nodulação ou fixação biológica do N₂ por leguminosas sendo a tensão da água, teor de O₂ no nódulo, temperatura e pH do solo, salinidade, toxinas e predadores os principais que podem atuar junto à vasta variedade de estirpes de rizóbio que se encontram no solo.

Como foi relatado, o nódulo consiste de uma região cortical da raiz infectada, envolvida por células corticais que possuem uma rede vascularizada. A camada vascular possui uma rede de esclereídeos que serve de sustentação e proteção e que estão associadas com células parenquimáticas (WALSH, 1995). No entanto esta camada de esclereídeos pode limitar o movimento de água entre o solo e o nódulo cortical. A fronteira vascular é apoplásticamente isolada do nódulo cortical via estria de Kaspary. Esta camada possui poucos plasmodesmos e representa restrição do fluxo via simplasto. Contudo as células corticais podem secretar glicoproteínas para o apoplasto diminuindo o potencial osmótico e incrementando a absorção de água (WALSH, 1995).

Também se observa o efeito da disponibilidade hídrica no transporte de sacarose e compostos nitrogenados. Segundo WALSH (1995), o sistema vascular desenvolve turgor positivo em resposta ao transporte de compostos nitrogenados via fluxo de massa. Isso supõe que a exportação requer água e esta é indispensável neste fluxo, uma vez que a água que traz sacarose, via floema, é absorvida pelo nódulo seguindo o caminho de volta, carregando os solutos nitrogenados. Portanto, o balanço de água via transporte simplasto e apoplasto altera a

pressão de turgor das células e provavelmente tem influência na permeabilidade da membrana do nódulo a gases, principalmente o oxigênio.

Para que o processo de nodulação aconteça de forma efetiva é importante que a temperatura seja adequada à atividade da nitrogenase. Segundo ZHANG *et al.* (1996), a temperatura de 25°C é considerada ideal, enquanto temperaturas em torno de 15°C causam diminuição da atividade ou até inibição em várias raças de bactérias fixadoras.

Algumas pesquisas mostram o efeito do oxigênio na nodulação de plantas como a realizada por KUZMA *et al.* (1999). O trabalho mostrou que o oxigênio é fator importante na nodulação da soja, uma vez que a respiração e a atividade da enzima nitrogenase foram afetadas pela disponibilidade de O₂. De acordo com o estudo, pequenas concentrações de nitrogênio no bacteróide são importantes, pois concentrações baixas (próximo a 10%) afetam a atividade da nitrogenase devido a diminuição da respiração e disponibilidade de energia.

A permeabilidade gasosa no bacteróide é afetada por diversos fatores. Entre eles, a luz, água e nitrato, sendo que de modo geral, o teor de O₂ aumenta na luz e decresce em condições de seca ou

exposição ao nitrato (MYLONA, *et al.*, 1995; TAÍZ & ZIEGER, 2004).

O estresse hídrico afeta a atividade da nitrogenase de duas formas. Primeiro, limita a disponibilidade de oxigênio na zona do bacteróide restringindo a respiração e a segunda, pela diminuição da síntese de leghemoglobina, acúmulo de ureídeos e aspartato nas folhas e nódulos devido ao decréscimo no fluxo de água no floema (HUNGRIA & VARGAS, 2000).

KING & PURCELL (2005) avaliaram a inibição da fixação de nitrogênio em soja Cultivar Jacson e KS 4895 submetida a déficit hídrico, associados com elevação de ureídeos e aminoácidos. Com a diminuição na disponibilidade de água, as duas cultivares apresentaram diminuição da atividade nitrogenase, que foi acompanhado pelo aumento da concentração de ureídeos, aspartato e vários outros aminoácidos nas folhas, devido ao decréscimo na exportação destes para as raízes, que segundo os autores, são candidatos potenciais para o “feedback” de inibição na fixação de nitrogênio.

O manganês tem papel fundamental na catálise de vários processos enzimáticos e de transferência de elétrons. VALDEZ *et al.* (2000) citam que o Mn⁺⁺ pode regular a fixação biológica de N em condições de seca. Isso porque, a enzima

amido hidrolase responsável pela degradação de ureídeos nas folhas é dependente de Mn^{++} , sendo assim, em condições de estresse hídrico o suprimento de manganês pode auxiliar na manutenção da fixação biológica de nitrogênio.

A eficiência de fixação de nitrogênio está relacionada com o pH e a disponibilidade de alguns nutrientes no solo. Para obter boa eficiência de bactérias fixadoras a nível de solo, este deve apresentar pH em torno de 6,5. Altos teores de alumínio trocável e íons H^+ prejudicam o desenvolvimento radicular, o crescimento do rizóbio e a infecção radicular (SILVA *et al.*, 2002). Entretanto, SILVA *et al.* (2002) realizando experimento com soja sob diferentes doses de calcário (0, 2, 4 e 8 t.ha⁻¹) e com estirpes resistentes a acidez de solo, sugerem cautela na utilização de elevadas dosagens de calcário sob solos muito ácidos devido a diminuição na atividade de fixação de nitrogênio.

O fósforo tem influência na iniciação, crescimento e funcionamento dos nódulos (SÁ & ISRAEL, 1991). A atividade da nitrogenase é dependente de ATP, como já foi citado. Este fator explica porque a cultura da soja responde mais a adubação fosfatada quando comparada com culturas não noduladas. O experimento realizado por ISRAEL, (1987) ressaltou que altos requerimentos de fósforo são

necessários para a fixação biológica de N, de forma que o aumento do suprimento de fósforo promove incremento na atividade e no acúmulo de fitomassa seca do nódulo.

SILVA (1998) observou que a concentração de Pi nos nódulos das plantas que apresentaram omissão de fósforo se reduziu e, conseqüentemente, o seu acúmulo de fitomassa seca. Entretanto o aumento no suprimento de fósforo durante o estágio reprodutivo não proporcionou recuperação na produção de fitomassa seca de nódulos. O reflexo deste comportamento foi a redução na produção de ureídeos pela planta, que é a principal forma de transporte de N pela cultura e da atividade da sintetase glutamina e da glutamato, dependente de ferredoxina. No trabalho foi observado que a deficiência de Pi no estágio V₂ ocasiona inibição na formação de nódulos e no seu desenvolvimento, o mesmo aconteceu no estágio reprodutivo R₁, com posterior senescência dos mesmos.

O molibdênio é um elemento importante no metabolismo do nitrogênio por fazer parte do complexo enzima nitrogenase e redutase do nitrato (BURRIS, 1999; TAÍZ & ZIEGER, 2004). A produção de aminoácidos e, conseqüentemente, de proteínas são afetados pela deficiência de molibdênio. O Cobalto faz parte de precursores da leghemoglobina (TAÍZ &

ZIEGER, 2004), portanto, também está associado a fixação biológica de N.

SANTOS (1999), trabalhando com adubação nitrogenada e molibdica em soja observaram que a aplicação de molibdênio nas sementes diminuiu o índice de NO_3^- e elevou o teor de N total nas folhas, entretanto, não interferiu na produtividade de grãos, provavelmente porque o teor de Mo no solo já era suficiente para o desenvolvimento da planta. Também foi observado incremento no teor de proteína bruta nas sementes, sendo a aplicação das doses de 80 a 100g.ha^{-1} via foliar, as mais favoráveis. MESCHÉDE *et al.* (2004) consideram a adubação com molibdênio e cobalto importantes para a fixação biológica do N, mostrando que, a partir do momento que foram adicionados estes micronutrientes na semente a planta apresentou grãos com maior teor de proteína, entretanto, os autores salientam que se deve ter cautela na aplicação de molibdênio na semente, principalmente na forma de molibdato (MoO) o qual tende a reduzir a sobrevivência do rizóbio.

Outro ponto importante a ser ressaltado sobre a nodulação em soja refere-se a aplicação de produtos químicos na semente ou na cultura em desenvolvimento visando o controle de ervas daninhas. Esta constatação corrobora com os resultados

obtidos por ARRUDA *et al.* (2001). Os autores realizaram trabalho que teve por objetivo analisar a nodulação e fixação de nitrogênio em soja tratada com sulfentrazone (herbicida). Os dados obtidos mostram que a massa seca de nódulos, os teores de nitratos, aminoácidos e ureídeos decresceram com o incremento na dose de sulfentrazone, a causa provável deste comportamento foi a menor produção de fotoassimilados pela planta e desta forma restou menor quantidade para ser alocada para os nódulos, pois é dos fotoassimilados que vem a energia essencial para a formação e manutenção da enzima nitrogenase.. CÂMARA (2001), enfatiza que aplicação de Co, Mo e fungicidas nas sementes também podem ser fatores com interferência direta na sobrevivência do rizóbio e consequência imediata na nodulação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desta forma, fica claro que a fixação de nitrogênio pelas plantas é um processo que apresenta várias interações entre bactéria e hospedeiro (planta), sendo regulado por sinais químicos e hormonais, além de fatores externos como disponibilidade hídrica, teor de oxigênio e adubação nitrogenada. Entretanto, ressalta-se que é um processo dispendioso para a planta. Assim sugerem-se estudos sobre

técnicas de manejo, como a adubação nitrogenada, com intuito de buscar equilíbrio entre a adição de N e a fixação biológica em vista da importância do volume financeiro envolvido nestes dois mercados de insumos (adubo nitrogenado e inoculantes).

REFERÊNCIAS

- ANOLLÉS, C.G. Research Molecular dissection and improvement of the nodule symbiosis in legumes. **Field Crops Research**, v.53, p.47-68, 1997.
- ARRUDA, J.S.; et al. Nodulação e fixação de nitrogênio em soja tratada com sulfentrazone. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 325-330, fev. 2001.
- BROWN, S.B. et al. Symplastic transport in soybean root nodules. **Soil Biology Biochemic**, v. 27, n.415, p. 387-399, 1995.
- BURRIS, R.H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotecnology**, v. 22, p.381-393, 1999.
- CÂMARA, G.M.S. **Soja: tecnologia da produção II**. Gil Miguel de Sousa Câmara (editor).Piracicaba: G.M.S. Câmara, 2000. 450 p.
- COKER, G.T.; SCHUBERT, K.R. Carbon dioxide fixation in soybean roots and nodules. **Plant Physiology**, v.67, p.691-696, 1981.
- CHUEIRE, L.M.O. et al. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, n.5, p.883-840, set./out. 2003.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biologic Biochemic**. v.29, n.36, p.771-774, 1997.
- FARGEIX, C.; et al. Soybean (*Glycine max* L.) and bacteroid glyoxylate cycle activities during nodular senescence. **Journal Plant Physiology**, v.161, p.183–190, 2004.
- FEI, H.; VESSEY. J.K. Further investigation of the roles of auxin and cytokinin in the NH₄⁺-induced stimulation of nodulation using white clover transformed with the auxin-sensitive reporter GH3: gusA. **Physiologia Plantarum**, v.12, p.674–681, 2004.
- GERAHTY, N.; et al. Anatomical analysis of nodule development in soybean reveals an additional autoregulatory control point. **Plant Science**, v.58, p.1-7.

- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.
- HUNTER, W.J. Soybean root and nodule nitrate reductase. **Physiologia Plantarum**, v.59, p.471-475, 1983.
- IMSANDE, J.; SCHMIDT, J.M. Effect of N source during soybean pod filling on nitrogen and sulfur assimilation and remobilization. **Plant and Soil**, v.202, p.41-47, 1998.
- ISRAEL, D.W. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. **Plant Physiology**, v.84, n.3, p.835-840, 1987.
- KAMICKER, B.J.; BRILL, W.J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, n.3, p.487-492, 1986.
- KING, C.A.; PURCELL. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. **Plant Physiology**, v.137, p.1389-1396, 2005.
- KOUTROUBAS, S.D.; et al. The importance of early dry matter and nitrogen accumulation in soybean yield. **European Journal of Agronomy**, v.9, p.1-10, 1998.
- KUZMA, M.M. et al. The Site of Oxygen Limitation in Soybean Nodules. **Plant Physiology**, February 1999, v.119, p.399-407.
- MATHESIU, U. et al. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. **The Plant Journal**, v.14, n.1, p.23-34, 1998.
- MESCHEDE, D.K.; et al. Rendimento, teor de proteínas nas sementes e características agrônômicas de plantas de soja em resposta a adubação foliar e ao tratamento de sementes com molibdênio e cobalto. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.26, n.2, p.139-145, 2004.
- MYLONA, P. et al. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**, v.7, p.869-885, July 1995.
- NUKUI, N. et al. Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosyntheses and perception and nodulation in *Lotus japonicus* e *Macroptilium atropurpureum*. **Short Communication, Plant Cell Physiology**, v.41, n.7, p.803-807, 2000.

- RYLE, G.J. A. et al. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea, and white clover. II. Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.145-153, 1979.
- SA, T.M., ISRAEL, D.W. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. **Plant Physiology**, v.97, n.4, p.928-935, 1991.
- SANTOS, P.L. Adubação nitrogenada e molíbdica na cultura da soja, em Viçosa e Coimbra, Minas Gerais. Tese (**Doutorado em Fitotecnia**) UFV (Universidade Federal de Viçosa), Minas Gerais, 1999, 108p.
- SCHMIDT, J.S. et al. Regulation of soybean nodulation independent of ethylene signaling. **Plant Physiology**, v.119, p.951-959, 1999.
- SHENG, C.; HARPER, J.E. Shoot versus root signal involvement in nodulation and vegetative growth in wild-type and hypernodulating soybean genotypes. **Plant Physiology**, v.11 n.3, p.825-831, 1997.
- SILVA, A. F.; et al. Efeito da inoculação da soja (Cultivar Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p.1327-1333, 2002.
- SILVA, M.D. Crescimento, fotossíntese e metabolismo do nitrogênio em plantas de soja noduladas sob omissão e ressuprimento de fósforo. Tese (**Doutorado em Fisiologia Vegetal**), Universidade Federal de Viçosa, p.117, 1998.
- SMITH, D.L., HUME, D.J. Comparison of assay methods for N₂ fixation utilizing white bean and soybean. **Canadian Journal Plant Science**, v.67, p.11-19, 1987.
- TAÍZ, L.; ZIEGER, E. Fisiologia vegetal. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3º ed., Porto Alegre: Artemed, 2004, p.719.
- THIES, J.E.; et al. Phenology, growth, and yield of field-grown soybean and bush bean as a function of varying modes of N nutrition soil. **Biologic Biochemical**, v.27, n.415, p 575-583, 1995.
- TIMMERS, A.C.J. et al. Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. **Development**, v.126, p.3617-3628, 1999.
- VALDEZ, D. et al. Manganese application alleviates the water deficit-induced declined of N₂ fixation. **Plant Cell and Enviroment**, v.23, p.497-505, 2000.

WALSH, K.B. Physiology of the legume nodule and its response to stress. **Soil Biologic Biochemical**, v.27, n.4/5, p.637-655, 1995.

ZHANG, F. et al. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at sub optimal root zone temperatures. **Annals of Botany**, v.77, p.453 - 459, 1996.

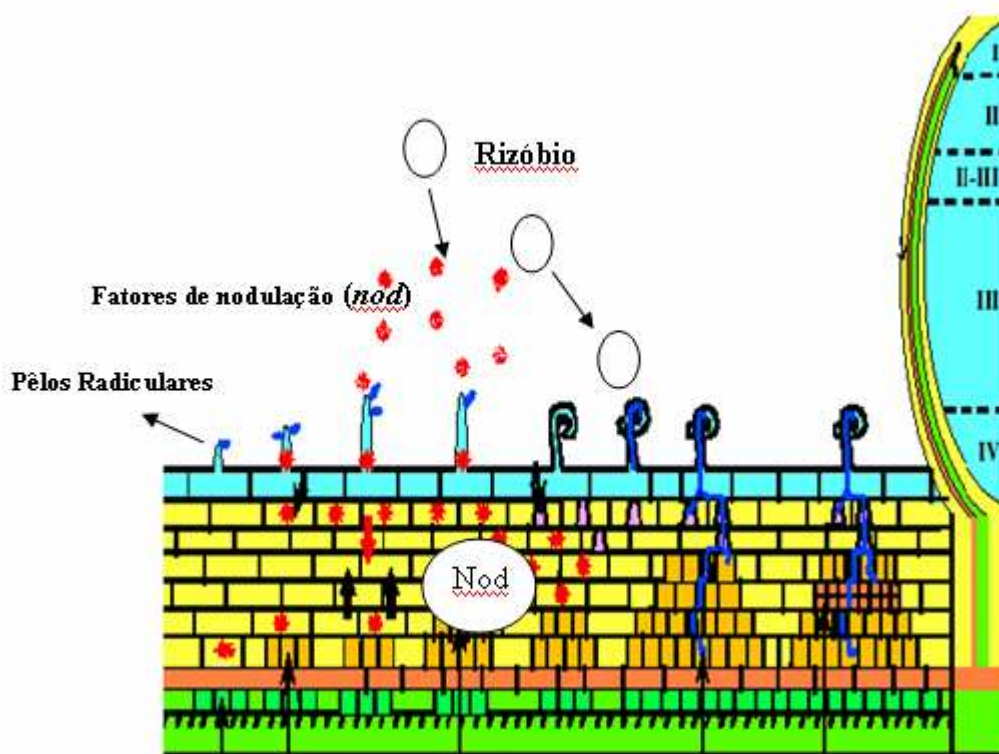


Figura 1. Esquema do processo de simbiose de bactérias do gênero *Rizhobium* com leguminosas, adaptado de TIMMERS *et al.* (1999).

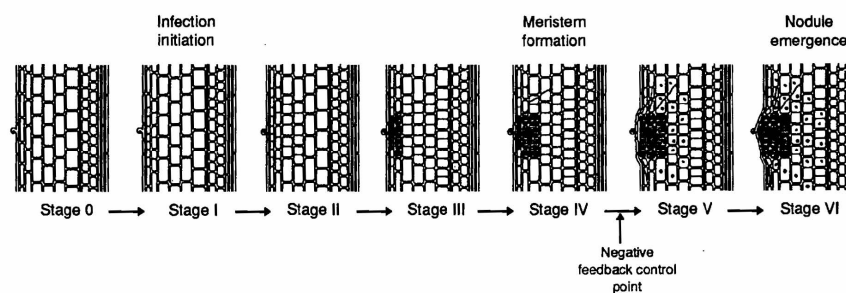


Figura 2. Estágios de infecção e formação de nódulos em raízes de soja. Fonte: GERAHTY *et al.* (1992).