

PATRÍCIA PERONDI ANCHÃO OLIVEIRA
WLADECIR SALLES DE OLIVEIRA
S. M. TSAI



Associações Simbióticas com a Microbiota do Solo

I. INTRODUÇÃO

O estudo de microrganismos que interferem na produtividade agrícola representa um desafio para o meio científico e fonte de constante indagação para pesquisadores e produtores rurais, que se preocupam em conhecer com detalhes as relações estabelecidas entre plantas e a microbiota do solo. A atividade predatória de alguns microrganismos sobre as culturas de interesse econômico representa a maior fonte de preocupação, em virtude da necessidade de aumento da produção e produtividade. Nesse sentido, trabalhos de melhoramento e seleção de plantas são realizados visando algumas características, como a produtividade, mas interferem negativamente em outras características menos observadas, porém não menos importantes. Algumas associações benéficas entre plantas e microrganismos, como bactérias fixadoras de nitrogênio ou fungos micorrízicos vesículo-arbusculares, não receberam a devida atenção durante muitos anos. Como resultado, algumas culturas melhoradas, como o feijoeiro, por exemplo, apresentam redução da capacidade de fixação biológica de nitrogênio para os cultivares melhorados em relação aos cultivares selvagens, tornando-se dependentes de adubos nitrogenados para atendimento da produtividade esperada.

Em razão da importância tanto para a planta quanto para a microbiota do solo, uma análise mais aprofundada sobre as associações benéficas entre plantas e microrganismos é abordada neste capítulo, com ênfase para a cultura da alfafa. Há muito tempo, a cultura da alfafa é objeto de estudo de interações benéficas com microrganismos do

solo e, para muitos, é o exemplo de como essas interações, quando bem manejadas, podem resultar em expressivos aumentos de produtividade e diminuição de custos para o agricultor.

II. ASSOCIAÇÕES SIMBIÓTICAS

Dentro de um conjunto denominado agroecossistema, os organismos possuem funções sucessivas e complementares, resultado de uma interdependência complexa, em que as plantas constituem o elemento limitador ou estimulante para toda a biota envolvida.

Em alguns casos, essa estratégia de regulação envolve compromissos de dependência complexa, que podem resultar em limitação para o desenvolvimento de uma espécie na ausência de outra. A alfafa, por exemplo, não transfere todo o produto de sua fotossíntese para o crescimento e respiração. Uma parte significativa de seus carboidratos, produzidos por fotossíntese nas folhas, é transferida para células da bactéria *Sinorhizobium meliloti*, alocadas dentro de nódulos radiculares. Em contrapartida, recebe compostos nitrogenados produzidos pela bactéria por meio da redução do N_2 da atmosfera. Essa estratégia de cessão de carboidratos em troca de compostos nitrogenados entre a alfafa e a bactéria é denominada simbiose. Da mesma forma, outras interações benéficas podem ser citadas, como a maximização da absorção do fósforo proporcionada por fungos micorrízicos, que invadem as raízes das plantas, fornecendo fósforo e recebendo carboidratos em troca. Existem ainda outras interações menos significativas, que não serão abordadas neste trabalho, mas que beneficiam a planta de alguma maneira. Em interações simbióticas, a planta controla sua própria infecção pelos microrganismos, facilitando ou simplesmente impedindo sua entrada, de acordo com sua necessidade.

Assim como outras características agrônômicas, as interações benéficas entre os microrganismos e as plantas são deixadas de lado durante o processo de seleção e produção de novos cultivares, ou mesmo em trabalhos de introdução de materiais. Por exemplo, ao selecionar um cultivar de maior potencial quanto à digestibilidade, o melhorista está selecionando ao mesmo tempo uma planta com menor teor de fibra. O fato é que um mínimo de fibra é necessário para que a planta permaneça ereta, evitando assim problemas durante a colheita. Outro exemplo: plantas selecionadas para o aumento da produção de biomassa apresentam decréscimo na produção de semente. E assim acontece com muitas características estudadas pelos melhoristas. Da mesma forma, plantas selecionadas sob condições que

possibilitem a autotrofia completa inibem o estabelecimento de relações simbióticas, impedindo a eliminação de plantas pouco habilitadas para o exercício da simbiose. Felizmente, a alfafa é uma planta que, mesmo após todo o processo de seleção e melhoramento realizado até hoje, ainda não perdeu a capacidade de associar-se a microrganismos benéficos, que melhoram o seu desempenho produtivo. É importante frisar que, para o agricultor, a escolha de um material selecionado para uma cultura anual de milho ou sorgo, por exemplo, é tarefa difícil, pois dela depende todo o sucesso ou insucesso da atividade econômica. No caso de uma cultura que deve ser explorada durante no mínimo quatro anos, como é o caso da alfafa, o uso de um bom material é ainda mais importante. Um bom alfafal pode ser explorado de forma rentável por até oito anos.

III. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A alfafa (*Medicago sativa* L.) é uma planta da família das leguminosas, que inclui plantas como o feijoeiro, soja e amendoim, e árvores como o angico e a sibipiruna. Além de características morfológicas que identificam essa família, existe outra particularidade não encontrada nas demais, que é a capacidade de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio por meio da formação de nódulos radiculares (Figura 1). Com exceção de algumas leguminosas, como a Sesbania,



Figura 1. Nódulos em raízes de alfafa. Fonte:www.forages.css.orst.edu

que apresenta nódulos nas raízes e ao longo de seu caule, todas as demais apresentam apenas nódulos radiculares. Esse processo de associação simbiótica é conhecido desde 1886, quando Kirchner fez as primeiras descrições do microssimbionte, que, somente após 1932, recebeu a classificação como gênero *Rhizobium* (FRED et al., 1932).

A alfafa possui a capacidade de produzir grande quantidade de matéria seca, de 6 a 12 t.ha⁻¹.ano⁻¹ em países de clima temperado, como Estados Unidos, Canadá e Argentina, e até 32 t.ha⁻¹.ano⁻¹, para algumas regiões do Brasil (ARAÚJO FILHO et al., 1972). Quando bem manejada, a alfafa produz forragem rica, palatável e nutritiva, com até 24% de proteína bruta na matéria seca. Assim como para a produção de matéria seca, a alfafa possui um grande potencial para acúmulo de nitrogênio fixado pelo *Rhizobium*. Admite-se a quantidade de 450 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ de nitrogênio como potencial para a simbiose alfafa/*Sinorhizobium meliloti* (VANCE et al., 1988). Sabe-se, no entanto, que esses dados são subestimados e que o potencial para as condições das regiões sul e sudeste do Brasil pode ser ao redor de 900 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ de nitrogênio fixado (dados não publicados). Em recente trabalho desenvolvido na região dos Pampas na Argentina, região caracterizada como de clima temperado, ARACCA et al. (1998) encontraram valores de 200 a 650 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ de nitrogênio extraído da atmosfera e convertido em matéria seca para a cultura da alfafa estudada em cinco diferentes estações experimentais do INTA. O registro de valores tão elevados para uma região onde o frio é limitante para o processo simbiótico, durante no mínimo quatro meses no ano, está relacionado com um detalhe pouco observado pela maioria dos pesquisadores. Assim como para outras culturas, o sistema radicular da alfafa é avaliado quanto ao número de nódulos e potencial indireto de fixação biológica de nitrogênio (atividade da enzima nitrogenase) entre 0 e 30 cm de profundidade. Entretanto, existe intensa nodulação em profundidades de até 2 m e normalmente o sistema radicular de uma planta se entrelaça com as demais, dificultando ainda mais sua avaliação. Dessa forma, concluem os autores que os dados de superfície podem estar subestimados em até 40%, o que reforça a hipótese de fixação de até 900 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ para condições de clima tropical e subtropical.

A planta da alfafa é conhecida como excelente extratora tanto para fósforo, potássio e outros elementos, quanto para nitrogênio do solo, principalmente na forma de nitrato (RASSE e SMUCKER, 1999). Entre a fase inicial de germinação e a efetivação do processo simbiótico,

a alfafa precisa de uma fonte de nitrogênio para sua manutenção. Para algumas leguminosas, a semente possui quantidade suficiente de nitrogênio para garantir a germinação e sobrevivência até o estabelecimento do processo simbiótico. No caso da alfafa, a semente possui tamanho reduzido, tornando importante o nitrogênio fornecido pelo solo.

Em recente trabalho conduzido no Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP (Tabela 1), plantas de alfafa mantidas em condições de casa de vegetação durante 35 dias, com diferentes concentrações de nitrogênio em solução nutritiva, demonstraram a influência positiva de baixas concentrações de nitrogênio sobre a nodulação e atividade da enzima nitrogenase, que é uma medida indireta da atividade do processo simbiótico. A partir do intervalo entre 2 e 4 mM, a atividade da enzima nitrogenase passa a decrescer, até chegar a zero à concentração de 16 mM de nitrogênio.

O intervalo entre 1 e 2 mM de nitrogênio apresenta a melhor combinação entre número de nódulos e atividade da enzima nitrogenase. Fazendo uma relação com volume de solo explorado na camada de 0 – 20 cm, obtemos 28 a 56 kg/ha de nitrogênio como concentração de nitrogênio desejada. Essa quantidade é facilmente fornecida pelo solo. Alguns autores recomendam a aplicação de 17 a 28 kg/ha de nitrogênio, independentemente da concentração de nitrogênio no solo (TEUBER et al., 1984; CIHACEK, 1994), porém, esses mesmos autores admitem que essa prática não é utilizada com frequência pelos

Tabela 1. Número de nódulos e atividade da enzima nitrogenase de plantas de alfafa mantidas durante 35 dias em solução nutritiva. Média de cinco repetições (Dados não publicados).

Concentração de N (mM)	Número de nódulos (nº/planta)	Nitrogenase ($\mu\text{MC}_2\text{H}_2/\text{pl.h}^{-1}$)
0	b 14,6	Bc 0,65
1	a 32,0	ab 1,35
2	a 31,8	a 2,02
4	a 34,2	b 0,93
6	a 39,6	ab 1,20
8	a 35,0	bc 0,55
16	b 6,6	c 0
C.V.	28,8	44,4
DMS*	16,0	0,85

*DMS – Diferença mínima significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

agricultores nos Estados Unidos, devido à reconhecida habilidade da alfafa em extrair nitrogênio do solo, durante o seu estabelecimento.

Da mesma forma, o excesso de nitrogênio no solo prejudica a heterotrofia a favor da autotrofia (PHILLIPS et al., 1982; ANCHÃO, 1995), ou seja, uma planta adubada com nitrogênio não precisa da simbiose com o *Rhizobium*, podendo destinar o produto da fotossíntese para produção de biomassa e reserva. O fato é que, além de custo adicional para a exploração agrícola, a adubação nitrogenada prejudica o processo simbiótico.

Alguns agricultores, por desconhecimento, e pesquisadores, por insistência, utilizam e recomendam a adubação nitrogenada como regra, desconsiderando o processo simbiótico. Essa medida, muitas vezes tomada para “garantir” a produção, afeta significativamente a longevidade do alfafal, na medida em que disponibiliza nitrogênio para as plantas invasoras também, aumentando a exigência de tratamentos culturais. A fixação biológica contribui para a conservação de fontes de energia utilizadas na produção de adubos nitrogenados, na diminuição dos custos de produção e na diminuição de riscos ambientais, principalmente na água de subsuperfície, provocados pelo uso indiscriminado de adubos nitrogenados.

Uma comparação mais detalhada entre a fixação biológica de nitrogênio e a adubação nitrogenada foi realizada durante seis meses em experimento conduzido no campo de produção de feno de alfafa do Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Os dados referem-se à média obtida entre quatro cultivares, a saber: Crioula Brasileira (semente multiplicada em Chapecó, SC), Crioula Chilena (semente da Crioula Brasileira multiplicada no Chile), Pioneer 5312 e CUF-101 (Universidade da Flórida, EUA). Os dados referentes às fontes de nitrogênio estão relacionados nas Tabelas 2, 3 e 4. Os dados referentes aos cultivares não foram relatados em virtude do objetivo desta apresentação.

A média da produção de matéria seca e número de hastes, entre os tratamentos com e sem adubação nitrogenada, não diferiu estatisticamente (Tabela 2), demonstrando a capacidade do processo simbiótico de garantir as quantidades necessárias de nitrogênio à planta para o seu desenvolvimento. Entretanto, no primeiro mês de avaliação (Tabela 3), a produção foi estatisticamente inferior para o tratamento de fixação biológica, evidenciando a necessidade de um tempo mínimo para que o processo simbiótico alcance os índices desejados. Conforme

descrito por VINCENT (1975), a medida mais precisa para quantificar a fixação biológica de nitrogênio é a produção de matéria seca em relação ao tratamento testemunha. Para o caso da alfafa, o princípio de VINCENT parece aplicar-se com exatidão na medida em que a produção de matéria aumentou após o primeiro corte.

Tabela 2. Avaliação de fontes de nitrogênio no campo, quanto à produção de matéria seca, número de hastes, número de nódulos e atividade da enzima nitrogenase. Média de quatro repetições e quatro tempos de amostragem (dados não publicados).

Nitrogênio	Parte aérea		Sistema radicular	
	P. de matéria seca (g/0,1m ²)	Nº de hastes (nº/0,1m ²)	Nº de nódulos (nº/planta)	Nitrogenase (µMC ₂ H ₂ /pl.h ⁻¹)
450 kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹	a 25,27	a 48,58	b 20,35	b 215,45
Fixação biológica	a 23,72	a 48,19	a 51,00	a 571,09
DMS*	1,63	1,86	10,10	145,88
C.V.	13,35	11,01	43,90	57,52

*DMS – Diferença mínima significativa (p<0,05) pelo teste Tukey.

As plantas adubadas com nitrogênio apresentaram reduzida nodulação e atividade da enzima nitrogenase, demonstrando o efeito negativo do nitrogênio sobre o processo de infecção e formação dos nódulos radiculares (Tabela 2). Mesmo que indireta, a análise da atividade da enzima nitrogenase fornece uma medida útil de comparação de plantas mantidas sob as mesmas condições, que, segundo TSAI et al. (1993), está correlacionada positivamente com o número de nódulos.

Tabela 3. Avaliação de fontes de nitrogênio no campo, quanto à produção de matéria seca. Média de quatro repetições (dados não publicados).

Nitrogênio	Produção de matéria seca (g/0,1m ²)			
	16/06/98	07/08/98	11/09/98	15/10/98
450 kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹	a 20,31	a 29,66	a 27,01	a 26,95
Fixação biológica	b 16,32	a 26,84	a 25,88	a 25,00
DMS*	0,12	0,52	0,09	0,82
C.V.	4,39	3,32	9,48	1,57

*DMS – Diferença mínima significativa (p<0,05) pelo teste Tukey.

A fixação biológica foi suficiente para garantir os níveis de nitrogênio necessário, a ponto de não existir diferenças em relação às plantas adubadas para a concentração de nitrogênio na matéria seca e proteína bruta (Tabela 4). Embora o nitrogênio tenha sido fornecido em grande quantidade às plantas, não foi observada excessiva concentração de nitrogênio não protéico na matéria seca, nas parcelas com adubação nitrogenada (Tabela 4). Provavelmente, o metabolismo e a capacidade da alfafa na conversão de nitrogênio em proteína foram suficientes para assimilar o volume disponibilizado no solo.

Para finalizar, a análise da digestibilidade *in vitro* forneceu dados semelhantes para os dois tratamentos (Tabela 4). Esse conjunto de fatos leva à conclusão de que, independentemente da forma de aquisição do nitrogênio, a forragem produzida possui produtividade e qualidade nutricional semelhantes, que dispensariam a introdução de nitrogênio de fonte não biológica para serem obtidas, até a razão de 450 kg.ha⁻¹.ano⁻¹. Essa discussão, relacionando formas de aquisição de nitrogênio, pode ser mais bem compreendida em relevantes trabalhos encontrados na literatura (PHILLIPS et al., 1982; TEUBER e PHILLIPS., 1988; CHERNEY et al. 1994; CIHACEK, 1994).

Tabela 4. Avaliação de fontes de nitrogênio no campo, quanto ao nitrogênio total, proteína bruta, nitrogênio não protéico e digestibilidade. Média de quatro repetições e quatro tempos de amostragem (dados não publicados).

Nitrogênio	Análise qualitativa da matéria seca			
	Nitrogênio total (%)	Proteína bruta (%)	Nitrogênio não protéico (%)	Digestibilidade (%)
450 kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹	a 3,83	a 21,29	a 1,05	a 71,72
Fixação biológica	a 3,74	a 21,31	a 0,98	a 71,63
DMS*	0,12	0,52	0,09	0,82
C.V.	4,39	3,32	9,48	1,57

*DMS – Diferença mínima significativa (p<0,05) pelo teste Tukey.

IV. ABSORÇÃO EFICIENTE DE FÓSFORO

O fósforo é um dos elementos mais importantes para a produção e a qualidade da alfafa. É caracterizado como macroelemento de caráter essencial devido à quantidade exigida pelas plantas e sua participação direta na formação de compostos, como os ácidos desoxirribo-

nucléico e ribonucléicos, polímeros de nucleotídeos, fosfolipídios, ésteres e finalmente fósforo inorgânico, que participa do controle de fluxo e efluxo do fósforo durante a absorção radicular.

A aplicação de fósforo depende das características físicas e químicas de cada solo, sendo efetuado durante o plantio, conforme a necessidade, e de forma repositiva, conforme a quantidade extraída a cada corte. Algumas características, como a acidez do solo e teores de ferro e alumínio, podem manter o fósforo indisponível às plantas, limitando sua absorção. Todavia, existe uma forma alternativa pela qual as plantas recebem o fósforo localizado fora da ação de suas raízes. Esse processo, denominado simbiose, acontece entre a planta hospedeira e um grupo de fungos da classe dos Zygomycetes, conhecidos como endomicorrizas vesículo-arbusculares. Os benefícios da simbiose, para o hospedeiro, resultam da melhor utilização e conservação de nutrientes, principalmente aqueles que se movimentam por difusão, portanto de baixa mobilidade, como fósforo, cobre e zinco. As hifas micorrízicas externas às raízes funcionam como extensão do sistema radicular, aumentando sua capacidade de explorar maior volume de solo (HAYMAN & MOSSE, 1972).

Os fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (VA) são simbiotes obrigatórios, que colonizam cerca de 80% das plantas (BONFANTE-FASOLO, 1987). Quando as plantas são infectadas por fungos patogênicos, rapidamente acionam um mecanismo de defesa, que inclui a produção e excreção de compostos denominados fitoalexinas: quitinases, isomerases, peroxidases e glucanases (DIXON et al., 1983; DIXON e HARRISON, 1990). No caso da infecção por fungos VA, os relatos são contrastantes em relação à ação ou não do mecanismo de defesa, mas o fato é que a planta é colonizada sem a indução de alguns compostos secundários normalmente produzidos. A conclusão a que se chega é de que os fungos VA são bem-vindos quando as concentrações de fósforo são insuficientes para a nutrição da planta ou quando o crescimento radicular não é suficiente para interceptar o fósforo disperso no solo. A acumulação de compostos secundários em raízes intactas de alfafa foi estudada por VOLPIN et al. (1994). Constatou-se que o mecanismo de defesa da planta foi acionado durante a colonização por fungos VA, proporcionando a acumulação e atividade de fitoalexinas. Porém, após reconhecimento do fungo pela planta, o mecanismo de defesa foi prontamente suprimido, embora o composto responsável por esse sinal de reconhecimento não tenha sido identificado.

A infecção das raízes da alfafa pelo *Sinorhizobium meliloti* é induzida por compostos fenólicos exsudados pelas raízes durante o processo de germinação. Entretanto, além da bactéria fixadora de nitrogênio, outros microrganismos simbiotes são afetados pelos compostos fenólicos, facilitando ou regulando sua entrada nas raízes. Segundo trabalho desenvolvido por TSAI e PHILLIPS (TSAI e PHILLIPS, 1991; PHILLIPS e TSAI, 1992), existem dois compostos fenólicos exsudados pelas raízes de alfafa (cv. Moapa-69), que estimulam a germinação e o desenvolvimento de hifas de fungos micorrízicos VA (*Glomus etunicatum* e *Glomus macrocarpum*), e dois outros compostos que impedem a germinação e infecção das raízes, quando a planta se encontra em estresse. Esses dados sugerem que a planta possui mecanismo de regulação da infecção micorrízica de acordo com sua necessidade.

Em experimento conduzido em vasos de leonard, contendo solução nutritiva (ausência de fósforo) e vermiculita autoclavada, mantidos em casa de vegetação, TSAI e colaboradores avaliaram a infecção de raízes intactas de alfafa por hifas do fungo VA (*Glomus macrocarpum*) (TSAI e PHILLIPS, 1992). Logo na primeira semana, os sintomas de deficiência de fósforo nas plantas não inoculadas eram evidentes e, após três semanas, iniciou-se processo de senescência (Figura 2). Ao mesmo tempo, as plantas inoculadas com o fungo VA (100 esporos por vaso), tanto em superfície quanto incorporado, continuaram a desenvolver-se sem apresentar sintomas de deficiência de fósforo. Esse experimento é importante para demonstrar a capacidade de extração de fósforo pelas hifas do fungo, pois a única fonte de fósforo era o substrato (vermiculita expandida).

Nas últimas décadas, o estudo de fungos VA, por identificação e inoculação, tem evidenciado diferenças quanto à capacidade de colonizar, esporular e até influenciar de forma benéfica as plantas hospedeiras colonizadas pelos fungos. Não existe comprovação de nenhum fungo específico para uma certa planta. O que se sabe é que um fungo VA isolado de uma espécie de planta pode infectar uma vasta quantidade de outras espécies (COLOZZI-FILHO e BALOTA, 1994). Para alfafa, respostas significativas têm sido alcançadas com a micorrização, principalmente em solos extremamente ácidos e pobres em fósforo (CARDOSO e LAMBAIS, 1992). O processo de micorrização da alfafa em escala comercial é visto como uma das formas mais adequadas para garantir a utilização efetiva do fósforo aplicado no solo, de forma a diminuir a quantidade aplicada sem afetar a produtividade.

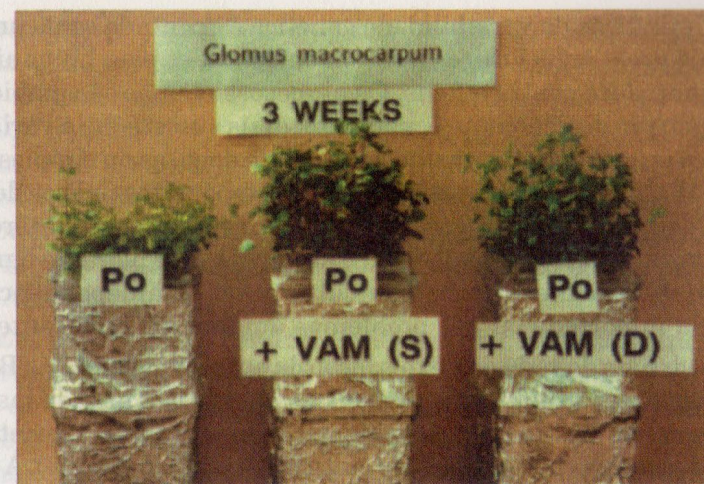


Figura 2 – Plantas de alfafa infectadas por fungos VA. (TSAI & PHILLIPS, 1992)

V. PERSPECTIVA PARA PROCESSOS DE SELEÇÃO E ADAPTAÇÃO DE CULTIVARES DE ALFAFA PARA A REGIÃO CENTRO-SUL DO BRASIL

Dentro dos programas de seleção de plantas, duas linhas distintas podem ser observadas, com relação ao objetivo e o meio utilizado para alcançá-las. Nesse contexto, podemos situar a cultura da alfafa como tão importante quanto outras culturas de interesse mundial, como o milho, a soja e o algodão, devido a sua importância econômica para países como Estados Unidos e Argentina. A primeira linha tem como objetivo principal o atendimento da demanda pelo uso de técnicas sofisticadas, como a geração de variantes geneticamente modificadas. Problemas como a dependência de tecnologia importada e diminuição da variabilidade genética da cultura e, por conseguinte, suscetibilidade ao aparecimento de novas pragas e doenças são os pontos negativos dessa tendência. A segunda linha está comprometida com o estudo de adaptação das culturas em relação aos processos competitivos, procurando a otimização e o balanço sustentável da exploração agrônoma, utilizando ferramentas como a variabilidade genética e processos naturais de reciclagem e eficiência na utilização de nutrientes. Esse conceito tem se mostrado mais concreto e atraente, sendo reconhecido e praticado já há alguns anos pelos melhoristas, em todo o mundo, com resultados animadores, inclusive para a cultura da alfafa.

A diminuição da variabilidade genética é apontada como um dos principais problemas futuros a serem enfrentados pela humanidade na constante luta contra a fome. Os agroecossistemas são ambientes perturbados ecologicamente e, portanto, mais suscetíveis a variações indesejáveis, como aparecimento de pragas e doenças ou simplesmente desertificação em grande escala. A procura por altos índices de produtividade sem levar em consideração outros inúmeros fatores de igual importância relacionados com o ambiente de exploração agrícola pode inviabilizar a exploração da cultura, ou pela dependência de tecnologia importada ou por problemas ambientais resultantes.

Em virtude da reduzida exploração da cultura da alfafa no Brasil, existem poucos cultivares disponíveis no mercado. A grande maioria das sementes é formada basicamente por uma mistura varietal de ampla adaptação, conhecida como cultivar Crioula (Figura 3). A identificação de novos cultivares de alfafa por meio de seleção ou introdução de novos materiais é uma preocupação iminente devido à crescente procura por forrageiras de alta qualidade que sejam compatíveis com a tecnificação da exploração pecuária brasileira. Além disso, a adaptação de novos materiais às nossas condições edafoclimáticas aumenta a variabilidade genética, indispensável a qualquer programa de exploração em longo prazo de uma cultura.

Associadas aos aspectos agronômicos normalmente estudados como tolerância a pragas e doenças, estacionalidade, digestibilidade, entre outros, algumas características, como potencial de fixação biológica de nitrogênio, uso eficiente de água fornecida por meio de irrigação e potencial de produção de biomassa, estão intimamente correlacionadas e podem contribuir como ferramentas no processo de seleção (KUMARASIGHE et al., 1992; KNIGHT et al. 1993). A eficiência do uso da água pelas plantas (W), que é a relação entre a biomassa produzida e a água utilizada, está intimamente ligada ao potencial de discriminação de isótopos de carbono durante a fotossíntese, em virtude do potencial de transpiração regulado pela abertura dos estômatos (HUBICK et al., 1993; FARQUHAR et al., 1989; JOHNSON e TIESZEN, 1994). Da mesma forma, os dois processos estão ligados à fixação biológica de nitrogênio, visto que a maior produção de esqueletos de carbono aumenta o fluxo de produtos da fotossíntese e compostos nitrogenados da planta para o microssimbionte nos nódulos radiculares (KNIGHT et al., 1993).

A produção eficiente de alfafa depende do fornecimento de água durante o desenvolvimento da cultura. Entretanto, algumas plantas

possuem maior capacidade de produção por unidade de água transpirada. Essa capacidade pode ser mensurada pela variação isotópica entre as moléculas de CO₂ incorporadas e a concentração isotópica do CO₂ atmosférico. Altos valores para Δ , que é a razão ¹³C/¹²C, representam alta assimilação de CO₂, indicando que a planta manteve seus estômatos abertos. Para plantas diferentes, mantidas sob a mesma condição de irrigação, a variação entre razões isotópicas do carbono representa diferença quanto à eficiência no uso da água (FARQUHAR et al., 1989).

Em experimento conduzido no campo de produção de feno do Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em Piracicaba, SP, tem sido observada uma variação de mais de 2 pontos entre cultivares de alfafa mantidos sob a mesma condição de irrigação, com valores para $\Delta^{13}\text{C}(\text{‰})_{\text{PDB}}$ entre 20,48 e 22,49. Nesse mesmo experimento, avaliou-se também a fixação biológica de nitrogênio pela discriminação isotópica do nitrogênio. Os resultados apresentaram variação de mais de 38% entre cultivares com relação ao nitrogênio obtido pela fixação biológica, com valores de 53,65% até 91,85% de nitrogênio oriundo da atmosfera (dados não publicados).

O estudo de cultivares de alfafa quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio é uma preocupação recente no Brasil. Embora exista a resistência de alguns pesquisadores que insistem na recomendação de adubação nitrogenada, a atividade da simbiose alfafa/



Figura 3 – Haste de alfafa cultivar Crioula. Fonte: W.S. Oliveira.

Sinorhizobium vem sendo difundida e faz parte das avaliações de rotina em trabalhos de pesquisa. Nos Estados Unidos, existe um programa de melhoramento, coordenado pelo USDA, que dura 24 anos, cujo objetivo principal é o incremento da atividade de fixação de nitrogênio atmosférico (BARNES et al., 1984). Em virtude de sua relação direta com a qualidade e a quantidade de forragem produzida, o nitrogênio atmosférico é um dos elementos-chave para os programas de melhoramento de plantas para a reciclagem e uso eficiente de nutrientes.

A proposta de novos parâmetros para avaliação da cultura da alfafa em programas de seleção tem por objetivo contribuir com mais uma ferramenta, em conjunto com as já existentes, garantindo a produção de novos cultivares sob o ponto de vista da produtividade e conservação dos recursos naturais, como a água e os nutrientes obtidos direta ou indiretamente de fontes não renováveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANCHÃO, P.P. INTERAÇÃO MICROBIOLOGIA-FUNGICIDAS NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE ALFAFA VISANDO A REDUÇÃO NA TAXA DE SEMEADURA. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1995, 84p.
- ARAÚJO FILHO, J.A. de; GADELHA, T.A.; PEREIRA, R.M.A.; HAINES, C.A. Competição entre onze variedades de alfafa (*Medicago sativa*, L.). *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 1972, v.1, p.77-88.
- ARACCA, R.; BASIGALUP, D.; BREZZONE, E.; BRUNO, O.; CASTELL, C.; COLLINO, D.; DARDANELLI, J.; DIAZ-ZORITA, M.; DUHALDI, J.; GONZALEZ, N.; HANSEN, W.; HEINZ, N.; LAICH, S.; LOPEZ, A.; PERALTA, O.; PERTICARI, A.; QUADRELLI, A.; RIVERO, E.; ROMERO, N.; SERENO, R. *Proceedings of the 36th North American Alfalfa Improvement Conference*. Montana, 1998, p.71.
- BARNES, D.K.; HEICHEL, G.H.; VANCE, C.P.; ELLIS, W.R. A multiple-trait breeding program for improving the symbiosis for N₂ fixation between *Medicago sativa*, L. and *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil*, 1984, v. 82, p.303-314.
- BONFANTE-FASOLO, P. Vesicular-arbuscular mycorrhizae: fungus-plant interactions at the cellular level. *Symbiosis*, 1987, v.3, p.249-268.
- CARDOZO, E.J.B.N. e LAMBAIS, M.R. Aplicações práticas de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA). In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. *Microbiologia do solo*. 1992, p.283-296.
- CHERNEY, D.J.R.; CHERNEY, J.H.; PELL, A.N. Inorganic nitrogen supply effecta on alfalfa forage quality. *Journal of Dairy Science*, 1994, v.77, p.230-236.
- CIHACEK, L.J. Alfalfa nutrient needs and fertilization. In: BOTREL, M. de A.; ALVIM, M.J.; LEONIDAS, P.P. e VILELA, D. *Anais do workshop sobre o potencial forrageiro da alfafa (Medicago sativa L.) nos trópicos*. EMBRAPA-CNPGL, Juiz de Fora. 1994, p.93-97.
- COLOZZI-FILHO, A. e BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. EMBRAPA-CNPAC-CNPSO, Brasília, 1994, 383-412.
- DIXON, R.A.; DEY, P.M.; LAMB, C.J. *Phytoalexins: Enzymology and molecular biology*. *Advances in Enzymology*, 1993, v.55, p. 1-136.
- DIXON, R.A. e HARRISON, M.J. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics*, 1990, v.28, p.165-234.
- FARQUHAR, G.D.; EHLERINGER, J.R.; HUBICK, K.T. Carbon isotopic discrimination and photosynthesis. *Field Crops Abstract*, 1989, v.40, p.503-547.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; MCCOY, E. *Root nodule bacteria of leguminous plant*. The University of Wisconsin Press, Madison, 1932, 343p.
- HAYMAN, D.S. e MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Increased uptake of labile phosphorus from soil. *New Phytology*, 1972, v.71, p.41-47.
- HUBICK, K.T.; GIBSON, A.; EHLERINGER, J.R.; HALL, A.E.; FARQUHAR, G.D. Diversity in the relationship between carbon isotope discrimination and transpiration efficiency when water is limited. In: EHLERINGER, J.R.; HALL, A.E. *Stable isotope and plant carbon-water relations*. Academic Press Inc., San Diego, 1993, p.311-325.
- JOHNSON, R.C. e TIESZEN, L.L. Variation for water use efficiency in alfalfa germplasm. *Crop Science*, 1994, v.34, p.452-458.
- KNIGHT, J.D.; VERHEES, F.; VAN KESSEL, C.; SLINKARD, A.E. Does carbon isotope discrimination correlate with biological nitrogen fixation? *Plant and Soil*, 1993, v.153, p. 151-153.
- KUMARASINGHE, K.S.; KIRDA, C.; MOHAMED, A.; ZAPATA, F.; DANSO, S.K.A. ¹³C isotope discrimination correlates with biological nitrogen fixation (*Glycine max* L. merrill). *Plant and Soil*, 1992, v.139, p.145-147.
- PHILLIPS, D.A.; TEUBER, L.R.; JUE, S.S. Relationships between apparent nitrogen fixation and carbon exchange rate in alfalfa. *Crop Science*, 1982, v.20, p.491-495.
- PHILLIPS, D.A. e TSAI, S.M. Flavonoids as plant signals to rizosphere microbes. *Micorrhiza*, 1992, v.1, p.55-58.
- RASSE, D.P. e SMUCKER, J.M. Tillage effects on soil nitrogen and plant biomass in a corn-alfalfa rotation. *Journal of Environment Quality*, 1999, v.28, p.873-880.
- TEUBER, L.; LEVIN, R.P.; SWEENEY, T.C.; PHILLIPS, D.A. Selection for N concentration and forage yield in alfalfa. *Crop Science*, 1984 v.24, p.553-558.
- TEUBER, L.R. e PHILLIPS, D.A. Influences of selection method and nitrogen environment on breeding alfalfa for increased forage yield and quality. *Crop Science*, 1988, v.28, p.599-604.
- TSAI, S.M. e PHILLIPS, D.A. Flavonoids naturally released from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Applied Environment Microbiology*, 1991, v.57, p.1485-1488.

- TSAI, S.M.; SILVA, P.M.; CABEZAS, W.L.; BONETTI, R. Variability in nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) intercropped with maize. *Plant and Soil*, 1993, v.152, p.93-101.
- VANCE, C.P.; HEICHELL, G.H.; PHILLIPS, D.A. Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. *Alfalfa and alfalfa improvement*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science of America, Madison, 1988, p.229-251.
- VINCENT, J.M. Manual Practico de Rizobiologia. 1 ed. Buenos Aires: Hemisferio sur, S.R.L., 1975, 200p.
- VOLPIN, H.; ELKIND, Y.; OKAN, Y.; KAPULNIK, Y. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiology*, 1994, v.104, p.683-689.