

AS BACTERIAS DOS NÓDULOS DAS RAIZES DAS LEGUMINOSAS

AULA INAUGURAL

1946

Ruben de Souza Carvalho

*Professor Catedrático de Fito-
patologia da Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo*

INDICE

As bactérias dos nódulos das raízes das leguminosas	12
Plantas que enriquecem o solo	14
A bactéria	15
Formação, morfologia e histologia dos nódulos	17
A simbiose	19
Importância econômica da fixação do N	21
A inoculação	22
Métodos das culturas artificiais	24

Designado pela douta Congregação desta Escola para proferir a aula inaugural do ano letivo que ora se inicia, sejam as minhas primeiras palavras uma sincera demonstração de reconhecimento a vós, prezados colegas, que num gesto de requintada generosidade quisestes tributar-me esta homenagem, cometendo-me tão honrosa incumbência. Quero, também, fazer-vos sentir que é com grande desvanecimento que procurarei dar desempenho à pesada tarefa que me atribuístes, em que pese a certeza de, infelizmente, não poder corresponder dada a carência de meus dotes didáticos, à fidalguia de vosso gesto.

Com a evidente preocupação de me proporcionar uma oportunidade para que eu discorresse mais à vontade sobre as pesquisas que venho realizando na Cadeira de Fitopatologia, o que aliás tenho como mais uma demonstração de vossa gentileza, sugeristes que a dissertação a mim confiada versasse sobre a Etiologia da "Tristeza dos Citrus". O assunto é, na verdade, de palpitante interesse científico, principalmente agora que os investigadores norte-americanos estão entrando em cena, em virtude do aparecimento nos laranjais da Califórnia de um mal que lá se denominou de "Quick decline", mas que por todos os característicos, é idêntico à "Tristeza" que ocorre entre nós.

Aceito prazerosamente o ensêjo que me oferecestes para um breve esclarecimento a respeito dos trabalhos que realizei sobre o nematóide *Tylenchulus semi-penetrans* Cobb.

A hipótese que levantei naquela época sobre a possível relação desse nematóide, como agente causal primário, da "Tristeza da laranjeira", foi recentemente corroborada por ilustres pesquisadores argentinos, em cujo país a terrível doença já produziu também danos de elevada monta.

Se tal hipótese se concretizará ou não em realidade científica é assunto que só as investigações futuras poderão esclarecer. Não obstante já não militar só no campo da teoria do nematóide, as dificuldades que encontrei, inicialmente, na sua sustentação, ainda persistem, e os estudos e observações realizados nestes últimos 3 anos não conseguiram removê-las. E assim, a dúvida que tinha, em princípio, sobre a viabilidade dessa hipótese, ao invés de se dissipar, como era natural, mais se acentuou. Com isso não quero dizer que a tenha repudiado. Todas as hipóteses sobre a etiologia da "Tristeza" apresentam dificuldades embaraçosas na sua explanação. A do vírus, por exemplo, conquanto magnificamente fundamentada por WEBBER e corroborada, em parte, por SILBERSCHMIDT, apresen-

ta na opinião abalizada dêste ilustre virologista do Instituto Biológico, pontos difíceis de serem explicados. Requer mesmo uma verdadeira ginástica cerebral para que possamos enquadrá-la dentro dos conhecimentos atuais que regem a matéria. Seja como fôr, restar-me-á, entretanto, a satisfação de duas cousas:

- a) — ter sido o primeiro a assinalar no Brasil o *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, considerando-se principalmente o fato do emérito nematologista RAHN não o ter relatado quando de sua estada no Instituto Biológico de São Paulo, em 1928. (RAHN descreveu muitas espécies de nematóides em Citrus provenientes de diferentes pontos do Estado, das quais várias foram consideradas como espécies novas, não fazendo, essa autoridade, nenhuma referência ao *Tylenchulus semipenetrans* que é justamente o mais importante dos nematóides que parasitam os Citrus. É, pois, evidente, que RAHN não o encontrou naquela ocasião).
- b) — a hipótese que aventei em 1942, fundamentada como estava, em trabalhos de laboratório e de campo, nada tinha de absurda ou pueril principalmente se se considerar a época em que a mesma foi enunciada, quando as investigações sobre a etiologia da "Tristeza" estavam ainda em início. E tanto é assim, que, decorridos três anos de intensivas pesquisas, é a hipótese do nematóide, pela segunda vez, posta em foco, desta feita na Argentina, ignorando os seus autores, por circunstâncias fortútas, a prioridade dos trabalhos feitos na Cadeira de Fitopatologia desta Escola. De qualquer forma eu só tenho de me ufanar de tal companhia.

Permiti-me fazer essa digressão para acabar dizendo que preferi não seguir a vossa sugestão a respeito do tema desta aula. É que o assunto lembrado seria, por sua natureza, restritivo ao interesse de uma pequena parte dêste auditório, pois se situa ainda no âmbito das teorias mais dispares e especulativas, e achei-o, por consequência, inadequado para uma aula inaugural.

Assim, optei por outro assunto de natureza mais concreta e também de finalidade mais prática para a nossa Agricultura, pósto que nada encerre de espetacular atualidade. Porém a sobre-excedente necessidade de sua divulgação e propaganda nos nossos meios agrícolas justifica sobejamente a preferência dada.

Aqui na nossa Escola, desde que sou professor, venho procurando exaltar o assunto que vai ser objeto de nossa aula de hoje, dando-lhe tão grande relêvo quanto me tem permitido o extenso programa que tenho por obrigação ministrar na Cadeira a meu cargo. Quero assim me prevalecer desta magnífica oportunidade para, retornando a um velho capítulo da Microbiologia agrícola, contribuir de alguma forma para atualizar uma matéria que entre nós tem sido relegada a plano inferior, no que diz respeito aos processos de elevação do rendimento das culturas ou manutenção da fertilidade dos solos no nosso Estado.

E dito isso à guisa de explicação, desejo agradecer de minha parte, o comparecimento das digníssimas autoridades e demais pessoas que me honraram com esse gesto de simpatia, inclusivé amigos, professores, funcionários e alunos.

AS BACTÉRIAS DOS NÓDULOS DAS RAIZES DAS LEGUMINOSAS

Introdução

Na nossa aula de hoje vamos tratar de um grupo de micróbios pertencentes às bactérias propriamente ditas e cujo papel no grande cenário da natureza que é o solo, é dos mais importantes para o homem. Antes, porém, passemos uma revista rápida por sobre a vida no solo, para depois particularizarmos a nossa exposição.

As várias formas de vida que se desenvolvem diretamente às expensas dos constituintes químicos do solo e da matéria orgânica aí existente, são extremamente numerosas e heterogêneas. (WAKSMAN). Estão incluídos aqui todos os componentes do reino vegetal, desde a milenária Sequoia com vários metros de diâmetro ou o nosso imponente jequitibá até a mais efêmera e insignificante bactéria, com poucos milésimos de milímetro de comprimento nas suas maiores formas. Assim como os animais dependem das plantas para a sua subsistência, estas dependem dos micróbios que determinam a decomposição da matéria orgânica e consequentemente promovem a liberação dos constituintes químicos assimiláveis de que elas (plantas) necessitam para o seu metabolismo. É que as atividades dos micróbios do solo completam o ciclo de vários elementos da natureza, e alguns destes, como o C e o N, de impor-

tância essencial para a vida, existem em quantidades assás reduzidas nas formas assimiláveis pelas plantas. E se não fôra a ação destruidora desses micróbios, atacando, desdobrando, decompondo ou mineralizando os complexos orgânicos inassimiláveis de que é constituída a matéria orgânica sintetizada pelas plantas ou transformada pelos animais, a crosta terrestre, no dizer de WAKSMAN, se transformaria num imenso cemitério de cadáveres indecompostos. E a vida cessaria forçosamente, pelo rápido exaurimento das formas assimiláveis daqueles elementos imprescindíveis ao metabolismo de todos os seres viventes. São, pois, os microorganismos do solo, constituindo uma população muito heterogênea e sobretudo muito densa (contando-se aos milhões por gramo de solo), que mantêm os elementos em constante circulação na natureza, possibilitando dest'arte a continuidade da vida na face da terra.

No ciclo do nitrogênio, as chamadas bactérias fixadores exercem uma ação de verdadeiro anabolismo, isto é, de construção. Como sabemos, êsse elemento, imprescindível à vida vegetal e animal, muito embora exista na natureza em quantidades enormes, pois cêrca de 4/5 partes do volume do ar que respiramos é constituído de nitrogênio elementar e, por consequência, inaproveitável pelas plantas, constitui pela escassez da forma assimilável (poucos kgs. por alqueire), um dos problemas mais sérios e de solução mais onerosa a se resolver no pertinente à manutenção e recuperação da fertilidade dos solos em geral.

Apesar da existência de jazidas de nitratos em nosso continente e da criação, em vários países, de grandes usinas para fabricação industrial de compostos nitrogenados a partir do aproveitamento do N inerte da atmosfera, os fertilizantes à base desse elemento são ainda os de preço mais elevado em relação a todos os outros. Simultaneamente precisamos também considerar o problema da matéria orgânica, cujas virtudes não é preciso encarecer, bastando dizer que ela é a base fundamental da fertilidade e da conservação da terra cultivável e que, infelizmente, vai escasseando de maneira progressiva e alarmante, particularmente em climas como o nosso, de elevada precipitação e altas temperaturas. É indiscutível a necessidade de mantê-la no solo a todo o custo. Um dos caminhos conducentes a uma solução simultânea, conquanto ainda incompleta, do problema da incorporação da matéria orgânica e da manutenção de um teor razoável de nitrogênio nos nossos solos, é o da intensificação da cultura de leguminosas, tanto para fins de adubação verde como de cultura de produção, pro-

curando tirar-se o máximo de proveito do conhecido fenômeno da fixação do N do ar levada a efeito por certas bactérias que vivem em associação nas raízes dessas plantas. Para corroborar essa asserção, quero lembrar que SCHULTZ LUPITZ, pioneiro da adubação verde na Alemanha, chegou mesmo a chamar as leguminosas de plantas acumuladores de nitrogênio, e as não leguminosas, de plantas consumidoras desse elemento.

PLANTAS QUE ENRIQUECEM O SOLO

O costume de plantar leguminosas para revigorar e enriquecer o solo era conhecido e praticado há cerca de dois milênios pelos chineses, e depois, pelos gregos e romanos, principalmente por estes últimos, que já tinham acentuado pendor pela agricultura. Sobre esse fato, várias são as observações feitas pelos escritores daquela época, como TEOFRASTES (370-285 A. C.), CATO (cerca de 200 A. C.), VARRO (116-27 A. C.), COLUMELLA e outros, que recomendavam a cultura de leguminosas tanto para a colheita direta da sua produção como para adubação verde, visando assim o melhoramento dos solos lavrados e a elevação do rendimento das plantações subsequentes de cereais. Todos, entretanto, desconheciam por completo a natureza do benefício advindo pela plantação de leguminosas, sendo suas observações estritamente empíricas, o que aliás, continuou com o perpassar dos tempos até o século 19, quando uma nova era abriu-se no campo das investigações científicas, principalmente da Química, da Botânica, da Fisiologia e da Bacteriologia. As investigações de PRIESTLEY, BOUSSINGAULT, SCHLOESING, LIEBIG, BERTHELOT e outros, representam contribuições valiosas para o esclarecimento de vários fenômenos pertinentes à nutrição nitrogenada das plantas.

Foram, entretanto, HELRIEGEL (1886) e depois HELRIEGEL e WILFARTH (1888), que anunciaram ao mundo científico a grande descoberta baseada em experiências irrefutáveis e dadas a lume em publicações que se tornaram clássicas: são os nódulos das raízes onde habitam microorganismos que conferem às leguminosas a faculdade de utilizar o N gasoso da atmosfera. Concomitantemente ficava também demonstrado que em solos esterilizados as plantas leguminosas não formavam nódulos e se comportavam exatamente como as outras plantas não pertencentes a essa família, isto é, definhavam e morriam se lhes não fosse fornecido o nitrogênio nas formas assimilá-

veis conhecidas. Posteriormente tais fatos foram confirmados à saciedade por inúmeros investigadores, ficando assim positivamente esclarecido que, quando as leguminosas eram convenientemente inoculadas, elas se desenvolviam exuberantemente mesmo em substrato privado de qualquer forma de nitrogênio.

A BACTÉRIA

BEIJERINCK, na Holanda, conseguiu, pela primeira vez, isolar em meio cultural artificial, as bactérias existentes nos nódulos, dando-lhes o nome de **Bacillus radiclecola**.

A questão da nomenclatura, bem como de certos aspectos da morfologia das bactérias dos nódulos têm sido objeto de muita discussão e, ainda hoje, não é assunto pacífico. Tanto é assim, que muitos bacteriologistas preferem chamá-las geralmente de "bactérias dos nódulos", evitando assim o emprêgo da designação binomial latina, conforme mandam as regras internacionais de nomenclatura. Todos os pesquisadores, porém, estão acordes em que as bactérias encontradas nas diversas espécies de leguminosas apresentam característicos distintivos na morfologia, fisiologia, meios culturais, habitat, etc., formando assim raças ou melhor espécies, cada uma delas com a faculdade mais ou menos limitada de só produzir infecção em um certo número de plantas leguminosas quase sempre estreitamente aparentadas. Assim, por meio de inoculações feitas nas diferentes espécies de leguminosas, foi possível a separação em o que se convencionou chamar "grupos de inoculação cruzada". Reconhecem-se hoje vários dos chamados "grupos de inoculação cruzada", cada um tendo a sua bactéria específica, capaz de produzir infecção e, por consequência, dar formação a nódulos em tôdas as plantas do mesmo grupo, porém incapaz de o fazer nas plantas de outros grupos.

BERGEY et al. em seu "Manual of Determinative Bacteriology" — 1939 — aceitando a opinião de vários bacteriologistas, colocam as bactérias dos nódulos no Gênero **Rhizobium**, família Rhizobiaceae da ordem Eubacteriales, tendo como espécie tipo o **Rhizobium leguminosarum** Frank.

Segue-se um quadro dos principais grupos de inoculação cruzada e das espécies de bactérias correspondentes:

1 — **Rhizobium leguminosarum** Frank.

Bactérias que determinam formação de nódulos nas raízes da Ervilha (**Pisum sativum**), Fava (**Vicia faba**) e Lentilha (**Lens esculenta**).

2 — **Rhizobium trifolium** Dangeard.

- Bactérias que determinam a formação de nódulos nas raízes do trevo (*Trifolium Spp.*)
- 3 — **Rhizobium phaseoli** Dangeard.
Bactérias que determinam formação de nódulos nas raízes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, *Ph. augustifolia*, *Ph. multiflorus*.)
- 4 — **Rhizobium meliloti** Dangeard.
Bactérias que determinam formação de nódulos nas raízes da alfafa (*Medicago sativa*, *M. falcata*, etc) e de várias espécies de *Melilotus*.
- 5 — **Rhizobium japonicum** Kirchner.
Bactérias que determinam formação de nódulos nas raízes da soja (*Soja max*), incluindo-se aqui, possivelmente o grupo do cowpea (*Vigna sinensis*) amendoim (*Arachis hipogea*), *Mucuna* (*Stizolobium spp.*) etc. e ainda o grupo do tremoço (*Lupinus spp.*) e seradela (*Ornithopus sativus*).

Eis a descrição do gênero **Rhizobium** dada por BERGEY et al.:

Aeróbios obrigados capazes de produzir nódulos nas raízes de plantas leguminosas e cuja simbiose resulta comumente na fixação de nitrogênio atmosférico, o qual se torna assimilável à planta hospede. Bastonetes Gram — negativos 0,5 — 0,9 x 1,2 — 3,0 microns; móveis quando novos, transformando-se frequentemente em formas bacterioides sobre: a) meios culturais contendo alcalóides, glucosídeos ou nos quais a acidez é elevada e b) durante a simbiose no interior do nódulo. Temperatura ótima 20° C. Heterotróficos. A adição de extratos de leveduras, de malte ou de plantas favorece o seu rápido desenvolvimento nos meios artificiais. Fraca produção de nitritos a partir de nitratos; não utiliza nitritos. Não liquefaz a gelatina ou o faz fracamente depois de prolongada incubação.

A espécie tipo é **Rhizobium leguminosarum** Frank.

As bactérias dos nódulos compreendem um grupo de Schizomicetos em que o chamado pleomorfismo é deveras acentuado, o que aliás, é observado tanto nos nódulos como nos meios culturais. As formas cocóides, as nadadoras, as de bastonetes, etc. bem como as formas bacterioides caracteristicamente vacuoladas ou ramificadas, representam bem as transformações morfológicas principais por que passam os membros desse grupo durante o seu ciclo evolutivo. Muitos dos bacteriologistas da atualidade que se têm dedicado ao estudo da morfologia das várias espécies de **Rhizobium**, são de opinião que os bacterioides são formas vivas e fazem parte do ciclo vital dessas bactérias,

não obstante haver, ainda, nesse particular, tremenda divergência.

Todos os seres organizados da natureza, têm um ciclo vital mais ou menos complexo. E essa complexidade é, muitas vezes, tanto maior, quanto mais se desce na escala botânica ou zoológica. É portanto razoável que as bactérias, de uma maneira geral, tenham também o seu ciclo vital. A extrema pequenez de suas formas, é verdade, tem dificultado sobremaneira o seu estudo. Neste particular, é interessante lembrar a acirrada controvérsia que teve lugar nos primórdios da Bacteriologia, entre os ferrenhos pleomorfistas que acreditavam que um coccus poderia daí a instantes transmudar-se em bacillus e logo depois em spirillum, e os intransigentes monomorfistas que não admitiam mudança alguma nas formas essenciais das bactérias. A razão, como sóe acontecer muitas vezes, não estava nem com um nem com outro grupo, e o ciclo de vida como é admitido pela maioria dos bacteriologistas contemporâneos, seria a explicação mais plausível aos fatos que motivaram aquelas divergências.

Não obstante vários investigadores, modernamente, terem apresentado observações mais circunstanciadas, conquanto ainda discutíveis, a respeito do ciclo vital das bactérias dos nódulos, prefiro dar aqui, como medida de prudência pedagógica, a antiga descrição de BEWLEY e HUTCHISON, modificada por THORNTON e GANGULEE. É que, como se diz, nem sempre é aconselhável vestir-se pelo último figurino, chegado pelo último avião, mas aguardar as exhibições, a ver em que pararam as modas.

FORMAÇÃO, MORFOLOGIA E HISTOLOGIA DOS NÓDULOS

Embora fôsse de meu desejo aduzir aqui algumas observações próprias realizadas na Cadeira de Fitopatologia, não poderei entrar em discussão pormenorizada dêste tópico, visto escapar à finalidade da presente aula. Vou resumir assim a matéria no que ela encerra de mais essencial.

As bactérias do género *Rhizobium* podem levar uma existência livre no solo por muito tempo.

O mecanismo exato da infecção, isto é, a penetração das bactérias nas raízes da planta hospedeira, é ainda pouco conhecido. Acredita-se que tal penetração se processe na região apical dos pêlos absorventes ou por outras células epidérmicas. Por intermédio de enzimas especiais as bactérias provocam a

dissolução das paredes de tais células, ganham acesso no interior do pêlo onde entram em rápida multiplicação.

A primeira evidência da reação da planta logo após a inoculação vem a ser uma curvatura característica da extremidade do pêlo da raiz, fato êsse, aliás já observado por WARD em 1887. Em seguida nota-se a formação dos chamados "filamentos de infecção" que são "cordões" contendo bactérias, e que avançam em direção à base do pêlo, depois através das camadas do parênquima do córtex da raiz, continuando frequentemente o seu desenvolvimento até atingirem as células exteriores ao endoderma. Estas estimuladas entram em franca hiperplasia, isto é, em ativa divisão celular, dando-se dest'arte início à formação do nódulo. Neste ponto os filamentos de infecção ramificam-se e invadem as células circunjacentes em várias direções, libertando durante o seu percurso inúmeras bactérias no citoplasma desses elementos. Postas em liberdade, tais bactérias multiplicam-se abundantemente, enchendo praticamente tóda a cavidade celular dos tecidos atingidos e determinando aí fenômenos típicos de hipertrofia. Como resultado dos fenômenos conjuntos de hiperplasia e hipertrofia dos constituintes dos tecidos afetados, o parênquima cortical e a epiderme envolvente são empurrados para fora, formando-se assim na raiz uma entumescência lateral — o nódulo.

Este consiste, em última análise, de uma massa de células parenquimatosas hipertrofiadas de paredes finas, ricas em proteínas, e onde, em grande parte habitam as bactérias. O tecido meristemático renascente que se situa na extremidade do nódulo ou envolvendo tóda a área bacterioidal, sendo constantemente estimulado, determina pela ativa divisão de suas células, o crescimento dessa estrutura. A chamada área bacterioidal ocupa a maior porção dos tecidos dos nódulos maduros. Envolvendo o meristema está a camada do córtex do nódulo que por sua vez é envolvido pelos remanescentes dos tecidos do córtex da raiz, e cujas células comumente se apresentam distendidas ou dilaceradas pela pressão oriunda do contínuo crescimento interno do nódulo.

Feixes liberianos e lenhosos ligados ao sistema vascular geral da planta, percorrem o córtex do nódulo garantindo assim o suprimento de açúcares e outros alimentos aos constituintes dessa estrutura e às suas bactérias e servindo, ao mesmo tempo, de via de transporte aos compostos nitrogenados aí manufaturados os quais irão ser utilizados, em troca, pela planta hóspede. Alcançando plena maturidade, as células dos nódulos

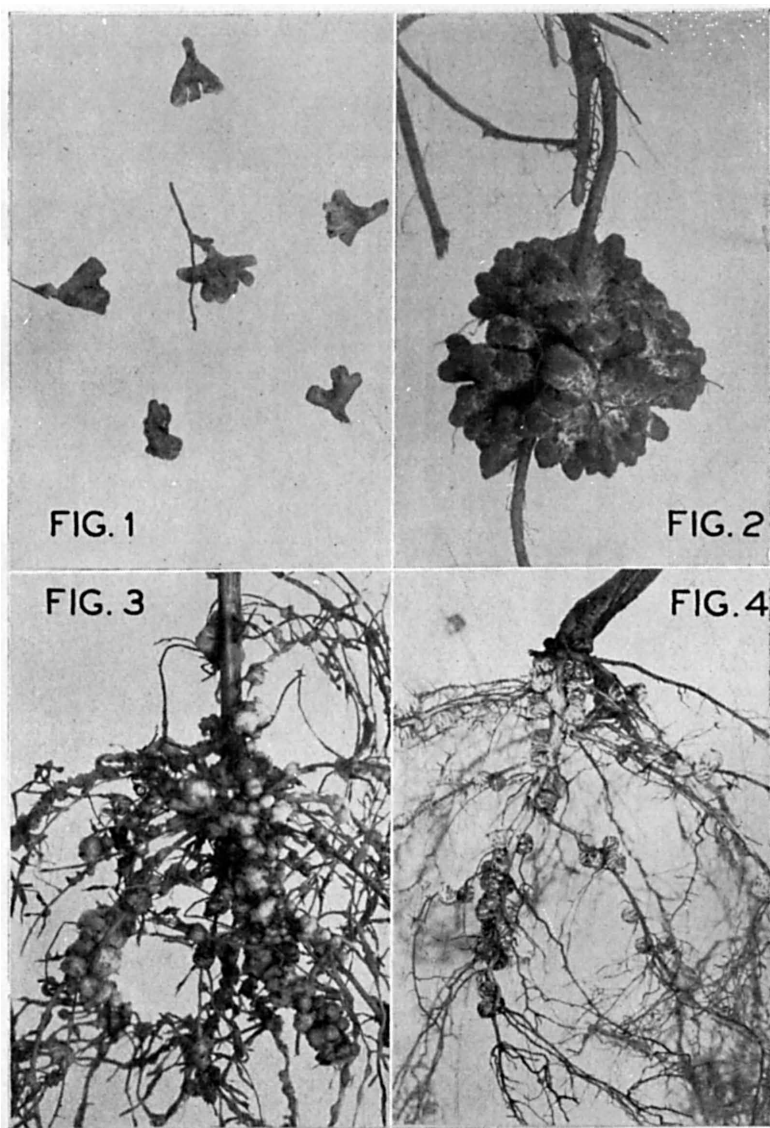


Fig. 1 — Nódulos da raiz da Alfafa produzidos pelo *Rhizobium meliloti*. Aprox. $\times 21/2$. — Fig. 2 — Nódulo da raiz da *Mucuna* produzido por *Rhizobium* sp. Tamanho natural. — Fig. 3 — Galhas nas raízes da Soja produzidas pelo nematóide *Heterodera marioni*. Tais estruturas poderiam ser, por inadvertência, confundidas com os nódulos causados pelas bactérias fixadoras de N atmosférico. Tamanho natural. — Fig. 4 — Nódulos da raiz da Soja produzidos pelo *Rhizobium japonicum*. Aprox. $\times 2$. — Foto: R. S. Carvalho.

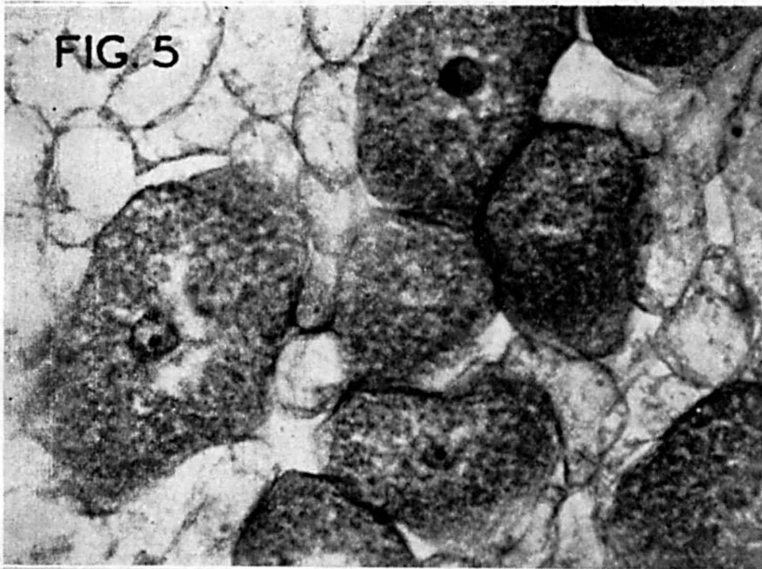


Fig. 5 — Porção de um corte feito no nódulo da Soja, mostrando as células hipertrofiadas e cheias de bactérias (*R. japonicum*), ao lado de células normais. Cortado em parafina, coloração triplíce de Flemming e fotomicrografado com filtro verde. x 700. — Fig. 6 — Culturas de boas linhagens das bactérias dos nódulos (tipo comercial) em frascos de 250 cc. distribuídos pela 11.ª Cadeira. 1/3 do tamanho natural. — Foto: R. S. Carvalho.

los perdem gradativamente a vitalidade, caindo o teor de seus compostos nitrogenados, que anteriormente era bastante elevado, a praticamente a mesma taxa existente em todo o sistema radicular. Finalmente o nódulo apresenta fendilhamentos na sua estrutura externa e entra em desintegração, libertando no sólo um grande número de bactérias que irão levar uma existência livre, até que, lhes sendo propiciada nova oportunidade penetram nas raízes de alguma leguminosa do mesmo grupo de inoculação cruzada. E' por isso que, muitas vezes, a repetição de uma determinada cultura de leguminosa num mesmo solo, acarreta beneficio apreciável, tanto em desenvolvimento como em produção, para a segunda plantação, graças a uma melhor e mais abundante nodulação das raízes de suas plantas, resultante do elevado número de bactérias deixado na terra pela cultura anterior.

O tamanho, forma e posição dos nódulos variam, como é sabido, nas diferentes plantas leguminosas. Na alfafa são pequenos e digitiformes, solitários e agregados; na soja são já maiores, mais ou menos esféricos e raramente agrupados. Na mucuna apresentam-se como grandes esféricos e agregados às vezes de forma esférica com alguns centímetros de diâmetro.

A maioria absoluta das representantes da grande família Leguminosae possuem nódulos em suas raízes formados pelas bactérias específicas dos respectivos grupos de inoculação cruzada. Somente umas poucas espécies constituem exceções a esse respeito (*Gynnocladus dioica*, *Cassia barclayana*) etc.

Elevado teor de nitratos ou de sais de amônio no solo, retardam ou impedem mesmo a formação de nódulos. Tal influência desfavorável à infecção bacteriana é devida, em grande parte, ao fato das leguminosas poderem utilizar diretamente o nitrogênio numa forma de fácil assimilação e ainda por outros motivos pouco conhecidos. Todavia, vários carboidratos e certos ácidos orgânicos no solo, assim como um baixo teor de nitratos, exercem uma influência bastante favorável à formação e desenvolvimento dos nódulos.

A SIMBIOSE

O termo simbiose, segundo a interpretação científica, significa a vida em comum de dois organismos diferentes e, cuja associação, resulta em beneficio recíproco para ambos os simbiossantes. Trata-se por consequência de um verdadeiro caso de mutualismo. Um exemplo típico de simbiose ou mutualismo é a associação das bactérias do gênero *Rhizobium* com as plantas

da família das leguminosas. Entretanto nem sempre tal associação resulta em simbiose verdadeira. Muitas vezes poderá haver casos de parasitismo típico, uma vez que nem tôdas as raças de tais bactérias são eficientes como fixadoras de nitrogênio, não obstante possuírem a faculdade de produzir nódulos em abundância.

Os trabalhos de THORNTON, em Rothamsted, os de STEVENS e de WRIGHT nos Estados Unidos, e de outros ainda, mais recentemente, vieram demonstrar de maneira marcante, a importância prática das boas linhagens de bactérias dos nódulos na inoculação de solos onde prevalecem as de linhagens ineficientes. Ficou também evidenciado que as melhores linhagens de bactérias produzem nódulos grandes, em menor número, quase sempre localizados na parte superior do sistema radicular, enquanto que, as raças menos eficientes ou ineficientes de todo, produzem nódulos pequenos e numerosos distribuídos em todo o sistema radicular. Uma observação de interesse prático, é a relatada por LEONARD (1930) sobre o fracasso de uma cultura de ervilhas e cuja causa foi atribuída a uma raça parasítica de *Rhizobium leguminosarum*. Na cultura em questão, havia poucas manchas em que as plantas se desenvolveram bem, a maior parte delas, entretanto, se apresentavam amareladas e raquíticas. Nesse terreno não se havia feito inoculação alguma, bem como, não havia sido cultivado nos seis anos anteriores com nenhuma leguminosa do mesmo grupo de inoculação cruzada da ervilha. Nas plantas sadias notava-se uma nodulação vigorosa enquanto que as doentias apresentavam um elevado número de nódulos, pequenos e espalhados por todo o sistema radicular. Procedido o isolamento das bactérias de ambos os tipos de plantas e as provas necessárias, verificou-se que as bactérias oriundas das plantas sãs eram de linhagens eficientes enquanto que as das plantas doentias eram de linhagens parasíticas ou não eficientes.

O mecanismo da fixação do N bem como o papel que cada um dos simbiossitos desempenha em tal processo, são ainda desconhecidos em grande parte.

Foi constatado em repetidas análises de plantas leguminosas que na primeira fase do seu ciclo, o sistema radicular apresentava uma taxa mais elevada de nitrogênio em relação à parte aérea, ao passo que, fenômeno inverso, era observado no final desse ciclo. Não padece dúvidas de que a planta utiliza-se do nitrogênio fixado nos nódulos. A transformação por que passa esse elemento depois de fixado, bem como o processo

de sua utilização pela planta hospedeira, são ainda objeto de disputa.

A presença de bacteriófagos nos nódulos indica a possibilidade de uma ação lítica, específica sobre os próprios bacterióides de modo a provocar a liberação de uma forma de nitrogênio assimilável à planta. É grande já o número de trabalhos feitos recentemente nesse sentido. Sendo de meu propósito, como já foi dito, dar uma visão geral do assunto desta palestra, não me deterei, também aqui, nos pormenores.

O fato é que os nódulos vão sendo esvaziados à proporção que a planta se desenvolve. O teor de nitrogênio nessas estruturas diminui também progressivamente à medida que se processa a formação das sementes, até ficar, por ocasião do amadurecimento destas, reduzido a praticamente a mesma taxa existente no resto do sistema radicular.

Parece fora de dúvida que o fenômeno de fixação do N tem início logo após a formação dos nódulos, continuando tal processo até suas células constitutivas perderem a vitalidade ou a planta cessar seu desenvolvimento ativo.

Tem sido observado também, que na primeira fase do desenvolvimento da planta, logo depois de esgotadas as últimas reservas de nitrogênio da semente germinada, ela frequentemente passa por um período de fome que se manifesta exteriormente por sintomas de sub-nutrição (clorose) até que, com a formação dos nódulos nas suas raízes, e por conseguinte com o suprimento de nitrogênio daí advindo, ela entra numa fase de recuperação ativa, exibindo novamente o vigor e o colorido normal de sua folhagem.

IMPORTANCIA ECONÔMICA DA FIXAÇÃO DO N

A importância econômica da fixação do N pelas bactérias dos nódulos das leguminosas é notória e indiscutível.

Desde a antiguidade, embora com desconhecimento completo da natureza do fenômeno, os agricultores auferiam benefícios, cultivando leguminosas para enriquecer o seu solo e aumentar o rendimento da cultura de cereal subsequente. Praticavam também a cultura intercalar, associando leguminosas com cereais, visando o mesmo objetivo.

Posteriormente as numerosas experiências vieram demonstrar de maneira a mais concludente que o fenômeno de fixação que tem lugar nos nódulos das raízes das leguminosas, resultante da interação da planta e das bactérias, acarreta benefícios reais e apreciáveis para a agricultura.

Vários fatores exercem marcante influência na quantidade de N tomada do ar, como por exemplo, a espécie de leguminosa cultivada, a maior ou menor eficiência da linhagem da bactéria inoculada, umidade, temperatura, reação do solo, teor em nitratos e sais de amônio, quantidades adequadas de Ca e P existentes no solo, etc..

Sem dúvida, tem havido por parte de muitos investigadores, uma tendência para sobreestimar a quantidade de N fixado com o concurso das bactérias dos nódulos, nas diferentes culturas de leguminosas. Assim, muitos deles relatam ganhos fabulosos de nitrogênio fixado do ar, quando, na verdade, esses dados representam o nitrogênio total retirado simultaneamente do ar e do solo.

Supõe-se que em condições ideais de fixação a planta obtenha aproximadamente 1/3 do N do solo e 2/3 do N do ar. Sob condições normais, pode-se considerar como média razoável para cultura de muitas leguminosas, uma fixação de 135 a 140 kgs. de N por alqueire de 24.200 m²., (cêrca de 55 kgs. por hectare). Isso seria equivalente a uma adubação com aproximadamente 900 kgs. de salitre do Chile para a mesma unidade de superfície, na suposição de que tóda a cultura fôsse incorporada ao solo. Com a remoção da parte aérea, como colheita, é evidente que a maior porção de nitrogênio será retirada também. É portanto uma ilusão pensar-se que culturas sucessivas de leguminosas num mesmo solo, com a remoção total da parte aérea, resultarão em enriquecimento do solo em nitrogênio. O benefício da fixação, neste caso, se refletirá somente na produção (aumento de rendimento ou elevação do teor protéico da colheita), o que, convenhamos, já não é pouco, pois se tal não se desse, a cultura poderia redundar em fracasso.

A INOCULAÇÃO

Em 1887, na Estação Experimental de Bremen, foi relatado pela primeira vez o sucesso de uma inoculação de bactérias dos nódulos pela transferência de solo de uma antiga cultura de *Trifolium* para um terreno tido anteriormente como inadequado para essa e outras leguminosas. Inúmeras outras experiências vieram corroborar aquêle fato, entrando, assim, a prática da inoculação de solos, a exercer um papel preponderante nas culturas de leguminosas.

Em 1896, NOBBE e HILTNER apresentaram ao mundo o resultado de suas longas e bem conduzidas experiências, anunciando o emprêgo de culturas puras de bactérias dos nódulos

para a inoculação de sementes de leguminosas ou de uma porção de terra a ser distribuída no terreno destinado ao seu plantio. Desde aí, ficou cientificamente evidenciado que são notórios e apreciáveis os benefícios advindos de uma apropriada inoculação em terreno novo destinado a uma leguminosa, uma vez que, como é óbvio, todos os outros fatores atuam também favoravelmente.

Outras vezes, o benefício auferido de uma inoculação bem processada, é menos aparente e impressionável, conquanto nada desprezível, pois pode revelar-se unicamente por um aumento na taxa de proteína do produto colhido. Várias experiências com culturas de ervilha e de alfafa demonstraram ser tal aumento bastante acentuado, dando um produto mais rico em matéria nitrogenada, o que quer dizer, de preço mais elevado, justificando assim, economicamente, a prática da inoculação.

A inoculação por si só, entretanto, não opera milagres.

Inúmeros têm sido os fracassos observados, dada a complexidade dos fatores intercorrentes do processo. Neste particular, convém insistir sobre o fato de que, o êxito de uma inoculação processada por quaisquer dos métodos conhecidos, depende em grande parte, além das condições inerentes à bactéria propriamente dita, e já mencionadas atrás, de certos fatores do solo, sobrelevando-se em importância, a reação favorável, o baixo teor em nitratos, presença de cálcio e fósforo em quantidades adequadas etc.

Há dois processos gerais de inoculação :

1.º — o de transporte de terra rica em bactérias.

2.º — o de culturas puras em meios artificiais.

O método de transporte de terra consiste em se espalhar, por vários meios, no terreno destinado a nova plantação, uma certa porção de terra (geralmente de 900 a 1.200 kgs. por alqueire paulista) retirado de um lote em que anteriormente se cultivou com sucesso uma leguminosa do mesmo grupo de inoculação cruzada. Este método tem encontrado por parte de muitos técnicos e agricultores o mais decidido apoio. De fato, se se lançar um olhar retrospectivo pela história da inoculação das bactérias dos nódulos, vamos verificar, sem muito trabalho, que o método de transporte de solo é o que menos insucesso tem apresentado no decorrer de uma disputadíssima prova com o das culturas artificiais.

Contudo, pode-se dizer, apoiado por várias autoridades no assunto, que o método em questão deixa muito a desejar sob o ponto de vista técnico-científico. Ainda a respeito de seu em-

prêgo generalizado se antepõem razões de ordem vária, como por exemplo, o elevado custo do transporte e distribuição da terra inoculante, a perigosa disseminação por essa via, de pragas e doenças ou de sementes ou outros órgãos de propagação de ervas daninhas.

Várias outras modalidades dêste método têm sido postas em prática, visando obviar os vários inconvenientes atrás apontados.

MÉTODOS DAS CULTURAS ARTIFICIAIS

Como vimos, foram NOBBE e HILTNER na Alemanha, que, depois de longos ensaios de laboratório e de campo, apresentaram ao mundo sob o nome sugestivo de "Nitragina", 17 tipos de culturas puras das bactérias dos nódulos, cultivados em meio de gelatina, açúcar, asparagina e extratos de plantas leguminosas, e acondicionados em frascos de 250 cc. Foram tiradas algumas patentes da descoberta e logo o comércio da Nitragina se difundiu rapidamente por vários países, alcançando o produto singular celebridade dentro e mesmo fora dos círculos agrônômicos. Entretanto o seu fastígio não foi duradouro. Logo apareceram as primeiras provas de que ela falhava em muitos casos. E essas provas foram se acumulando de tal forma que solaparam o prestígio da Nitragina completamente. E a sua queda, no conceito científico, foi tão espetacular como espalhafatosa havia sido a sua ascensão. Os seus autores, entretanto, não se deram por vencidos, e continuaram a lutar infatigavelmente no campo da ciência, sobrepondo sempre a verdade desta, aos de mesquinhos interesses comerciais.

Muitos outros produtos similares apareceram no comércio sob diferentes nomes e todos os seus fabricantes, faziam propaganda mais ou menos exagerada. Na prática, entretanto, os resultados obtidos continuavam a ser discrepantes. E creou-se, como não podia deixar de ser, uma prevenção aliás justificável contra o método das culturas artificiais, preferindo muitos agricultores, como medida de precaução, o emprêgo do antigo processo de inoculação pelo transporte de terra.

Com o perpassar dos anos, todavia, muitos conhecimentos novos foram se acumulando, principalmente no concernente à fisiologia dessas bactérias, à existência e seleção de linhagens eficientes, emprêgo de meios culturais adequados, conhecimentos êsses, que vieram possibilitar grandes melhoramentos na técnica da preparação e emprêgo das culturas artificiais.

E com isso, tal processo começou a recobrar o antigo prestígio desfrutado nos primórdios de sua introdução. E na nossa opinião, que é também a de muitas autoridades, êle recuperá-lo-á integralmente. Pensamos mesmo que, tudo se resume numa questão de aperfeiçoamento de técnica cultural e de inoculação. E, como só é possível a seleção de linhagens eficientes, com o auxilio da técnica bacteriológica, segue-se que, apesar de todos os percalços, o método das culturas é o que mais vantagens oferece na utilização pelo homem do fenômeno da fixação biológica do nitrogênio gasoso.

E para finalizar esta preleção, cumpre-me chamar a atenção de todos, para o quase total desinterêsse que se nota em nosso Estado e quiçá no Brasil pela prática da inoculação nas culturas das leguminosas. Será que a maioria dessas culturas não se beneficiaria com a adição de mais nitrogênio? Ou será, por outro lado, que todos os nossos solos são o paraíso das boas linhagens das diferentes espécies de *Rhizobium*? Sem dúvida, não é êste o caso.

Nos Estados Unidos, o interêsse dos agricultores pela inoculação de suas culturas de leguminosas, é enorme. Em 1933, dezenas de companhias particulares se dedicavam à manufatura de culturas para fins de inoculação, não se contando as muitas Estações Experimentais e Colégios de Agricultura. Calculou-se que, em um só ano foram distribuídas cerca de 1.500.000 culturas naquela grande República. E entre nós?

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" tem procurado dar o devido realce a êsse assunto. As sucessivas turmas de alunos que têm passado pela 11.a Cadeira, nestes últimos 17 anos, procederam o isolamento e culturas de várias espécies de *Rhizobium* segundo a melhor técnica conhecida. Distribuimos várias dessas culturas com os melhores resultados. Uma delas, de *Rhizobium meliloti*, enviada em 1942 ao Dr. Carlos Alves Neves, agrônomo do Ministério da Viação, sediado em Pernambuco, apresentou resultados magníficos nas culturas de alfafa daquele Estado, segundo comunicação oficial, enviada a esta Escola, por aquêle nosso colega.

O nosso país, e principalmente o nosso Estado, apresentam condições ideais para a cultura de muitas leguminosas em grande escala. A soja, os feijões e as ervilhas, constituem produtos de alto valor econômico na agricultura de muitos países. O incremento dessas, e de outras culturas de leguminosas, poderia constituir, num curto lapso de tempo, um dos fatores tendentes a aliviar a fome que, desgraçadamente, impera de ma-

neira generalizada em todo o mundo, e a fortalecer, ao mesmo tempo, os alicerces combalidos de nossa economia.

E as palavras de FRED et al. são para nós brasileiros bastante oportunas.

"The thousands of papers which have been written upon their habits and characteristics surely indicate that the Leguminosae are felt to be of prime significance; of significance, indeed, not only to the scientist but to those who feed the world and to those who are fed as well; for it is no exaggeration to say that a comprehension of the root nodule bacteria and their association with the Leguminosae would disclose to the world the basic principle of soil fertility".