



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BIANA HARUMI KUWANO

**ENCARQUILHAMENTO FOLIAR EM SOJA (*GLYCINE MAX*
(L.) MERR.) NO PARANÁ:
FATORES ENVOLVIDOS E POSSÍVEIS CAUSAS**

Londrina
2017

BIANA HARUMI KUWANO

**ENCARQUILHAMENTO FOLIAR EM SOJA (*GLYCINE MAX*
(L.) MERR.) NO PARANÁ:
FATORES ENVOLVIDOS E POSSÍVEIS CAUSAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Adônis Moreira.

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Kuwano, Biana Harumi .

ENCARQUILHAMENTO FOLIAR EM SOJA (GLYCINE MAX (L.) MERR.) NO PARANÁ:
FATORES ENVOLVIDOS E POSSÍVEIS CAUSAS. / Biana Harumi Kuwano. - Londrina, 2017.
72 f.

Orientador: Adônis Moreira.

Co-orientador: Marco Antonio Nogueira.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Bactérias oxidantes e redutoras de Mn - Tese. 2. Atividade microbiana - Tese. 3. Diversidade microbiana - Tese. 4. 16S DNAr - Tese. I. Moreira, Adônis. II. Nogueira, Marco Antonio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

BIANA HARUMI KUWANO

**ENCARQUILHAMENTO FOLIAR EM SOJA (*GLYCINE MAX* (L.)
MERR.) NO PARANÁ:
FATORES ENVOLVIDOS E POSSÍVEIS CAUSAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutora em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Adônis Moreira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antonio
Nogueira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Osmar Rodrigues Brito
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gustavo Adolfo de Freitas Fregonezi
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Dr^a. Adriana Pereira da Silva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Cristiane Alcantara dos Santos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de Fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho aos meu avós:
Hermínio Correia, Choji Kuwano e Ine
Kuwano (In memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades que tive, pela força necessária para conclusão de mais esta etapa e, principalmente, pelas pessoas que colocou ao meu lado.

À minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã, que me deram suporte em todas as etapas concluídas até aqui. Agradeço as lições, a educação e o amor que nunca me faltou.

Ao meu esposo, Luann, pelo companheirismo, amor e paciência.

Aos meus orientadores, Adônis Moreira e Marco Antonio Nogueira, pelo exemplo de mestre e pesquisador. Obrigada, pela orientação, conhecimento, paciência, motivação e principalmente pela amizade.

Aos professores, Osmar Rodrigues Brito, Gustavo Adolfo de Freitas Fregonezi e Cristiane Alcantara dos Santos que colaboraram com a minha formação profissional.

À Dra. Mariangela Hungria pela colaboração desde o início do projeto e também pelo exemplo de pessoa e profissional.

Aos membros da banca pelas contribuições ao trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos amigos: os próximos, os distantes, os novos, os antigos, os da graduação e os da pós-graduação, que me auxiliaram tornando cada momento mais leve e alegre.

Às minhas amigas-irmãs, Carolina e Thamara, que me acolheram em suas famílias. Obrigada pelas conversas, os puxões de orelha, as risadas e as lágrimas que compartilhamos.

Aos colegas de laboratório, da UEL e da Embrapa, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, e também pelo conhecimento profissional que adquiri com o convívio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho e para minha formação.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

(Claude Lévi-Strauss)

KUWANO, Biana Harumi. **Encarquilhamento foliar em soja (*Glycine max* (L.) Merr.) no Paraná: fatores envolvidos e possíveis causas.** 2017. 72 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Áreas produtoras de soja (*Glycine max* L. Merr.) no Paraná têm apresentado plantas com sintomas de encarquilhamento foliar, semelhante a toxicidade de Mn, com redução de porte, geralmente observados em reboleiras. O objetivo desse trabalho foi analisar propriedades químicas e microbiológicas do solo relacionadas à ciclagem de Mn e investigar se a alta disponibilidade desse nutriente pode ter causado o encarquilhamento foliar em áreas comerciais de soja. Foram coletadas amostras de solo e planta em áreas de reboleiras com sintomas e áreas sadias adjacentes de nove propriedades na safra 2012/13 e três na safra 2013/14. Na parte aérea das plantas foram determinados: a massa seca e os teores foliares de P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn. As amostras de solo foram coletadas nas profundidades de 0-5, 5-10, 10-20 e 20-40 cm, secas ao ar e analisadas quanto ao pH (CaCl₂), C orgânico, P disponível, Ca, Mg, K, Al, H+Al, soma de bases, CTC, saturação por bases, teores de B, Cu, Fe, Mn e Zn. As análises microbiológicas foram realizadas nas amostras de solo de 0-5, 5-10 cm e na rizosfera. Foram avaliados o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias oxidantes e redutoras de Mn, sendo que os isolados representativos tiveram a região rDNA 16S sequenciada para identificação. O C da biomassa microbiana (CBM), a respiração basal e colonização micorrízica também foram avaliados. As plantas com encarquilhamento foliar apresentaram redução na massa da parte aérea e na produtividade de grãos. Em adição, apresentaram teores foliares mais elevados de P, Ca, Mg, Mn e B e menores teores de K. No solo das áreas sem sintomas, a SB, a CTC, os teores de Ca, Mg e Fe (0-5 cm) foram maiores, enquanto os teores de P e Zn (10-20 cm) foram mais baixos. Na safra 2012/13, o CBM foi significativamente maior nas áreas sem sintoma de encarquilhamento foliar. O número de UFC de bactérias oxidantes de Mn foi maior no solo da área sem sintomas (0-5 cm, rizosfera) enquanto que o número de bactérias redutoras foi maior na área com sintomas. A maior população de bactérias redutoras de Mn da área com sintomas coincidiu com maiores teores de Mn na planta, ligeiramente superiores aos encontrados nas plantas sem sintomas. Entre as bactérias redutoras de Mn, predominou o gênero *Streptomyces* enquanto diversos gêneros representaram as bactérias oxidantes de Mn: *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Novosphingobium*, *Agrobacterium*, *Variovorax*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. O teor de P diferiu entre as áreas tanto no solo como na planta, enquanto os teores de Ca e Mg diferiram apenas no solo, sugerindo que o sintomas podem não estar relacionados a um nutriente em particular, mas pode ser o resultado da interação de vários fatores. Apesar de os teores de Mn na planta e no solo, tanto nas áreas com sintomas como nas áreas sem sintomas serem considerados altos, não foram apontados como causa direta do problema. É provável haver uma interação multifatores na manifestação dos sintomas que precisa ser mais bem estudada.

Palavras-chave: Atividade microbiana. 16S DNAr. Micorriza. Bactérias oxidantes e redutoras de Mn. Diversidade microbiana.

KUWANO, Biana Harumi. **Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) leaf crinkle in Paraná State: factors involved and possible causes.** 2017. 72 p. Thesis (Doctoral Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* L. Merr.) producing fields in Paraná State have presented plants with leaf crinkle, similar to symptoms of Mn toxicity, resulting in growth reduction, generally observed in spots. The aim of this work was to analyze soil chemical and microbiological properties related with Mn cycling and investigate if high amounts of this nutrient have caused the “crinkle leaf” in commercial areas of soybean. Soil and plant samples were collected in spots with symptoms and adjacent healthy areas of nine fields in 2012/13 season and three in 2013/14 season. In the shoots, the dry weight and foliar concentrations of P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn and Zn were determined. Soil samples were collected at depths of 0-5, 5-10, 10-20 and 20-40 cm, air-dried and analyzed for pH (CaCl₂), organic C, available P, Ca, Mg, K, Al, H + Al, Sum of bases, CEC, base saturation, B, Cu, Fe, Mn and Zn concentrations. Microbiological analyzes were carried out in soil samples from 0-5, 5-10 cm and rhizosphere. The number of colony forming units (CFU) of oxidizing and Mn reducing bacteria was evaluated, and the most representative isolates had the 16S rDNA region sequenced for identification. Microbial biomass C (MBC), basal respiration and mycorrhizal colonization were also assessed. Plants with foliar crinkling presented lower shoot dry weight and grain yield. In addition, showed higher foliar concentrations of P, Ca, Mg, Mn and B, and lower concentrations of K. The values of SB, CEC, Ca, Mg and Fe concentrations (0-5 cm) were higher in the soil of plants without symptoms, whereas P and Zn (10-20 cm) were lower. In the 2012/13 season, MBC was significantly higher in the soils of plants without symptoms. The number of CFUs of Mn-oxidizing bacteria was higher in the soil of the symptomless area (0-5 cm, rhizosphere), whereas the number of Mn-reducing bacteria was higher in the area with plants showing symptoms. The largest population of Mn-reducing bacteria in the area with symptoms coincided with slightly higher concentrations of Mn in plant leaves, compared with plants without symptoms. The genus *Streptomyces* predominated among the Mn-reducing bacteria, while several genera represented the Mn-oxidizing bacteria: *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Novosphingobium*, *Agrobacterium*, *Variovorax*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*. The P concentrations differed between both soil and plants, while Ca and Mg differed only in the soil, suggesting that the symptom may not be related to a particular nutrient, but may depend on the interaction between several factors. Despite the concentrations of Mn in plants and in the soil are considered high, they could not be considered the sole cause of the problem. A multifactorial interaction probably occurs and must be more deeply studied.

Keywords: Microbial activity. 16S rDNA. Mycorrhiza. Mn-reducing and Mn-oxidizing bacteria. Microbial diversity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** – Massa seca de parte aérea de 5 plantas em g (A) e produtividade em kg ha⁻¹ (B) de plantas de soja com e sem sintoma de encarquilhamento foliar, na média das safras 2012/13 e 2013/1442
- Figura 3.2** – Análise de componentes principais de atributos químicos (pH, Carbono orgânico-Corg, Al, H+Al, Ca/Mg, Ca, Mg, P, K, SB, CTC, V%, Cu, Mn, Fe, Mn em Mehlich I, Mn em DTPA e Zn) e microbiológicos (respiração basal, colonização micorrízica e UFC de microrganismos oxidantes e redutores de Mn, do solo e da rizosfera de plantas de soja) coletados na profundidade de 0-5 cm, em áreas com e sem sintomas (I-XII) de encarquilhamento foliar47
- Figura 3.3** – Análise de componentes principais baseada em atributos químicos (pH, Carbono orgânico - Corg, Al, H+Al, Ca/Mg, Ca, Mg, P, K, SB, CTC, V%, Cu, Mn, Fe, Mn em Mehlich I, Mn em DTPA e Zn) e microbiológicos (respiração basal, colonização micorrízica e UFC de microrganismos oxidantes e redutores de Mn, do solo e da rizosfera de plantas de soja) coletados na profundidade de 5-10 cm, em áreas com e sem sintomas (I-XII) de encarquilhamento foliar48
- Figura 3.4** – Relações filogenéticas de isolados de bactérias redutoras de Mn, obtidos de áreas com e sem sintoma de encarquilhamento foliar em soja, baseadas no gene 16S RNAr49
- Figura 3.5** – Relações filogenéticas de isolados de bactérias oxidantes de Mn obtidos de áreas com e sem sintoma de encarquilhamento foliar em soja baseadas no gene 16S RNAr51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** – Bactérias redutoras de Mn isoladas do solo de diferentes propriedades (I a XII) na safra 2012/13 e 2013/14, selecionadas para sequenciamento do 16S RNAr.....38
- Tabela 3.2** – Bactérias oxidantes de Mn isoladas do solo de diferentes propriedades (I a XII) na safra 2012/13 e 2013/14, selecionadas para sequenciamento do 16S RNAr.....39
- Tabela 3.3** – Sequências e o ciclo de amplificação dos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 16S RNAr41
- Tabela 3.4** – Diagnose foliar de soja com e sem sintoma de encarquilhamento, na safra 2012/13.....43
- Tabela 3.5** – Atributos químicos do solo de quatro profundidades (0-5, 5-10, 10-20 e 20-40 cm) coletado em nove propriedades agrícolas no Paraná de áreas com e sem sintomas de encarquilhamento foliar em plantas de soja.44
- Tabela 3.6** – Colonização micorrízica, carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal e número de unidades formadoras de colônia (UFC g⁻¹) de microrganismos oxidantes e redutores de manganês, no solo e na rizosfera de plantas de soja com e sem sintomas de encarquilhamento foliar, na safra 2012/13 e 2013/14.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MO	Matéria orgânica do solo
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
SB	Soma de bases (SB= Σ K, Ca, Mg)
V%	Saturação por bases
ATP	Trifosfato de adenosina
CBM	Carbono da biomassa microbiana
FMA	Fungo micorrízico arbuscular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	SOJA: COMPOSIÇÃO, IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E CULTIVO.....	14
2.2	FATORES QUE LEVAM AO ENCARQUILHAMENTO FOLIAR EM SOJA.....	15
2.3	MANGANÊS	17
2.3.1	Disponibilidade e Interações no Solo	17
2.3.2	Papel do Mn na Planta: Metabolismo e Interações	18
2.4	MICROORGANISMOS DO SOLO	23
2.4.1	Interações na Ciclagem de Mn.....	23
2.4.2	Indicadores de Qualidade do Solo	28
2.4.3	Diversidade microbiana.....	30
3	ARTIGO: DINÂMICA DO MANGANÊS NO SOLO E EM SOJA INDUZIDA POR MICROORGANISMOS	32
3.1	RESUMO	32
3.2	ABSTRACT.....	33
3.3	INTRODUÇÃO	34
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.5	RESULTADOS	42
3.5.1	Massa Seca de Parte Aérea, Produtividade e Propriedades Químicas do Solo	42
3.5.2	Atributos Microbiológicos do Solo e da Rizosfera	45
3.6	DISCUSSÃO	52
3.7	CONCLUSÕES.....	56
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das culturas de maior relevância na agricultura mundial devido à versatilidade de sua matéria-prima, que apresenta elevado teor de óleo e proteína. No Brasil, o seu cultivo ocorre em solos naturalmente ácidos, o que favorece a disponibilidade de alumínio (Al) e de manganês (Mn) a níveis tóxicos caso não sejam tomadas medidas de correção da acidez. Nas últimas safras de soja, tem sido observada a ocorrência de reboleiras em áreas de produção, com sintomas de encarquilhamento foliar semelhantes aos produzidos pela toxidez de manganês. Este problema vem sendo relatado desde longa data, mas atualmente tem causado preocupações devido ao aumento de sua ocorrência. Os sintomas aparecem com maior intensidade na época de pré-florescimento e tendem a desaparecer com o desenvolvimento do ciclo da cultura. Entretanto, ainda não se sabe se os efeitos no início do ciclo da cultura podem interferir na expressão do potencial produtivo da soja.

O Mn é um micronutriente essencial ao desenvolvimento de plantas e de outros organismos, desempenhando papel de ativador de uma grande diversidade de enzimas, além de atuar como componente da proteína do fotossistema II e participar no controle de agentes oxidantes (O_2^-) pela superóxido dismutase (MnSOD). Contudo, em altas concentrações na planta, o Mn pode causar injúrias como: necrose, manchas marrons no limbo e nas nervuras, redução da capacidade fotossintética, encarquilhamento foliar em folhas jovens e, conseqüente, retardo no crescimento.

Em sistemas biológicos, o Mn existe em três principais níveis de oxidação: II, III e IV, sendo predominantemente encontrado em plantas na forma de Mn II. A disponibilidade dessa forma de Mn no solo é influenciada pelo pH, CTC, aeração, umidade, teores de matéria orgânica, e também pela atividade de microrganismos. As formas reduzidas (solúveis) de Mn (II) aumentam em solos com pH inferior a 5,5. O excesso de Mn na planta pode induzir à deficiência de Ca, sendo os sintomas semelhantes ao de toxidez de Mn. Nutrientes como o Ca, Mg e P são capazes de reduzir os danos causados pelos elevados teores de Mn, sendo atributos químicos relevantes na dinâmica do Mn. Em solos com elevada CTC e altos teores de MO, como ocorre em áreas bem manejadas em sistema de plantio direto, a disponibilidade do Mn é diminuída por ligações com as cargas elétricas

negativas do solo e da matéria orgânica.

Os atributos químicos do solo influenciam diretamente no equilíbrio entre as comunidades de bactérias oxidantes e redutoras de Mn, que participam nas transformações do elemento no solo. Sendo assim, a concentração do micronutriente disponível na solução do solo pode variar de acordo com o balanço entre as comunidades de microrganismos oxidantes/redutores de Mn, o que é influenciado pelas condições ambientais. A quantificação e identificação das bactérias relacionadas aos processos de oxirredução do Mn pode auxiliar a esclarecer os mecanismos envolvidos na toxidez de Mn. Além disso, há relatos de que a associação de fungos micorrízicos com as raízes das plantas altera quantitativa e qualitativamente a exsudação, e conseqüentemente, influencia a comunidade de microrganismos da rizosfera, alterando o balanço entre as comunidades de microrganismos oxidantes/redutores de Mn.

Indicadores microbiológicos e bioquímicos são sensíveis a variações ambientais, sendo que alterações de origem antrópica ou naturais podem ser detectadas em estágio anterior às alterações nos atributos químicos e físicos do solo. O C e o N da biomassa microbiana são os bioindicadores mais difundidos para monitoramento da qualidade biológica do solo, refletindo rapidamente os efeitos de diferentes usos e manejos, da adição de resíduo ou da remediação de áreas contaminadas. A respiração basal e o quociente metabólico são variáveis que auxiliam na avaliação da atividade microbiológica do solo.

As hipóteses investigadas neste trabalho são que o equilíbrio entre a comunidade de microrganismos oxidantes e redutores de Mn na rizosfera das plantas de soja com sintomas de encarquilhamento foliar é alterado, aumentando a disponibilidade de Mn às plantas. Por sua vez, a alteração da comunidade microbiana de microrganismos oxidantes e redutores de Mn na rizosfera da planta de soja é mediada por atributos químicos do solo (pH, matéria orgânica, fósforo) e/ou biológicos (fungos micorrízicos).

O objetivo desse trabalho foi avaliar atributos químicos e microbiológicos do solo e da planta, em áreas de produção agrícola com ocorrência de reboleiras de soja encarquilhada, na tentativa de elucidar as possíveis causas que levam à ocorrência desses sintomas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SOJA: COMPOSIÇÃO, IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E CULTIVO

Comumente chamada de “the miracle plant”, a soja (*Glycine max* L. Merrill) é originária da China (ALIYEV; MIRZOYEV, 2010) de onde se expandiu para outros continentes, tornando-se uma das “commodities” mais comercializadas no mundo. A sua grande multiplicidade de usos inclui diversos ramos da indústria química e alimentícia, especialmente na nutrição animal (HARTMAN; WEST; HERMAN, 2011).

Seus grãos são ricos e de alta qualidade nutricional, tendo na composição cerca de 35-55% de proteínas de fácil digestão, 17-27% de gorduras, 30% de carboidratos e também vitaminas e 5% de minerais, que podem variar com a cultivar e as condições de cultivo. A proteína fornecida pela soja se iguala qualitativamente a fontes proteicas de origem animal, sendo que, na Ásia, representa a fonte primária de proteína consumida em alimentos, como tofu e suco de soja (HARTMAN; WEST; HERMAN, 2011). Do óleo extraído dos grãos, 95% é consumido na forma de óleo vegetal comestível e o restante é utilizado pela indústria de cosméticos e produtos de higiene, além de removedores de tinta e plásticos (LIU, 2008). O óleo de soja também é empregado na produção de biocombustível, como o biodiesel e o H-Bio (DALL’AGNOL et al., 2007).

O sucesso da soja no campo do agronegócio pode ser atribuído ao vasto leque de possibilidades de uso dessa matéria-prima, que consolidou a cultura como “commodity” no cenário agrícola mundial (DALL’AGNOL et al., 2007). A estimativa do USDA para a safra de 2016/2017 foi de uma produção mundial de 340,8 milhões de toneladas de grãos de soja. O Brasil, por sua vez, produziu 114,1 milhões de toneladas, na safra de 2016/2017 (CONAB, 2017), com crescimento de 18,5% em relação à safra anterior. O desenvolvimento do mercado brasileiro de soja resultou na ascensão do Brasil como segundo maior produtor mundial, perdendo apenas para os Estados Unidos. Os EUA, Brasil e Argentina foram responsáveis na safra de 2016/2017 por aproximadamente 82,4% da produção mundial (USDA, 2017).

Os agricultores enfrentam vários desafios no cultivo da soja como condições meteorológicas extremas, ocorrência doenças, pragas, plantas daninhas e

condições variáveis de solo. A pesquisa tem auxiliado os produtores na busca de alternativas e soluções para aumentar a quantidade e melhorar a qualidade da produção de soja, reduzindo os efeitos de fatores abióticos e bióticos sobre a cultura, com o uso de agroquímicos, fertilizantes industrializados, assim como o desenvolvimento de novas variedades adequadas às condições de clima e solo de cada região (PANTHEE, 2010). Os fertilizantes favorecem a expressão do potencial produtivo das novas cultivares, cujo fornecimento deve corrigir solos pobres em nutrientes e também repor nutrientes exportados na colheita (KATERJI et al., 2003).

2.2 FATORES QUE LEVAM AO ENCARQUILHAMENTO FOLIAR EM SOJA

O estudo dos sintomas em plantas auxilia na correta determinação de agentes problemas, como doenças, pragas, distúrbios nutricionais ou uso e/ou manejo do solo inadequados. Anormalidades no crescimento, na multiplicação e na diferenciação de células vegetais produzem distorções na planta, como o encarquilhamento foliar ou encrespamento. O sintoma resulta do crescimento (hiperplasia e/ou hipertrofia) exagerado de células, geralmente, causado pela deformação em apenas uma parte do tecido (SALGADO; AMORIM, 1995). Esta deformação no crescimento das plantas pode resultar de diversas causas, dentre elas a fitotoxidez; ataque de pragas (ácaros e tripses); ataque de nematoides; distúrbios nutricionais, como a toxidez por Mn ou deficiências de Ca ou B; e também fatores abióticos como o frio.

A fitotoxidez causada por agrotóxicos ocorre com o excesso do ingrediente ativo na superfície da folha, que causa danos às células. A concentração excessiva de ingrediente ativo na planta se deve, principalmente, à ineficiência do modo de aplicação. Alguns fungicidas, por exemplo, causam níveis diferentes de fitotoxidez que se manifestam na forma de sintomas como o encarquilhamento foliar e a queima dos tecidos entre as nervuras da folha. Voltolini et al. (2015) observaram sintomas de fitotoxidez em mudas de cafeeiro após a aplicação do herbicida 2,4D, as quais apresentaram encarquilhamento das folhas já na menor dose aplicada, 0,25 L ha⁻¹.

As lavouras de soja podem sofrer ataques do ácaro-branco (*Polyphagotarsonemus latus*) e rajado (*Tetranychus urticae*), dentre outros, apesar de não serem consideradas pragas de grande relevância. A ocorrência desses

ácaros pode levar à formação de folhas levemente enrugadas, em razão do ataque preferencial na parte inferior de folhas jovens, em processo de expansão. O encarquilhamento ocorre com a mesma intensidade nos três folíolos da mesma folha, sendo observados em reboleiras a campo (EMBRAPA, 2014).

A ocorrência de tripes também pode levar à formação de encarquilhamento foliar. As espécies de tripes mais comuns na cultura da soja são *Caliothrips braziliensis* e *Frankliniella schultzei*. As ninfas medem cerca de 2 mm e podem ser encontradas em diferentes colorações: branca, bege-clara, amarelada, marrom ou preta, de acordo com a espécie. Os adultos possuem aparelho bucal raspador-sugador que danificam os tecidos da planta, com o posterior aparecimento de pequenos pontos brancos, que se tornam amarelos, marrons ou até vermelhos. Localizam-se, preferencialmente, na parte inferior da folha, que com as lesões tornam se encarquilhadas (EMBRAPA, 2014).

Há 10 anos a Soja Louca II (SL-II) vem causando prejuízos em lavouras comerciais, com reduções de até 60% na produtividade de grãos de soja. A causa, até então desconhecida, foi identificada pela Embrapa e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) como sendo ataque do nematoide *Aphelencoides* spp. A maior incidência da SL-II foi observada em regiões de clima quente e chuvoso, como nos Estados do Maranhão, Tocantins, Pará e Mato Grosso. Dentre os principais sintomas estão: retenção foliar, plantas com haste verde, hastes deformadas e com engrossamento dos nós, afilamento das folhas do topo das plantas, enrugamento das folhas, engrossamento das nervuras e abortamento de vagens. Os sintomas aparecem no início do período de florescimento.

Algumas deficiências nutricionais também podem resultar em encarquilhamento foliar de soja. O boro é um micronutriente essencial no desenvolvimento das plantas (WARINGTON, 1923) e sua deficiência pode reduzir a produtividade e também a qualidade de culturas, como o algodão, arroz, milho, trigo e soja (GUPTA, 1993; AHMAD et al., 2012). O papel de maior importância do B é a formação das células da parede que é atribuído à ligação do B com moléculas de rhamnogalacturonan II, além de atuar na regulação da transcrição de genes envolvidos na síntese e na modificação da parede celular (KOBAYASHI et al., 1996; CAMACHO-CRISTÓBAL et al., 2011). A baixa disponibilidade de B também interfere na alongação radicular, na atividade da oxidase de AIA, na translocação de açúcares, no metabolismo de carboidratos, na síntese de ácidos nucleicos, no

crescimento do tubo polínico (GOLDBACH; WIMMER, 2007) e no metabolismo do nitrogênio (CAMACHO-CRISTÓBAL; GONZÁLEZ-FONTES, 2007). A deficiência de B em tecidos de plantas leva à redução de crescimento e os sintomas aparecem em partes jovens, em crescimento, como ápices, flores, frutos e sementes.

O excesso de alguns nutrientes, como o manganês (Mn), pode levar ao encarquilhamento foliar de soja. Mais detalhes sobre o papel desse nutriente serão apresentados a seguir.

2.3 MANGANÊS

2.3.1 Disponibilidade e Interações no Solo

O manganês ocorre em vários estados de valência na natureza e é um micronutriente essencial para a maioria dos organismos. É encontrado com maior frequência em três principais formas: estáveis Mn^{+2} e Mn^{+4} , e na forma instável Mn^{+3} (MARSCHNER, 1995). No solo, o Mn ocorre na forma de cátions divalentes livres na solução, em compostos insolúveis com fosfatos e carbonatos e em minerais como os óxidos de Mn III e IV (TEBO et al., 2004). Nos solos brasileiros, o teor total de Mn varia de 10 a 4000 mg kg^{-1} , enquanto seu teor solúvel varia de 0,1 a 100 mg kg^{-1} (MALAVOLTA, 2006).

O Mn^{+2} no solo depende de condições ambientais como aeração, umidade, teor de MO, atividade biológica e pH, sendo esta a forma preferencial de absorção pelas plantas (MARSCHNER, 1995). Em geral, condições de baixa aeração e baixo pH favorecem termodinamicamente a formação de Mn^{+2} (HORST et al., 1988), enquanto o Mn^{+3} e o Mn^{+4} prevalecem em ambientes aerados e em pH elevado (TEBO et al., 2004). A faixa crítica de pH do solo para a ocorrência de toxidez de Mn está entre 4,5 a 5,5, com teores foliares de 312 a 2344 mg kg^{-1} de Mn (DAVIS et al., 1996).

Além da influência do pH, outros fatores são determinantes na disponibilidade do Mn^{+2} como a CTC, o teor de MO, xenobiontes, cultivares transgênicas e a atividade microbiana (FOY, 1984; TISDALE et al., 1985; MOREIRA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2007, KREMER; MEANS, 2009; ZOBIOLE et al., 2010). Solos com elevada CTC apresentam menor teor de Mn II disponível devido à adsorção deste cátion aos sítios de troca, reduzindo assim a quantidade do

elemento na solução do solo (FOY, 1984; MOREIRA et al., 2006). Menor CTC e baixos teores de MO, característicos em solos arenosos, são fatores que induzem a ocorrência de sintomas de toxidez de Mn^{+2} em plantas. Já em solos argilosos, com maiores teores de MO e CTC, a probabilidade de ocorrência de deficiência de Mn nas plantas é maior do que a de toxidez (MOREIRA et al., 2006).

A MO, além de todos os benefícios, como reserva de nutrientes, manutenção de umidade e temperatura, estruturação do solo, também é capaz de reduzir a concentração de Mn^{+2} disponível no solo por meio de sua complexação. Em sentido oposto, a atividade de microrganismos atua na liberação de Mn que, em grande quantidade, pode limitar o desenvolvimento das plantas (ARINES; VILARIÑO; SAINZ, 1989; MOREIRA et al., 2006). Dessa forma, sistemas conservacionistas como o sistema de plantio direto, que favorecem a manutenção da MO, favorecem a indisponibilidade transitória do Mn pela retenção na fração orgânica. Por sua vez, a redução dos teores de MO com o sistema de cultivo convencional potencializa a toxidez de Mn (BABUJIA et al., 2010; MOREIRA et al., 2006).

Altas concentrações de Mn^{+2} e de Al^{3+} no solo são fatores limitantes ao crescimento das plantas, sendo que em solos ácidos, com valores de pH inferior a 5,5, a incidência de ambas toxidez ocorre simultaneamente (MARSCHNER et al., 1995). Em solos com $pH > 5,5$, a precipitação do Al^{3+} é quase total, deixando de ser prejudicial ao desenvolvimento das plantas, enquanto que a toxidez de Mn^{+2} ainda ocorrerá em solos com teores (totais) potencialmente tóxicos. Davis et al. (1996) observaram em um experimento desenvolvido em casa de vegetação com amendoim (*Arachis hypogaea* L.), que a adição de calcário dolomítico em solo com pH 4,5 em quantidade suficiente para elevar o pH a 5,5, reduziu os teores de Mn foliar entre 12 a 22 vezes.

2.3.2 Papel do Mn na Planta: Metabolismo e Interações

O Mn é um elemento essencial ao metabolismo das plantas e atua como ativador de diversas enzimas em processos vitais como: a fotossíntese, a respiração, a síntese de proteínas e de carboidratos (MUKHOPADHYAY; SHARMA, 1991). Em plantas, o Mn^{+2} é a forma predominante, mas pode ser facilmente oxidado para Mn^{+3} e Mn^{+4} . Este elemento é compartimentalizado no apoplasto e no simplasto

nas formas: trocável, adsorvida às cargas negativas da matriz da parede celular; lábil, no citoplasma e não lábil, depositado nos vacúolos (MUNNS et al., 1963; PAGE; DAINTY, 1963; WANG, 2003).

O Mn é cofator de mais de 30 enzimas (BURNELL, 1988), embora as que o contenha em sua constituição sejam apenas três: proteína D1 do fotossistema II, oxalato oxidase e dismutase de superóxido (SOD). A enzima do polipeptídeo 33 KDa envolvida na hidrólise da água no fotossistema II é a mais estudada de todas as enzimas que contêm Mn. Nesse sistema, quatro átomos de Mn armazenam cargas negativas de quatro elétrons provenientes da oxidação de duas moléculas de água (BROADLEY et al., 2012). Oxalato oxidase (EC1.2.3.4) é uma glicoproteína que catalisa a conversão de oxalato em dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio (KANAUCHI et al., 2009). É um homohexâmero e seu sítio ativo se encontra centralizado na “ β -barrel fold”, que contém o íon Mn (DUNWELL et al., 2001).

A SOD desempenha papel essencial na sobrevivência de organismos aeróbios, como bactérias de vida livre e rizóbios, protegendo os tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres de O_2^- , produto de várias reações enzimáticas, nas quais um elétron livre é fornecido ao O_2 (ELSTNER, 1982; FRIDOVICH, 1983). A conversão do O_2^- é catalisada pela dismutase de superóxido, e a subsequente reação de H_2O_2 para H_2O e O_2 é catalisada pelas peroxidases e catalases (ELSTNER, 1982).

Com raio iônico de 0,075 nm o Mn se assemelha ao Mg^{+2} e ao Ca^{+2} (0,085 nm e 0,099 nm, respectivamente), o que causa substituição ou competição entre eles em várias reações (MARSCHNER et al., 2012). Isso faz com que a força de ligação entre os três íons com o oxigênio seja parecida, podendo ser maior para o Mn^{+2} , como no caso do ATP (BURNELL, 1988). O raio iônico e as semelhanças entre os íons têm consequências relevantes na compartimentalização do manganês nas células e suas interações com Mg (BROADLEY et al., 2012).

Quando em níveis elevados no solo, o Mn pode causar injúrias às plantas, com o aparecimento de pequenos pontos marrons em folhas maduras, clorose marginal, diminuição da capacidade fotossintética da planta e conseqüente retardo no crescimento, aparecimento de manchas necróticas nas hastes, deformação como encarquilhamento foliar, queima das pontas das folhas e flores e necrose em folhas jovens (FOY, 1984, SARKAR et al., 2004, LIDON; BARREIRO;

RAMALHO, 2004; DOU et al., 2009). Além disso, a toxidez de Mn induz à perda de dominância apical e aumento na formação de raízes secundárias (KANG; FOX, 1980, BAÑADOS et al., 2009).

Em plantas de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), os sintomas típicos de toxidez de Mn são lesões marrons nas folhas maduras. A coloração das lesões sob microscópio revelou ser deposição de Mn oxidado oriunda de compostos fenólicos oxidados (HORIGUCHI, 1987; FÜHRS et al., 2009). A deposição de substâncias fenólicas oxidadas em tecidos com excesso de Mn é indicativo de alta atividade de peroxidases e oxidação do Mn^{+2} (HORIGUCHI, 1987). A oxidação do Mn^{+2} reduz a atividade dos íons tóxicos, possivelmente um mecanismo de tolerância desenvolvido pelas plantas para sobreviverem em condições de excesso de Mn (BROADLEY et al., 2012). Em plantas drasticamente injuriadas, os danos são visíveis também no sistema radicular com alteração da cor para tonalidades marrons (BROMFIELD, 1978; FOY et al., 1978). Em condições de campo, os sintomas de toxidez de Mn em plantas ocorrem em reboleiras, onde é possível detectar maior disponibilidade do nutriente no solo (MENTEN et al., 1981).

Em plantas de feijoeiro submetidas a condições de toxidez de Mn, os teores foliares atingiram 4.200 mg kg^{-1} , enquanto em plantas controle com níveis adequados do nutriente, sem presença de sintomas, os teores foram de 550 mg kg^{-1} (MENTEN et al., 1981). Marschner (1995) relata que o nível crítico para a soja é de 600 mg kg^{-1} . Contudo, em estudos realizados com diferentes cultivares, Foy et al. (1978) observaram teores foliares de 160 mg kg^{-1} em plantas com sintomas de toxidez por Mn. Teores foliares de 314 mg kg^{-1} foram observados por outros autores (BETHLENFALVAY; FRANSON, 1989), entretanto, abaixo do nível crítico citado por Marschner (1995).

A elevada concentração de Mn nos tecidos foliares pode induzir a deficiências de Ca e Mg, com aparecimento do sintoma comum a ambas as deficiências, ou seja, encarquilhamento das folhas, acarretando efeito indireto sobre a distribuição do Ca para folhas novas. O transporte de Ca no xilema é unilateral, ou seja, ocorre em direção ao ápice (acrópeto) até as folhas em expansão, e é dependente do contratransporte de ácido indol acético - AIA (MARSCHNER, 2012). A deficiência de Ca induzida por toxidez de Mn é decorrente da degradação do Ácido Indol Acético (AIA) pelo aumento da atividade da oxidase do AIA (HORST, 1988). Sob toxidez de Mn, têm sido observados aumentos na atividade da oxidase

do AIA - (diminuindo o nível de auxinas), peroxidase e oxidase de polifenol (FECHT-CHRISTOFFERS et al., 2007).

A toxidez de Mn em soja também está associada à diminuição da atividade da redutase de nitrato (HEENAN; CAMPBELL, 1981). Em leguminosas nodulíferas, o transporte de nitrogênio do nódulo para a parte aérea é feito na forma de ureídos (ácido alantóico e alatoína), e a metabolização destas formas no processo de assimilação do N, tanto nas folhas (WINKLER et al., 1985) quanto nas sementes é catalisada pela enzima alantoína amidohidrolase (E.C. 3.5.3.9), que é dependente de Mn (WERNER et al., 2008). Em condições de restrição hídrica ocorre acúmulo de ureídos na parte aérea da planta (DE SILVA, PURCELL; KING, 1996; SERRAJ; SINCLAIR, 1996; PURCELL et al., 1998; SERRAJ et al., 1999b), o que resulta em um feedback negativo para os nódulos que reduzem a FBN. Dessa forma, o suprimento adequado de Mn à soja é capaz de reduzir a sensibilidade da fixação biológica de nitrogênio ao estresse hídrico (PURCELL; KING; BALL, 2000), por meio da degradação dos ureídos pela alatonína amidohidrolase.

O Mn é relativamente imóvel depois de assimilado pela planta, e, em consequência, sua concentração poderá variar entre as folhas de uma mesma planta. Maiores concentrações e sintomas de toxidez de Mn têm sido observados nas folhas mais velhas. Para evitar interpretações errôneas decorrentes dessa variação, sugere-se a folha recém-madura para o diagnóstico da concentração de Mn (KLUTHCOUSKI; NELSON, 1979). É importante notar que a forma de ocorrência do Mn no xilema pode ser diferente daquela localizada nas lesões características de sua toxidez (FOY, 1984), sendo encontrada nas lesões a forma oxidada. Devido à redistribuição de nutrientes durante o ciclo da planta, se estabeleceu que a diagnose foliar de cultivares de crescimento determinado fosse realizada com folhas de soja recém-maduras correspondentes ao terceiro ou quarto trifólio a partir do ápice da haste principal (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997), coletadas no início do período de florescimento (EMBRAPA, 2014).

A formação de calose é outro mecanismo de defesa da planta que, através da formação de uma barreira física, ajuda a limitar o estabelecimento de patógeno ou outro tipo de estresse biótico (KAUSS, 1989). O excesso de Mn no tecido das plantas induz a formação de calose (β -1,3-glucana). Nogueira e Cardoso (2002) observaram que a colonização micorrízica de soja diminuiu a concentração de Mn foliar e também a deposição de calose nas folhas, indicando atenuação da

toxidez de Mn pela colonização micorrízica. Doncheva et al. (2009) observaram aumento na deposição de calose com o aumento da concentração de Mn, em experimento com diferentes cultivares de milho com e sem a presença de silício.

A tolerância de algumas espécies vegetais ao excesso de Mn no solo pode variar com a temperatura (RUFTY JR.; MINER; RAPER JR., 1979) e, também, com a concentração de silício (DONCHEVA et al., 2009). Em altas temperaturas, geralmente, podem-se observar maiores concentrações de Mn nas folhas do que em condição de baixa temperatura (HEENAN; CARTER, 1977; RUFTY JR.; MINER; RAPER JR., 1979). O aumento da temperatura em solução de cultivo contribui para a tolerância ao excesso de Mn, o que se atribui ao aumento do transporte de Mn para os vacúolos (RUFTY JR.; MINER; RAPER JR., 1979) e maior atividade da nitrato redutase (HEENAN; CAMBPELL, 1980).

A manutenção da concentração de ácido ascórbico na folha e o aumento da atividade de enzimas oxidativas são mecanismos que contribuem para redução do estresse causado por elevadas concentrações de Mn (FECHT-CHRISTOFFERS et al., 2006, GANGWAR et al., 2010). Em nível celular, a tolerância a altas concentrações de Mn^{+2} no solo é atribuída à translocação e armazenamento dos íons excedentes para os vacúolos (BOOJAR; GOODARZI, 2008), parede das células e tilacoides dos cloroplastos, além da imobilização em cristais de oxalato (GONZÁLEZ; LYNCH, 1999). Grande diversidade de níveis de adaptação ao excesso de Mn no solo tem sido relatada em culturas como milho, azevém e outras espécies de cereais (DONCHEVA et al., 2009; MORA et al., 2009; DOU et al., 2009).

O excesso de Mn interfere na absorção e translocação de nutrientes, como Ca, Mg e P. A toxidez de Mn é reduzida com o aumento dos níveis de Ca nos meios de cultivo, o que, frequentemente, diminui a sua absorção na forma de Mn^{+2} (FOY et al., 1978), o mesmo sendo observado para Mg (DAVIS et al., 1996). Variedades de trigo cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Ca mostraram sintomas menos severos de toxidez de Mn nas maiores concentrações de Ca (VOSE; JONES, 1963). O fornecimento de P reduz os sintomas de toxidez por Mn em soja através de mecanismos de detoxicação celular, além da formação de complexos P-Mn de baixa solubilidade (FOY et al., 1984; NOGUEIRA; MAGALHÃES; CARDOSO, 2004). Alguns autores sugerem que o P também pode diminuir a toxidez de Mn^{+2} por precipitação no interior das raízes

(HEINTZE, 1968). Arines, Vilariño e Sainz et al. (1989) observaram correlação negativa entre a absorção de P e Mn^{+2} .

Há espécies de plantas que apresentam característica de hiperacumulação de Mn, como a *Phytolacca americana*, suportando teores foliares superiores a $20.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Mn em massa seca, sem expressar sintomas de toxidez, o que representa 40 a 660 vezes mais do que é acumulado em outras espécies (XUE et al. 2004; MIN et al. 2007). Já em plantas não tolerantes, a concentração de Mn considerada normal ou adequada no tecido foliar varia de 20 a 500 mg kg^{-1} em base seca (BOOJAR; GOODARZI, 2008), diferindo entre espécies de plantas e mesmo entre os seus cultivares (FOY, 1984; MARSCHNER, 1995; DOU et al., 2009; KHABAZ-SABERI et al., 2010).

2.4 MICRORGANISMOS DO SOLO

2.4.1 Interações na Ciclagem de Mn

A disponibilidade de Mn^{+2} às plantas é influenciada pela comunidade de microrganismos oxidantes e redutores de Mn, sendo que a predominância de uma sobre a outra pode determinar a disponibilidade de Mn no solo (GODO; REISENAUER, 1980; SPARROW; UREN, 1987; NOGUEIRA et al., 2007). Assim, a atividade microbiana na rizosfera pode aumentar ou diminuir a disponibilidade de Mn^{+2} , dependendo do predomínio de comunidades oxidantes ou redutoras de Mn (KOTHARI; MARSCHNER; RÖMHELD, 1991; RENGEL, 1997). Em solos calcários, a concentração de Mn II na rizosfera de milho diminuiu na mesma ordem que também foi diminuída a comunidade de microrganismos redutores de Fe e Mn, indicando seu envolvimento na redução do Mn (KOTHARI; MARSCHNER, RÖMHELD, 1991).

Segundo Bromfield (1978), a capacidade de microrganismos oxidarem o Mn^{+2} é limitada a valores de pH menores que 5,5, o que contribui para seu acúmulo a níveis tóxicos. Contudo, para Sparrow e Uren (1987), mesmo em solos ácidos, os microrganismos são capazes de atuarem na redução de altas concentrações de Mn^{+2} pelo processo de oxidação. Se processos biológicos de oxidação e redução do Mn podem ocorrer em solos ácidos, qualquer mudança na

disponibilidade do Mn^{+2} será o resultado líquido de mudanças na taxa de ambas as reações, em combinação com a redução química do Mn em condições de acidez.

Além dos mecanismos de resistência à toxidez de Mn^{+2} inerentes à planta, há vários relatos na literatura de que as associações micorrízicas frequentemente atenuam os efeitos tóxicos do Mn em excesso (NOGUEIRA et al., 2002; NOGUEIRA; MAGALHÃES; CARDOSO, 2004; NOGUEIRA et al., 2007). A formação de micorriza induz o aumento da atividade de enzimas antioxidativas, como catalases, peroxidases e SOD, aumentando a tolerância da planta a diferentes estresses (LAMBAS; RÍOS-RUIZ; ANDRADE, 2003; ARFAOUI et al., 2007; ABDEL LATEF; CHAOXING, 2011). Dentre outros benefícios, a associação com fungos micorrízicos favorece a absorção de P e de Mg e a redução dos teores de Na na parte aérea das plantas (SHENG et al., 2008), contribuindo para o seu melhor desempenho frente a condições de estresse por metais (ANDRADE et al., 2008).

A absorção de Mn^{+2} e suas concentrações na planta nem sempre são influenciadas pelos fungos micorrízicos arbusculares (FMA), mas frequentemente são menores nas plantas micorrizadas (MARSCHNER; DELL, 1994). Os FMAs secretam compostos como a glomalina (VODNIK et al., 2008), que faz a quelação do metal, e são capazes de imobilizar metais na parede celular de hifas ou compartimentalizá-los no interior das células fúngicas. Cardoso (1996) observou correlação positiva entre teores de P e Mn na parte aérea de plantas não micorrizadas. Entretanto, na presença de micorriza, houve apenas aumento dos teores de P, mas não dos de Mn, os quais permaneceram constantes. A formação da micorrizas altera a resposta da planta ao Mn^{+2} , contudo as bases fisiológicas dessa alteração ainda são desconhecidas (MCGEE, 1987; BETHLENFALVAY; FRANSON, 1989; KOTHARI, MARSCHNER, RÖMHELD, 1990; MEDEIROS; CLARK; ELLIS, 1995; NOGUEIRA, 1996).

Cardoso (1985) observou que a presença de FMA diminuiu significativamente a concentração de Mn^{+2} na parte aérea de plantas de soja e sugeriu um papel dos FMA na proteção das plantas contra níveis tóxicos de Mn^{+2} . Posteriormente, McGee (1987) e Bethlenfalvay e Franson (1989) demonstraram a diminuição da toxidez de Mn^{+2} em plantas micorrizadas. Arines, Vilariño e Sainz (1989) observaram que baixas doses de P propiciaram aumento da colonização radicular de trevo pelos FMA, o que coincidiu com a menor absorção de Mn^{+2} . Comportamento semelhante foi observado por Colozzi-Filho e Siqueira (1986) em

cafeeiro e por Nogueira e Cardoso (2000); Nogueira et al. (2002, 2007); Nogueira, Magalhães e Cardoso (2004) em plantas de soja. Navarro (1989) concluiu que a maior ou a menor concentração de Mn em plantas de soja micorrizadas depende da espécie fúngica a elas associada, fato também observado por Medeiros, Clark e Ellis (1995) em plantas de sorgo.

Bethlenfalvay e Franson (1989) concluíram que, apesar de as plantas micorrizadas não apresentarem sintomas de toxidez de Mn^{+2} , não foi o efeito direto dos FMA que suprimiu os sintomas, uma vez que os teores de Mn na planta aumentaram com o aumento da colonização. Os autores sugeriram que a maior produção de exsudatos radiculares de baixo peso molecular pelas plantas não micorrizadas estaria envolvida na redução do MnO_2 a Mn^{+2} disponível, além de que a quelação do Mn^{+2} por estes exsudatos poderia aumentar sua absorção pelas plantas. De fato, maiores teores de Mn II disponível foram encontrados no substrato cultivado com plantas não micorrizadas.

Os FMA e microrganismos rizosféricos podem influenciar seu mútuo desenvolvimento e exercer efeitos combinados sobre o crescimento das plantas (MEYER; LINDERMAN, 1986a, b). Segundo Kothari, Marschner e Römheld (1990), os FMA alteram a liberação de compostos orgânicos pelas raízes das plantas e, em consequência, alteram a atividade microbiana da rizosfera, a qual estaria relacionada à disponibilidade do Mn. Resultados de Godo e Reisenauer (1980) esclareceram que os exsudatos radiculares de plantas de trigo crescendo em condições estéreis aumentaram a solubilidade do MnO_2 . Diferentes espécies de plantas, bem como genótipos dentro da mesma espécie, influenciam a comunidade microbiana da rizosfera através de alterações qualitativas e quantitativas dos exsudatos radiculares (RENGEL, 1997). Esses resultados demonstram que a disponibilidade do Mn^{+2} na rizosfera também é influenciada pela interação planta-microrganismos, o que afeta tanto os exsudatos radiculares, quanto as comunidades microbianas associadas. A colonização das raízes por fungos micorrízicos arbusculares reduz a população de microrganismos redutores de Mn na rizosfera de plantas de milho, o que coincidiu com a redução da concentração de Mn em plantas micorrizadas (KOTHARI et al., 1990).

A hifa extramatricial dos FMA tem grande efeito na microbiota do solo, sendo sugerido o termo “efeito micosférico” para descrever o aumento das comunidades de certos microrganismos próximo às estruturas fúngicas no solo.

Kothari, Marschner e Römheld (1990; 1991) observaram aumento na comunidade microbiana além da região rizosférica, fato esse atribuído à sua extensão além dos 5 mm da superfície radicular, pelo crescimento da hifa fúngica, o que pode ter propiciado substrato adicional (exsudatos e lisados de hifas) para o crescimento de microrganismos específicos.

A associação dos FMA às plantas de milho diminuiu o potencial de redução do Mn^{+4} a Mn^{+2} alterando a disponibilidade do nutriente na rizosfera (KOTHARI, MARSCHNER, RÖMHELD, 1991). Embora a comunidade microbiana total tenha sido similar nas plantas micorrizadas e não micorrizadas, o número de microrganismos redutores de Mn foi trinta vezes menor nas plantas micorrizadas, indicando alterações substanciais na comunidade microbiana da rizosfera na presença de FMA (KOTHARI, MARSCHNER, RÖMHELD, 1991).

Mudanças qualitativas na comunidade microbiana da rizosfera devido ao manejo do solo (calagem) e aos tratos fitossanitários (aplicação de fungicidas) ocorrem por efeitos indiretos na fisiologia do hospedeiro e também por alterações na quantidade e na composição dos exsudatos das raízes (GRAHAM; LEONARD; MENGE, 1981; MEYER; LINDERMAN, 1986b; ARINES; VILARIÑO; SAINZ, 1989; NOGUEIRA, 1996) ou nos exsudatos fúngicos (PAULITZ; LINDERMAN, 1989).

Bromfield (1978), avaliando a absorção de Mn II por plantas de aveia cultivadas em solução nutritiva na presença de bactérias oxidantes de Mn, observou que, em condições de pH maior que 6, as bactérias preveniram a absorção excessiva de Mn^{+2} pelas plantas, enquanto que em valores de pH igual a 5,0 não houve efeitos da presença dessas bactérias. Resta salientar que este experimento foi conduzido em solução nutritiva, o que simplifica as complexas interações microbianas que ocorrem na rizosfera (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007). Sparrow e Uren (1987) observaram que a oxidação microbiana do Mn II foi inibida pelo aumento do pH, concluindo-se que os microrganismos responsáveis pela oxidação nos solos estudados estavam adaptados ao ambiente ácido.

Alguns trabalhos sobre oxidação e redução de Mn têm focado interações ecológicas entre microrganismos e mesmo entre plantas e microrganismos. Bactérias redutoras de Mn suprimiram, tanto em meio de cultura, quanto no solo, o desenvolvimento do fungo *Gaeumanomyces* sp., agente causal de uma doença de trigo denominada “mal do pé”. Nesse caso, as bactérias redutoras

de Mn mantiveram sua disponibilidade alta o suficiente para inibir o desenvolvimento fúngico (MARSCHNER, ASCHER, GRAHAM, 1991). Esse fungo é capaz de oxidar Mn, fato suspeito de estar envolvido na sua ação patogênica, talvez por causar deficiência local de Mn na rizosfera, tornando a planta mais suscetível à sua penetração (WILHELM; GRAHAM; ROVIRA, 1990). Em outro estudo, genótipos de trigo tolerantes à deficiência de Mn tiveram três vezes mais bactérias redutoras de Mn do que oxidantes na sua rizosfera, em comparação ao genótipo sensível (RENGEL, 1997). De modo inverso, plantas de soja deficientes em Mn tiveram dez vezes mais bactérias oxidantes de Mn na sua rizosfera do que plantas não deficientes (HUBER; MCCAY-BUIS, 1993).

Um dos mecanismos envolvidos na redução química do Mn é a produção de ácidos e metabólitos redutores, como o H₂S ou ácidos orgânicos. Além disso, algumas bactérias parecem ter mecanismos enzimáticos para a redução do Mn (BOOGERD; VRIND, 1987; GHIORSE, 1988). Alguns grupos de microrganismos têm sido isolados e identificados quanto à sua capacidade de oxidação ou redução de Mn. Posta, Marschner e Römheld (1994) encontraram, entre as bactérias redutoras de Mn no solo, os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Actinomyces*.

A oxidação do Mn por bactérias se dá por processos indiretos através da modificação do pH ou pela produção de metabólitos com potencial oxidante (RICHARDSON; AGUILAR; NEALSON, 1988; HULLO et al. 2001), ou diretamente pela produção de polissacarídeos (BEVERIDGE, 1989) ou proteínas (BOOGERD; VRIND, 1987; FRANCIS; TEBO, 2001). Dubinina (1979a) observou que o processo de oxidação do Mn feito por *Leptothrix* sp. não resultou na utilização da energia produzida para a assimilação do carbono. Portanto, a bactéria não utilizou a energia da oxidação para seu crescimento, mas o processo foi utilizado para consumir H₂O₂, como um mecanismo protetor contra o acúmulo a níveis tóxicos desse subproduto de seu metabolismo. As bactérias relatadas na literatura como oxidantes de Mn são *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus* (BROMFIELD; SKERMAN, 1950), *Arthrobacter* (BROMFIELD, 1974; NOGUEIRA et al., 2007) e *Leptothrix discophora* (BOOGERD; VRIND, 1987). Nota-se que, em alguns casos, bactérias relatadas como oxidantes, também podem atuar como redutoras de Mn, como é o caso do gênero *Bacillus*. Uma extensa revisão sobre a biologia de bactérias oxidantes de Fe e Mn é apresentada por Ghiorse (1984).

2.4.2 Indicadores de Qualidade do Solo

Há diversas definições para qualidade do solo e dentre elas se destaca a de Doran e Parkin (1994), segundo os quais “Qualidade do solo é a capacidade de sustentar a produtividade biológica, sem prejudicar a qualidade da água e do ar, promovendo a saúde humana, de plantas e animais, ou seja, o funcionamento do solo dentro dos limites do ecossistema”. O monitoramento da qualidade do solo pode ser feito com o auxílio de indicadores químicos, físicos ou biológicos.

Os indicadores de qualidade do solo podem ser classificados em três categorias: i) *permanentes*, que são características inerentes ao solo (profundidade, textura e mineralogia); ii) *temporários*, cujas alterações ocorrem rapidamente ou que são alterados pelo manejo e por diversas formas de uso (umidade, densidade, pH, disponibilidade de nutrientes) e iii) *intermediários*, como a agregação, biomassa microbiana, o quociente metabólico e o C orgânico total (ISLAM; WEIL, 2000).

Os indicadores biológicos ou bioindicadores são propriedades ou processos biológicos realizados por microrganismos do solo que indicam o seu estado frente à capacidade de suportar o estabelecimento e sustentabilidade da comunidade vegetal, como a ciclagem de carbono e nutrientes (DORAN; PARKIN, 1994). Devem ser de fácil determinação, viáveis economicamente e principalmente sensíveis a alterações causadas pelo uso e manejo do solo (JAKELAITIS et al., 2008).

De acordo com Zilli et al. (2003), um bom indicador ecológico deve responder de forma rápida e acurada a um distúrbio no solo, refletindo os aspectos do funcionamento do ecossistema, com metodologias de fácil avaliação e economicamente viáveis, devido ao alto número de amostras analisadas (VISSER; PARKINSON, 1992). Da mesma forma, os bioindicadores devem ser sensíveis a estresses, mas suficientemente robustos para não fornecer alarmes falsos; apresentando validação científica, com base na realidade e conhecimento atual e, principalmente, ter distribuição universal, para a obtenção de respostas em uma ampla escala de tipos e condições de solo. A seleção e uso de bioindicadores no monitoramento da qualidade do solo se dá mediante o uso de dois ou mais atributos

independentes, o que confere maior robustez à interpretação dos resultados (BROOKES, 1995).

Apesar dos indicadores químicos e físicos serem mais utilizados no monitoramento da qualidade do solo (BONE et al., 2014; MONCADA et al., 2015), os atributos microbiológicos têm mostrado respostas rápidas a perturbações de origem natural ou antrópica no solo. Dentre os bioindicadores de qualidade do solo, destaca-se a biomassa microbiana, que é especialmente sensível a alterações no manejo do solo, uso de agroquímicos e adição de resíduos (BALOTA et al., 2014; FRANCHINI et al., 2012; NAKATANI et al., 2011; SANTOS et al., 2013). Uma vez que a biomassa microbiana varia com o tipo de solo e com condições climáticas, primeiramente devem-se estabelecer parâmetros ideais de qualidade que serão utilizados na tomada de decisão quanto ao manejo correto (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010).

Alterações no C orgânico do solo não são facilmente detectadas por metodologias de avaliação da química do solo. Contudo, variações em atributos microbiológicos, como na biomassa microbiana do solo, podem ser detectadas anteriormente às mudanças nos teores de C orgânico total e na produtividade das culturas, de forma consistente e mesmo em períodos de flutuações nas condições climáticas (BABUJIA et al., 2010; FRANCHINI et al., 2012; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2011). Os bioindicadores também são eficientes no monitoramento de áreas com adição de resíduos como lodo de curtume (NAKATANI et al., 2011), lixiviado de aterro sanitário (SANTOS et al., 2013) ou mesmo de produtos químicos (SOUZA et al., 2013).

Os microrganismos imobilizam os nutrientes temporariamente, o que reduz as perdas por lixiviação, volatilização e por adsorção aos argilo-minerais do solo, como ocorre com o fósforo (PAUL; CLARK, 1996). A biomassa microbiana representa <5% do carbono orgânico total (FERREIRA et al., 2007), mas apesar de ser uma parcela relativamente pequena, é considerada um importante reservatório de nutrientes, pois são liberados muitas vezes mais rápido pela ruptura das células microbianas do que pela decomposição de restos vegetais. Este processo ocorre por variações climáticas e do manejo do solo, e também por interações com a microfauna, que ao se alimentar de microrganismos, promovem a mineralização de nutrientes neles contidos (BUCHANAN; KING, 1992).

A matéria orgânica do solo é constituída em 25% por polissacarídeos produzidos por microrganismos, e tem alta correlação com a formação de agregados estáveis, promovendo maior estruturação do solo (SPACCINI et al., 2004; LIU; MA; BOMKE, 2005). Além disso, a ciclagem de nutrientes no solo é mediada por microrganismos através da ação de enzimas que catalizam diversas reações do metabolismo. Aliada à biomassa microbiana, a atividade das enzimas também pode ser uma importante ferramenta no monitoramento da intensidade de processos bioquímicos do solo (TABATABAI, 1994; DICK, 1997).

2.4.3 Diversidade microbiana

O uso de técnicas de biologia molecular na agricultura proporciona a identificação de grupos de interesse, auxiliando na detecção de microrganismos com potencial biotecnológico, assim como organismos problemas. Metodologias baseadas no DNA aliadas às análises quantitativas, como os tradicionais métodos de avaliação de biomassa microbiana, possibilitam a identificação pontual e específica dos efeitos de manejo ou uso do solo sobre a diversidade microbiana (OLLIVIER et al. 2011; VAN DER PUTTEN, 2012). Alterações de origem antrópica ou natural podem favorecer ou prejudicar grupos específicos de microrganismos, o que, na maioria dos casos, não é verificado através de métodos quantitativos.

Os genes ribossomais, RNAr 5S,16S e 18S, estão vinculados à síntese proteica e a sobrevivência das espécies, sendo altamente conservados. Em estudos de filogenia e evolução de bactérias, o RNAr 16S é o mais utilizado, sendo considerado um cronômetro molecular (OLSEN; WOESE, 1993). Esse gene apresenta características de marcador filogenético, como sequências de nucleotídeos altamente conservadas em algumas regiões, e variáveis em outras; está presente em todos os organismos, desempenhando a mesma função; tem origem de um ancestral comum; é relativamente grande, contendo informações suficientes para comparações (WOESE, 1987).

O método de Sanger-Coulson de 1979 é o mais utilizado no sequenciamento de DNA, sendo conhecido como automático ou de terminação de cadeia. No sequenciamento automático, é sintetizada uma fita de DNA complementar ao DNA molde com nucleotídeos marcados com fluorocromos

diferentes, um para cada nucleotídeo (A, C, G, T). Ao passar pelo feixe de laser, os fluorocromos emitem luz em diferentes comprimentos de onda, que é detectada por um fotomultiplicador (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). A sequência é apresentada na forma de um eletroferograma por meio de um computador (AUSUBEL et al., 2003; NASCIMENTO et al., 1999).

A correção das sequências é feita manualmente com o auxílio do programa Bionumerics 7.1, tendo por base comparativa sequências depositadas em banco de dados. Existem diversos bancos de dados, dentre eles: GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), MicroSeq (Applied Biosystems) e SmartGene IDNS (Integrated Database Network System). Após a correção, as sequências são alinhadas e cortadas em programas como o MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) que utilizam métodos algoritmos de modelos evolutivos (TAMURA et al., 2011). Com a sequência corrigida e alinhada de nucleotídeos do gene RNAr 16S é feita a comparação e a similaridade das sequências obtidas, e posteriormente, realiza-se a construção de árvores filogenéticas, permitindo o estudo da filogenia e determinação da relação evolutiva das bactérias comparadas (RODICIO; MENDOZA, 2004).

3 ARTIGO: DINÂMICA DO MANGANÊS NO SOLO E EM SOJA INDUZIDA POR MICRORGANISMOS.

RESUMO

Áreas comerciais de soja (*Glycine max* L. Merrill) no Paraná têm apresentado plantas com encarquilhamento foliar semelhante ao causado por toxidez de manganês (Mn). O objetivo desse trabalho foi avaliar, com base em atributos químicos e microbiológicos do solo e da planta, se a causa do sintoma pode estar relacionada ao Mn. Nas safras 2012/13 e 2013/14 foram avaliadas doze propriedades, sendo amostradas reboleiras com sintomas e áreas sadias adjacentes como controle. Na parte aérea da planta foram determinados: a massa seca e o teor foliar de macro e micronutrientes. Os atributos químicos do solo foram analisados nas profundidades de 0-5, 5-10, 10-20 e 20-40 cm, em amostras secas ao ar. Nas amostras de solo de 0-5 e de 5-10 cm foram analisados o C da biomassa microbiana (CBM), respiração basal, número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias oxidantes e redutoras de Mn. Nas raízes, avaliaram-se o número de UFC de oxidantes e redutores de Mn e a colonização micorrízica. As bactérias oxidantes e redutoras de Mn foram isoladas e tiveram seu DNA ribossomal sequenciado visando identificação. Ao final do ciclo da cultura, estimou-se a produtividade de grãos. As plantas com encarquilhamento foliar produziram menos massa seca da parte aérea e menos grãos. Nas plantas com sintomas, os teores foliares de P, Ca, Mg, Mn e B foram mais elevados, enquanto que o teor de K foi menor. No solo, a soma de bases, a capacidade de troca catiônica, os teores de Ca, Mg e Fe (0-5 cm) foram maiores nas áreas sem sintoma, enquanto o P disponível e o teor Zn (10-20 cm) apresentaram menores teores. Os atributos microbiológicos indicaram diferença quanto ao aparecimento do sintoma apenas na safra 2012/13, quando o CBM foi maior nas áreas sem sintoma. Na profundidade de 0-5 cm e na rizosfera da soja, o número de UFC de bactérias oxidantes de Mn foi maior no solo da área sem sintoma, enquanto o número de bactérias redutoras foi maior na rizosfera das plantas da área com sintoma. O balanço entre as bactérias oxidantes e redutoras de Mn se refletiu nos teores de Mn encontrados nas plantas, mas não na disponibilidade no solo. A análise filogenética indicou que as bactérias redutoras de Mn pertencem, principalmente, ao gênero *Streptomyces* e as oxidantes aos gêneros *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Novosphingobium*, *Agrobacterium*, *Variovorax*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Os teores no solo e na planta sugerem que as causas do encarquilhamento foliar em plantas de soja podem estar ligadas ao balanço de P, Ca, Mg e Mn, levando à necessidade de novos estudos. Apesar de os teores de Mn na planta e no solo serem considerados altos, tanto nas áreas com sintomas como nas áreas sem sintomas, não foram apontados como causa direta do problema. É provável haver uma interação multifatores na manifestação dos sintomas que precisa ser mais bem estudada.

Palavras-chave: Atividade microbiana. Bactérias redutoras e oxidantes de Mn. 16S DNAr. Cálcio. Micorriza.

ABSTRACT

Commercial soybean areas (*Glycine max* L. Merrill) have shown crinkle leaf similar to manganese (Mn) toxicity. The aim of this work was to evaluate, based on soil chemical and microbiological properties, if the cause of the symptoms might be related to Mn. Nine soybean sites were sampled in 2012/2013 and three in 2013/14 crop seasons in spots with symptoms and adjacent areas as healthy control. Plant shoots were assessed for dry weight and leaf content of macro and micronutrients. Chemical attributes were analyzed at depths of 0-5, 5-10, 10-20 and 20-40 cm in air-dried soil samples. Microbiological analyzes were performed in the samples taken at 0-5 and 5-10 cm of soil depth, including microbial biomass C (MBC), basal respiration and the number of colony forming units (CFU) of Mn-oxidizing and reducing bacteria. Roots were assessed for Mn-oxidizing and reducing bacteria, and mycorrhizal colonization. Isolates of Mn-oxidizing and reducing bacteria had their genomic DNA (rDNA region 16S) sequenced for identification. Plants were also harvested to estimate grain yield. Crinkle leaf plants had lower shoot dry weight and yield. In plants with symptom, leaf contents of P, Ca, Mg, Mn and B were higher, but showed lower concentrations of K. In soil, sum of bases, CEC, Ca, Mg and Fe concentrations (0-5 cm) were higher in the symptomless sites, while the available P and the Zn concentrations (10-20 cm) were lower. The microbiological attributes of soil differed between the areas with and without symptom only in the 2012/13 crop, where MBC was higher in the areas without symptom. At 0-5 cm and in the rhizosphere of soybean, the CFU of Mn-oxidizing bacteria was higher in the soil of the symptomless area, while the number of rhizosphere reducing bacteria was higher in the area with symptom. The balance between the Mn-oxidizing and reducing bacteria reflected in the Mn levels in plants, but not in soil availability. Phylogeny analysis indicated that the Mn-reducing bacteria belong to the genus *Streptomyces*, whereas the Mn-oxidizing belong to the genera *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Novosphingobium*, *Agrobacterium*, *Variovorax*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*. Different concentrations of P, Ca, Mg and Mn among plants with and without symptoms and in the soil suggest that the symptoms may be related to the balance among these nutrients, but deeper studies must be carried out. Despite high concentrations in soil and plant, regardless the occurrence of symptoms, Mn could not be pointed out as cause of the problem. Probably a multifactorial interaction is involved in the manifestation of the symptoms and must be more well studied.

Keywords: Microbial activity. Reducing and oxidizing Mn bacteria. 16S rDNA. Calcium. Mycorrhiza.

3.3 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem sido relatado o aparecimento de encarquilhamento foliar e redução do crescimento em reboleiras de áreas comerciais de soja no Estado do Paraná-Brasil. Devido à grande importância dessa cultura para a economia do país, investigações têm sido conduzidas a fim de detectar possíveis causas e assim adequar o manejo para atenuação ou eliminação do problema, que diminui a produtividade em casos mais extremos. Sintomas de encarquilhamento foliar podem ocorrer por várias causas, desde desequilíbrios nutricionais, como excesso de Mn, deficiências de Ca e B, por temperaturas baixas, fitotoxidez ou por fatores bióticos, como ataque de ácaros e tripses.

O Brasil apresenta a maior parte de sua área agrícola com solos ácidos, em que os altos teores de Mn e de Al são considerados fatores limitantes ao desenvolvimento das culturas (FOY et al., 1984). Embora o Mn seja essencial ao desenvolvimento das plantas e de outros organismos, quando em excesso pode se tornar tóxico (NOGUEIRA et al., 2007). A toxidez de Mn causa sintomas na planta como manchas marrons em folhas maduras, clorose interneval, redução da capacidade fotossintética, atraso no crescimento, manchas necróticas nas hastes, encarquilhamento de folhas jovens, queima das pontas das folhas e flores e necrose de folhas jovens (FOY, 1984; SARKAR et al., 2004; LINDON et al., 2004; DOU et al., 2009).

Nutrientes como Ca, Mg e P interferem na absorção e translocação do Mn. A toxidez de Mn é reduzida com o aumento dos níveis de Ca nos meios de cultivo, pois o Ca frequentemente diminui a absorção de Mn II (FOY et al., 1978), o mesmo sendo observado para Mg (DAVIS et al., 1996). O fornecimento de P reduz os sintomas de toxidez por Mn em soja por mecanismos de detoxicação celular, além da formação de complexos P-Mn de baixa solubilidade (HEINTZE, 1968; FOY et al., 1984; NOGUEIRA; MAGALHÃES; CARDOSO, 2004), inativando seu excesso no interior da planta. Arines, Vilariño e Sainz et al. (1989) observaram correlação negativa entre a absorção de P e Mn II.

A disponibilidade de Mn II às plantas também é influenciada pela comunidade de microrganismos oxidantes e redutores deste elemento no solo, sendo que o balanço entre esses microrganismos pode influenciar na concentração de Mn solúvel no solo (GODO; REISENAUER, 1980; SPARROW; UREN, 1987).

Sendo assim, a atividade microbiana na rizosfera pode alterar a disponibilidade de Mn II, sujeito ao predomínio de comunidades oxidantes ou redutoras de Mn (KOTHARI, MARSCHNER, RÖMHELD, 1991; RENGEL, 1997). Em solos calcários, a concentração de Mn II na rizosfera de milho (*Zea mays* L.) diminuiu na mesma ordem em que decresceu a comunidade de microrganismos redutores de Fe e Mn (KOTHARI, MARSCHNER, RÖMHELD, 1991).

Além dos mecanismos de resistência à toxidez de Mn II inerentes à planta, existem relatos de que as associações simbióticas com fungos micorrízicos frequentemente resultam em menores níveis de Mn nos tecidos das plantas. Cardoso (1985) e Nogueira et al. (2002, 2007) observaram que a colonização micorrízica diminuiu significativamente a concentração de Mn II na parte aérea de plantas de soja e sugeriram um papel dos FMA na proteção das plantas contra níveis tóxicos de Mn II no solo.

O objetivo desse trabalho foi avaliar alterações nos atributos químicos e microbiológicos do solo e da planta, em áreas de produção agrícola com ocorrência de soja encarquilhada, visando elucidar se os mecanismos envolvidos na manifestação dos sintomas podem estar relacionados à disponibilidade de Mn.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Nas safras 2012/13 e 2013/14, áreas de soja com ocorrência de reboleiras com encarquilhamento foliar foram identificadas e georreferenciadas pela equipe da Embrapa Soja. As propriedades avaliadas neste estudo estão localizadas no Estado do Paraná, sendo duas no município de São Pedro do Ivaí (I e III), uma em Guaravera (II), duas em Cambé (IV e IX), duas em Alvorada do Sul (VI e VII), uma em Manoel Ribas (VIII), duas em Japurá (V e X), uma em Nova Aurora (XI) e uma em Santa Terezinha do Itaipu (XII), totalizando 12 propriedades. Em cada propriedade foram delimitadas três reboleiras de pelo menos 10 m² e áreas adjacentes controle sem os sintomas, a não mais que 10 m de distância, totalizando 36 amostras com problema e os seus respectivos controles. O clima da região é classificado como Cfa (Koppen), subtropical e temperado, úmido e com verões

quentes. Já os solos são argilosos, oxidicos, todos originários de derrames basálticos.

Amostragem e análises de planta e de solo

Amostras de solo e de plantas para análises químicas e microbiológicas foram coletadas no período de pré-florescimento até o florescimento pleno. Amostras de pelo menos 15 plantas foram coletadas nas reboleiras e nas áreas adjacentes sem sintomas. Na parte aérea das plantas, foi determinada a produção de massa seca para estimativa de crescimento relativo às plantas sem sintomas. O terceiro e o quarto folíolo foram coletados e secos a 50-60 °C em estufa com circulação forçada de ar até obtenção de massa constante para realização da diagnose foliar a partir do extrato nítrico-perclórico (SARRUGE; HAAG, 1974). Nas raízes foi realizada contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias oxidantes e redutoras de Mn na rizosfera e estimada a colonização micorrízica.

Nas reboleiras e nas áreas testemunha adjacentes, foram coletadas amostras de terra nas profundidades de 0-5, 5-10, 10-20 e 20-40 cm. Amostras compostas por 12 subamostras, foram peneiradas (2 mm) e armazenadas a 4 °C em umidade de campo para realização das análises microbiológicas (apenas 0-5 e 5-10 cm) ou secas ao ar para realização das análises químicas (todas as profundidades). As amostras de terra seca ao ar foram analisadas para determinação de: pH CaCl₂, C orgânico, P disponível, Ca, Mg, K, Al, H+Al, soma de bases, CTC, saturação por bases, micronutrientes metálicos (Fe, Cu, Mn e Zn) e B (EMBRAPA, 1997).

Ao final do ciclo da cultura, as plantas foram amostradas para a estimativa da produtividade de grãos.

Análises microbiológicas e moleculares

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi estimado pelo método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987). Duas alíquotas de 20 g de terra de cada amostra, em umidade de campo, foram pesadas e uma foi fumigada por 24 h a 25° C com clorofórmio. Após 24 h de fumigação, foi realizada a extração com K₂SO₄ 0,5 M e filtração. O carbono orgânico no extrato das duas

alíquotas de solo foi quantificado por colorimetria (BARTLETT; ROSS,1988) e o CBM calculado com base na diferença entre o C da amostra fumigada e o da amostra não fumigada, utilizando-se um fator $K_c = 0,41$.

A atividade microbiana do solo foi estimada pela respiração basal, em que o CO_2 liberado pela respiração dos microrganismos solo é capturado por uma solução de NaOH (ALEF, 1995). Foram pesados 50 g das amostras de solo em frascos de vidro com armadilhas contendo 10 mL de solução de NaOH 1N, e seguiu-se a incubação por 4 dias em temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi adicionado 1 mL de solução BaCl_2 saturada e 2 gotas do indicador fenolftaleína ao remanescente da solução de NaOH, e então foi titulado com solução de HCl 1N.

As raízes foram lavadas em água corrente e clarificadas em solução de KOH 10% por 15 min a 90 °C, lavadas novamente, e acidificadas em HCl 1% por 10 min. Após a clarificação, foram coradas com solução de azul de Tripiano (PHILLIPS; HAYMAN, 1970) lactoglicerol por 5 min a 100 °C, em vapor fluente. A colonização micorrízica radicular foi avaliada pelo método da placa quadriculada (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980) após a coloração.

O número de UFC de bactérias oxidantes e redutoras de Mn na região rizosférica (substrato aderido à raiz) foi estimado pela diluição inicial de 10 g de raízes com terra aderida em 90 mL de solução salina (NaCl 0,90%) e diluições seriadas em tubos de ensaio com 9 mL da mesma solução, até as diluições de 1×10^{-3} a 1×10^{-5} , das quais foram espalhados 50 μL para placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura e incubadas em triplicata a 28 °C. As bactérias redutoras de Mn foram avaliadas após cinco dias do plaqueamento, contando-se as colônias que formaram halo claro no meio de cultura contendo Mn oxidado, pela conversão do Mn^{+4} a Mn^{+2} (MARSCHNER et al., 1991). As bactérias oxidantes de Mn foram avaliadas após sete dias do plaqueamento, contando-se as colônias que formaram deposição de Mn oxidado, de coloração marrom escura, no meio de cultura de Garretsen, contendo Mn reduzido (HUBER; GRAHAM, 1992), modificado pela adição de apenas 0,8 g L^{-1} de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e não 5 g L^{-1} como indicado no método original. Assim como na rizosfera, nas amostras de terra armazenadas sob refrigeração, foi realizada a avaliação do número de UFC de bactérias oxidantes (HUBER; GRAHAM, 1992) e redutoras de Mn (RIDGE; ROVIRA, 1971; modificado por MARSCHNER; ASCHER; GRAHAM, 1991), pela diluição em série do substrato em solução salina 0,90% e plaqueamento de 50 μL das diluições 1×10^{-3} a 1×10^{-5} .

Após a estimativa das UFC, as colônias de bactérias oxidantes e redutoras de Mn foram isoladas e purificadas em novas placas com o meio de cultura correspondente, e então transferidas para meio YM com 30% de glicerol para armazenamento a -80 °C até o momento de uso. Os isolados de bactérias redutoras de Mn foram identificados como “Re” de “1-20”, e os oxidantes de Mn como “Ox” de “21-44” (Tabelas 1 e 2).

Tabela 3.1 Bactérias redutoras de Mn isoladas do solo de diferentes propriedades (I a XII) na safra 2012/13 e 2013/14, selecionadas para sequenciamento do 16S RNAr.

Redutoras de Mn			
----- Safra 2012/13 -----		----- Safra 2013/14 -----	
Identificação	Propriedade	Identificação	Propriedade
Re1	I	Re18	X
Re2	II	Re19	XII
Re3 [†]	IV	Re20	XII
Re4 [†]	IV	-----	-----
Re5 [†]	TOMIO	-----	-----
Re6 [†]	V	-----	-----
Re7 [†]	VI	-----	-----
Re8 [†]	VI	-----	-----
Re9 [†]	VII	-----	-----
Re10	VII	-----	-----
Re11 [†]	VII	-----	-----
Re12 [†]	VIII	-----	-----
Re13 [†]	VIII	-----	-----
Re14 [†]	IX	-----	-----
Re15 [†]	IX	-----	-----
Re16	IX	-----	-----
Re17	VIII	-----	-----

[†] Isolados de bactérias redutoras de Mn sequenciados para 16S RNAr.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 3.2 Bactérias oxidantes de Mn isoladas do solo de diferentes propriedades (I a XII) na safra 2012/13 e 2013/14, selecionadas para sequenciamento do 16S RNAr.

Oxidantes de Mn			
----- Safra 2012/13 -----		----- Safra 2013/14 -----	
Identificação	Propriedade	Identificação	Propriedade
Ox21	I	Ox44	XII
Ox22	I	Ox45	XI
Ox23	II	Ox46	XII
Ox24 [†]	III	-----	-----
Ox25 [†]	III	-----	-----
Ox26 [†]	IV	-----	-----
Ox27 [†]	V	-----	-----
Ox28	V	-----	-----
Ox29 [†]	V	-----	-----
Ox30 [†]	VI	-----	-----
Ox31 [†]	VI	-----	-----
Ox32 [†]	VI	-----	-----
Ox33 [†]	VI	-----	-----
Ox34 [†]	VII	-----	-----
Ox35 [†]	VII	-----	-----
Ox36 [†]	VII	-----	-----
Ox37	VII	-----	-----
Ox38 [†]	VIII	-----	-----
Ox39 [†]	VIII	-----	-----
Ox40 [†]	IX	-----	-----
Ox41 [†]	IX	-----	-----
Ox42	IX	-----	-----
Ox43 [†]	IX	-----	-----

[†] Isolados de bactérias oxidantes de Mn sequenciados para 16S RNAr.

Fonte: Próprio autor.

O sequenciamento do gene 16S RNAr foi feito a partir do DNA genômico obtido dos isolados de maior abundância visual e com distintas características morfológicas de colônia (Tabelas 1 e 2). A extração do DNA foi realizada com o kit AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep da Axygen

Biosciences, de acordo com as recomendações do fabricante e quantificado em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de DNA o marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen, Brasil) e coloração com brometo de etídio 0,00005%. O DNA foi amplificado, purificado e o gene 16S RNAr sequenciado com vistas à comparação das sequências em bancos de dados para homologia. As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa MEGA 6.0- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (TAMURA et al., 2011) e as relações filogenéticas foram obtidas pelo modelo de distância evolutiva Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993), com o algoritmo *Maximum Likelihood* (FELSENSTEIN, 1981). A análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) forneceu o suporte estatístico com 1000 repetições (HEDGES, 1992).

Amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

A amplificação do DNA de cada isolado foi realizada de acordo com Weisburg et al. (1991), utilizando os primers universais fD1 e rD1. Foi utilizado 1 µL (20 ng/µL) de DNA genômico e os demais reagentes foram calculados para um volume final da PCR de 50 µL, sendo 36,3 µL de água ultrapura, 5 µL de Tampão 10X (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, KCl 50 mM); 3 µL dNTP (Invitrogen, Brasil); 1,5 µL de MgCl₂ (3 mM); 1,5 µL de cada primer fD1 e rD1; 0,2 µL (1 U) de Taq polimerase (Invitrogen, Brasil). A amplificação foi realizada em Termociclador DNA Engine gradient cycler (Research INC, USA), cujos ciclos constam na Tabela 3.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit PureLink™ (Invitrogen, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, a concentração da amostra foi verificada em gel de agarose a 1% por electroforese de 2 µL de produtos de PCR com coloração com brometo de etídio 0,00005%.

Sequenciamento do gene 16S RNAr

As placas de sequenciamento foram montadas com os produtos de PCR de cada isolado bacteriano (20 ng por reação), 3 µL do corante dye (*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*) e 3 pmol de cada iniciador (Tabela 3).

Tabela 3.3 Sequências dos iniciadores e ciclo utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 16S RNAr.

Iniciador	Sequência 5' - 3'	Ciclos
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(WEISBURG et al., 1991)
rD1	CTTAAGGAGGTGATCCAGCC	
362f	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	
786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	
Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	
1203f	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC	

Fonte: HELENE, 2015.

O programa utilizado foi de desnaturação a 96 °C por 1 min, 15s a 96°C; anelamento 50 °C por 15s e extensão a 60 °C por 4 min em um ciclo que se repetiu 35 vezes. O produto do sequenciamento foi analisado em sequenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas com o auxílio do programa Bionumerics (versão 7.1) e corrigidas com base em sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) do NCBI. O alinhamento das sequências foi feito com o programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2011).

Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), teste F e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$). Os dados de MSPA, produtividade e diagnose foliar foram submetidos ao teste de Dunnett ($p < 0,05$). Os dados de Mn foliar foram relativizados em porcentagem, sendo as áreas sem sintoma consideradas como 100%, e as áreas com sintoma calculadas em relação ao máximo teor encontrado, e então foram submetidos ao teste de Dunett ($p < 0,05$). Contudo, as médias apresentadas para o teor de Mn são as médias absolutas. O conjunto de dados também foi submetido à Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando-se dados das análises químicas e microbiológicas como variáveis explicativas dos teores de manganês no solo e na planta. A significância das variáveis explicativas foi verificada a $p < 0,05$.

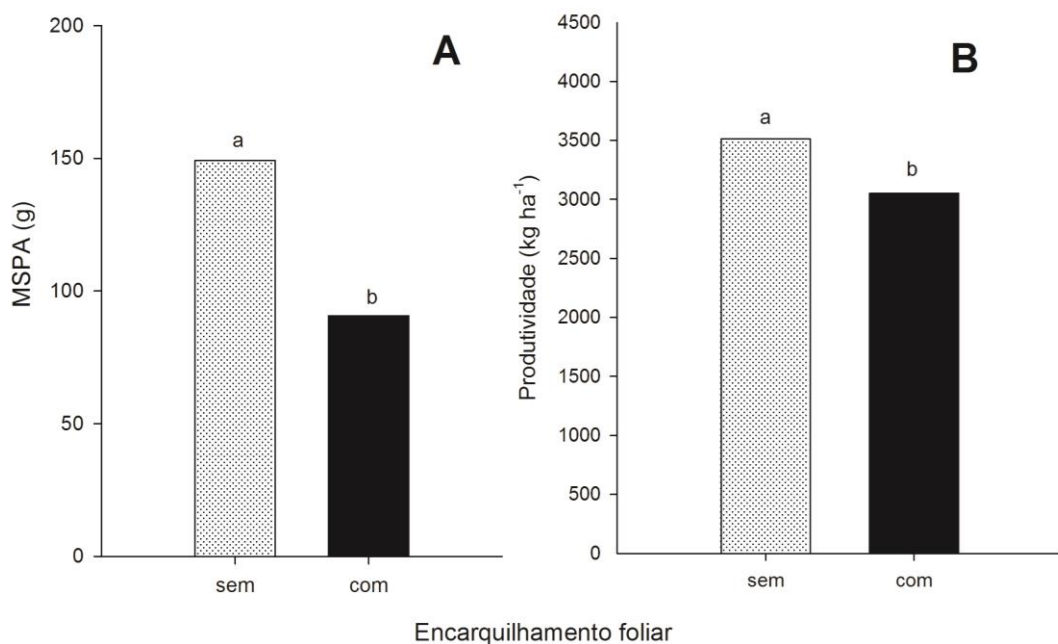
pelo teste de permutações de Monte Carlo no modo “forward selection”.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Massa Seca de Parte Aérea, Produtividade e Propriedades Químicas do Solo

Em ambas as safras, as plantas com sintoma de encarquilhamento tiveram menor desenvolvimento de parte aérea, com uma redução de 39,2% em relação às plantas normais (Figura 1A). O teste de Dunnett apontou reduções significativas na produtividade (13,5%) das áreas com sintoma de encarquilhamento foliar na soja (Figura 1B).

Figura 3.1 Massa seca de parte aérea de 5 plantas em g (A) e produtividade em kg ha⁻¹ (B) de plantas de soja com e sem sintomas de encarquilhamento foliar, na média das safras 2012/13 e 2013/14. Letras distintas diferem entre si pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).



Fonte: Próprio autor.

Na safra 2012/13, os teores foliares nas plantas de soja foram significativamente diferentes entre as áreas com e sem sintoma para P, K e B (Tabela 4). O teor de P foi maior nas plantas com sintomas de encarquilhamento foliar (2,4 g kg⁻¹), enquanto as áreas sem sintomas apresentaram valores mais

elevados de K, 23,1 g kg⁻¹. Os teores de Ca, Mg, S, Fe, Cu e Zn não diferiram entre plantas com e sem encarquilhamento foliar. Já o B e o Mn diferiram significativamente, sendo os teores maiores nas plantas com sintomas (59,9 mg kg⁻¹ e 120,3 mg kg⁻¹, respectivamente).

Tabela 3.4 Diagnóstico foliar de soja com e sem sintoma de encarquilhamento, na safra 2012/13.

Sintoma	P	K	Ca	Mg	S	Mn	Fe	Cu	Zn	B
	g kg ⁻¹					mg kg ⁻¹				
Com	2,4a	19,6b	14,8a	3,7a	2,2a	120,3a	285,3a	10,7a	61,2a	59,9a
Sem	2,1b	23,1a	13,6a	3,3a	2,1a	108,5b	230,4a	10,0a	59,2a	54,6b
CV, %	14,4	15,5	10,5	11,1	13,9	33,0	25,0	13,9	25,3	11,8
dms	0,2	1,8	0,8	0,2	0,2	20,9	2,1	0,8	8,4	3,7
-----Teores de referência ¹ -----										
Baixo	<2,5	<22,4	<8,2	<3,0	<2,5	<40	<119	<8	<22	<52
Suficiente	2,5-3,6	22,4-26,7	8,2-10,8	3,0-4,8	2,5-3,5	40-94	119-211	8-11	22-38	52-60
Alto	>3,6	>26,7	>10,8	>4,8	>3,5	>94	>211	>11	>38	>60

Letras distintas dentro de cada coluna diferem entre si pelo teste de Dunnett a $p \leq 0,05$.

Fonte: Próprio autor; ¹ Teores de referência: HARGER, 2008.

Os resultados da análise química de solo não indicaram diferença significativa entre áreas com e sem sintomas de encarquilhamento quanto ao pH em CaCl₂, C_{org}, teores de Al, H+Al, Ca/Mg, V%, K e os micronutrientes Cu e Mn para nenhuma das profundidades avaliadas (Tabela 5). O pH em CaCl₂ do solo variou de 5,4 a 5,5 nas áreas com sintoma e 5,4 a 5,7 nas áreas sem sintoma, valores considerados adequados para o cultivo da soja (FAGERIA; BALIGAR, 2008). A relação Ca/Mg aumentou ligeiramente com a profundidade, conforme também observou Sfredo et al. (1999b).

As áreas com e sem sintomas de encarquilhamento diferiram quanto à SB e CTC do solo em todas as profundidades. Tanto a SB quanto a CTC foram maiores no solo das áreas que não apresentavam plantas com sintomas. A menor média para SB foi de 11,3 cmol_c dm⁻³ em área com sintomas na camada de 10-20 cm, enquanto a maior foi de 13,2 cmol_c dm⁻³ na camada mais superficial da área sem sintomas. De modo semelhante à SB, a CTC apresentou os maiores valores nas áreas sem sintoma em todas as camadas, variando de 15,2 a 17,1 cmol_c dm⁻³.

Tabela 3.5 Atributos químicos do solo em quatro profundidades (0-5, 5-10, 10-20 e 20-40 cm), coletado em doze propriedades agrícolas no Paraná de áreas com e sem sintomas de encarquilhamento foliar em plantas de soja, safras 2012/13 e 2013/14.

SINTOMAS	pH CaCl ₂	Corg g dm ⁻³	Al	H+Al	Ca/Mg	Ca cmol _c	Mg dm ⁻³	K	SB	CTC	V %	P	Cu	Fe mg dm ⁻³	Mn ¹	Zn
0-5 cm																
Com	5,7	21,7	0,0	4,1	3,4	8,72	2,6	1,0	12,3	16,4	73,9	17,8	20,3	38,86	113,1	10,4
Sem	5,7	22,6	0,0	4,0	3,5	9,36	2,8	1,0	13,2	17,1	74,4	13,8	19,7	43,19	115,0	9,6
P	0,22 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,00*	0,06 ^{ns}	0,53 ^{ns}	0,00*	0,01*	0,48 ^{ns}	0,04*	0,49 ^{ns}	0,02*	0,73 ^{ns}	0,09 ^{ns}
CV, %	3,08	9,16	1,79	8,37	11,55	9,17	16,58	22,55	9,59	6,69	4,23	51,56	18,28	18,11	21,23	19,09
5-10 cm																
Com	5,5	19,4	0,0	4,3	3,7	8,76	2,4	0,8	12,0	16,3	72,2	17,8	22,0	43,10	117,6	10,6
Sem	5,5	19,2	0,0	4,2	3,7	9,31	2,7	0,7	12,7	17,0	72,3	12,6	21,5	45,29	120,6	9,59
P	0,77 ^{ns}	0,63 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,02*	0,00*	0,27 ^{ns}	0,01*	0,01*	0,88 ^{ns}	0,00*	0,64 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,06 ^{ns}
CV, %	3,94	8,28	2,14	9,11	14,37	11,07	9,45	26,87	9,50	6,06	5,03	52,47	19,66	22,19	20,24	21,76
10-20 cm																
Com	5,4	15,5	0,0	4,3	4,2	8,66	2,2	0,5	11,3	15,6	70,1	9,5	25,2	47,38	143,4	8,1
Sem	5,5	15,3	0,0	4,3	4,3	9,39	2,5	0,5	12,3	16,7	69,8	6,4	25,6	49,76	141,4	6,8
p	0,37 ^{ns}	0,71 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,87 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,00*	0,34 ^{ns}	0,04*	0,01*	0,79 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,78 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,02*
CV, %	5,48	12,51	2,61	11,13	18,24	17,95	16,67	37,33	16,43	10,64	6,22	32,74	23,08	20,95	26,29	29,62
20-40 cm																
Com	5,5	11,4	0,0	3,9	4,2	8,70	2,3	0,4	11,4	15,2	72,2	5,7	24,0	50,72	73,3	4,3
Sem	5,6	11,2	0,0	3,8	4,5	9,52	2,6	0,3	12,4	16,2	72,4	3,6	24,5	49,93	73,4	3,6
P	0,13 ^{ns}	0,71 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,01*	0,01*	0,12 ^{ns}	0,01*	0,01*	0,76 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,63 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,19 ^{ns}
CV, %	4,34	22,82	0,23	9,79	22,07	14,51	20,46	48,59	14,14	10,02	4,93	38,89	21,95	13,58	47,22	53,45

Corg - Carbono orgânico; SB - Soma de bases; CTC - Capacidade de troca catiônica (Σ K, Ca, Mg, H+Al); 1 Mn em DTPA; CV - coeficiente de variação* significativo pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), ns – não significativo. **Fonte:** Próprio autor.

O teor de Ca, exceto da camada de 10-20 cm, foi maior em todas as profundidades nas áreas sem sintoma, com médias de 9,3 a 9,5 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ enquanto que no solo em que as plantas apresentavam encarquilhamento foliar atingiram 8,8 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$. Quanto ao Mg, exceto na camada 0-5 cm, as áreas com e sem sintomas diferiram entre si em todas as camadas, sendo os valores mais elevados encontrados nas áreas sem sintomas, de forma semelhante ao teor de Ca. Os teores de P nas camadas superiores (0-5 e 5-10 cm) foram significativamente maiores nas áreas com sintomas, com médias de 17,8 e 17,8 mg dm^{-3} , respectivamente, enquanto no solo das áreas sem sintomas os valores foram mais baixos, de 13,8 e 12,6 mg dm^{-3} , nas respectivas camadas.

O teor de Fe foi menor nas áreas com sintomas de encarquilhamento na camada de 0-5 cm com média de 38,9 mg dm^{-3} , sendo que nas demais camadas não houve diferença significativa. Na camada de 10-20 cm, os teores de Zn foram significativamente maiores nas áreas com sintomas. As médias das áreas com sintomas variaram de 4,3 a 10,4 mg dm^{-3} , e nas áreas sem sintoma foram encontrados valores de 3,6 a 9,6 mg dm^{-3} .

3.5.2 Atributos Microbiológicos do Solo e da Rizosfera

A colonização micorrízica foi semelhante entre as áreas com e sem sintomas de encarquilhamento foliar, com média de 68,9 e 73,4%, respectivamente (Tabela 6).

Na safra 2012/13, o CBM não diferiu entre as áreas com e sem sintomas de encarquilhamento foliar nas duas profundidades (0-5 e 5-10 cm), assim como não houve efeito sobre a respiração basal (Tabela 6). Na camada de 0-5 cm e na rizosfera da soja, o número de UFC de bactérias oxidantes de Mn foi maior no solo da área sem sintomas. Em geral, o número de UFC de bactérias oxidantes de Mn foi mais elevado do que a de redutoras, independente da profundidade do solo. Na rizosfera, maior número de bactérias oxidantes de Mn foi observado nas plantas sem sintomas, enquanto que as redutoras de Mn foram mais frequentes na rizosfera das plantas provenientes de áreas com sintomas. Na safra de 2013/14, não foi observada diferença significativa para o CBM e para o número de UFC de bactérias oxidantes e redutoras do Mn entre as áreas.

Tabela 3.6 Colonização micorrízica, carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal e número de unidades formadoras de colônia (UFC g⁻¹) de microrganismos oxidantes e redutores de manganês, no solo e na rizosfera de plantas de soja com e sem sintomas de encarquilhamento foliar, na safra 2012/13 e 2013/14.

		-----Sintomas-----		P < 0,05	CV, %	
		COM	SEM			
<u>Colonização micorrízica, %</u>		68,9	73,4	ns	17,23	
<u>CBM</u>	Profundidade, cm	mg C g ⁻¹				
	0 – 5	499,2	661,2	ns	13,55	
	5 – 10	599,0	470,2	ns	17,07	
<u>Respiração basal</u>	Profundidade, cm	mg C-CO ₂ kg ⁻¹ dia ⁻¹				
	0 – 5	58,7	64,1	ns	36,63	
	5 – 10	48,7	43,8	ns	45,71	
Safra 2012/13	<u>Microrganismos</u>	Solo				
		Profundidade, cm	UFC g ⁻¹			
	Redutores	0 – 5	1,4 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	ns	4,30
	Oxidantes	0 – 5	2,4 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁶	*	4,21
	Redutores	5 – 10	1,1 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	ns	3,72
	Oxidantes	5 – 10	1,4 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁶	ns	3,78
			Rizosfera			
			UFC g ⁻¹			
Redutores	----	2,8 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁷	*	2,80	
Oxidantes	----	6,1 x 10 ⁶	12,1 x 10 ⁶	*	4,79	
Safra 2013/14	<u>Microrganismos</u>	Solo				
		Profundidade, cm	UFC g ⁻¹			
	Redutores	0 - 5	2,7 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	ns	7,09
	Oxidantes	0 - 5	1,1 x 10 ⁶	7,0 x 10 ⁵	ns	3,78
	Redutores	5 - 10	1,5 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁶	ns	5,10
	Oxidantes	5 - 10	6,1 x 10 ⁵	6,1 x 10 ⁵	ns	6,85
			Rizosfera			
			UFC g ⁻¹			
Redutores	----	3,7 x 10 ⁷	2,1 x 10 ⁷	ns	4,83	
Oxidantes	----	3,3 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	ns	5,47	

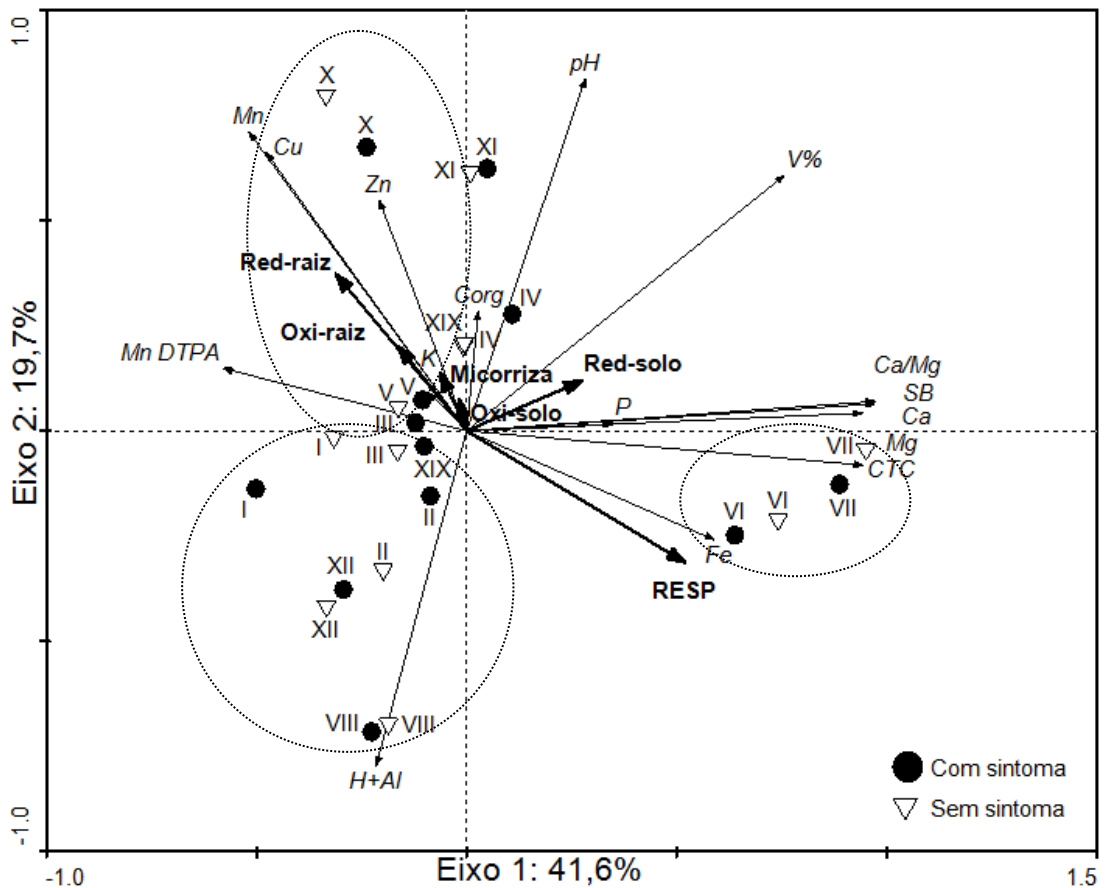
CBM – Carbono da biomassa microbiana. *Significativo a P < 0,05, ns – não significativo.

Fonte: Próprio autor.

A análise de componentes principais relacionou os padrões das propriedades químicas e microbiológicas das camadas de 0-5 e 5-10 cm do solo nas áreas com e sem sintomas de encarquilhamento foliar (Figuras 2 e 3). Em geral, as áreas com e sem sintomas não apresentaram dissimilaridade quanto a esses atributos. Na profundidade de 0-5 cm, as áreas VI e VII mostraram maior similaridade entre si seguidas pelas áreas I, II, VIII, XII, área III sem sintomas e área IX com sintomas (Figura 2). As áreas IV e XI formaram outro grupamento e, finalmente, as áreas V, X, IX sem sintomas e a área III com sintomas, que apresentaram menor similaridade. As áreas VI e VII foram similares para CTC, Fe e respiração basal. O pH, C_{org}, V%, SB, Ca, Mg, Ca/Mg, P e microrganismos redutores de Mn no solo foram similares nas áreas IV e XI. Os microrganismos redutores e

oxidantes de Mn na rizosfera, os oxidantes de Mn do solo e a colonização micorrízica, juntamente com os micronutrientes (Mn, Mn em DTPA, Cu e Zn) e o teor de K se correlacionaram com as áreas III, V, X, e IX e apresentaram correlação negativa com a respiração basal. As áreas I, II, VIII e XII apresentaram maior similaridade para H+Al.

Figura 3.2 Análise de componentes principais de atributos químicos (pH, Carbono orgânico-Corg, Al, H+Al, Ca/Mg, Ca, Mg, P, K, SB, CTC, V%, Cu, Mn, Fe, Mn em Mehlich I, Mn em DTPA e Zn) e microbiológicos (respiração basal, colonização micorrízica e UFC de microrganismos oxidantes e redutores de Mn), do solo e da rizosfera de plantas de soja coletados na profundidade de 0-5 cm, em áreas com e sem sintomas (I-XII) de encarquilhamento foliar.

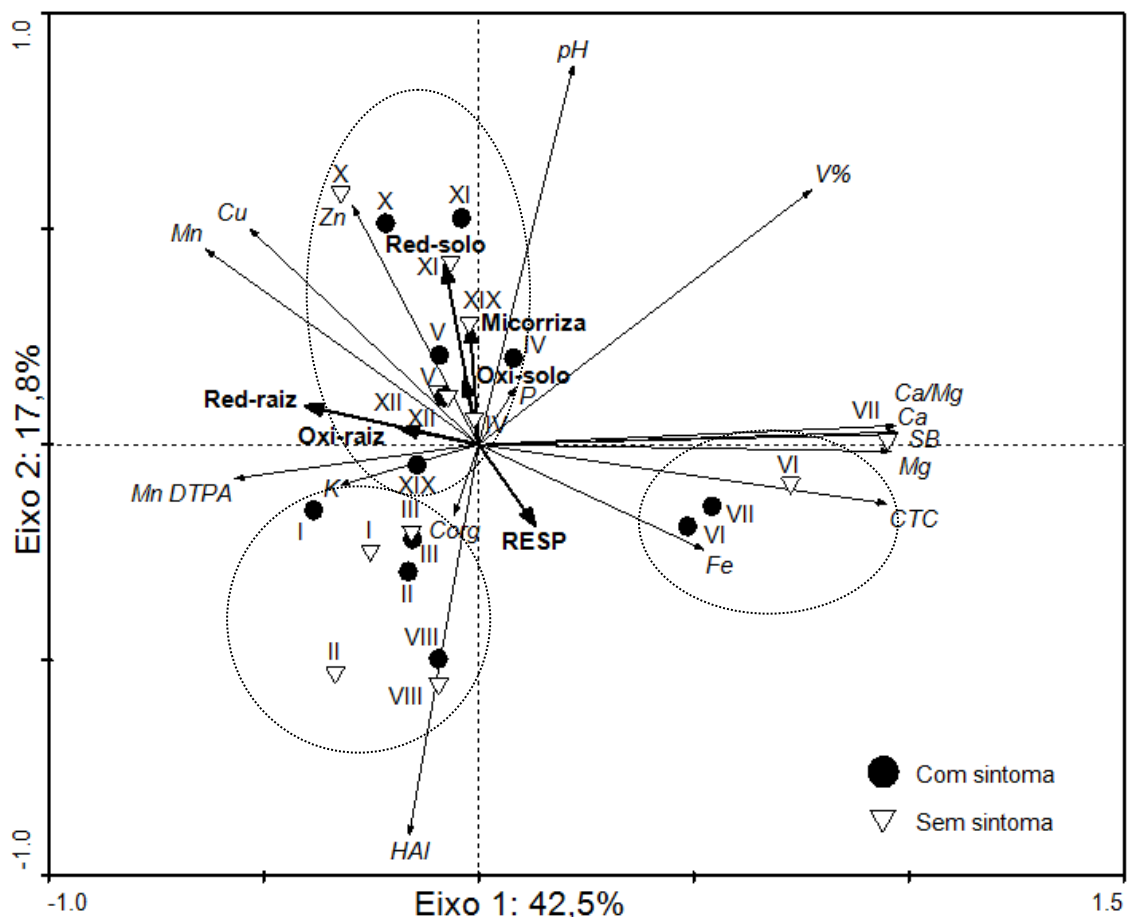


Fonte: Próprio autor.

Na profundidade de 5-10 cm, 42,5% da variação dos dados foi explicada pelo Eixo 1 e 17,8% pelo Eixo 2 (Figura 3). As áreas se agruparam de forma semelhante ao que foi visto na profundidade 0-5 cm, não sendo observada

dissimilaridade entre as áreas com e sem sintomas de encarquilhamento foliar. Os microrganismos oxidantes e redutores de Mn se correlacionaram negativamente com a respiração basal. As variáveis químicas representaram a maior parte da variação dos dados em ambas as profundidades. Os teores de Mn disponível apresentaram relação inversa com os de Ca, Mg e Fe.

Figura 3.3 Análise de componentes principais baseada em atributos químicos (pH, Carbono orgânico - Corg, Al, H+Al, Ca/Mg, Ca, Mg, P, K, SB, CTC, V%, Cu, Mn, Fe, Mn em Mehlich I, Mn em DTPA e Zn) e microbiológicos (respiração basal, colonização micorrízica e UFC de microrganismos oxidantes e redutores de Mn), do solo e da rizosfera de plantas de soja, coletados na profundidade de 5-10 cm, em áreas com e sem sintomas (I-XII) de encarquilhamento foliar.



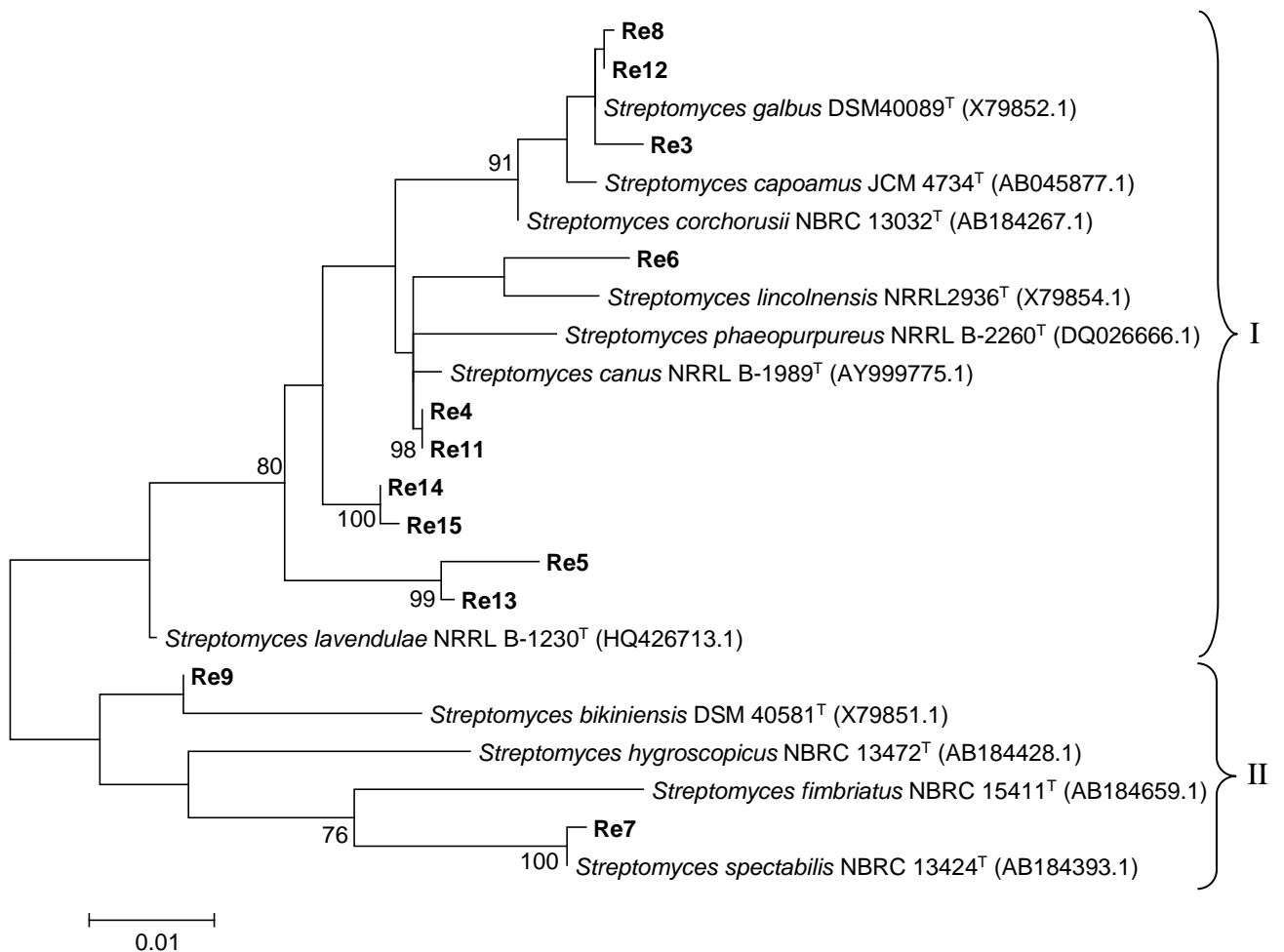
Fonte: Próprio autor.

Filogenia do Gene 16S RNAr de bactérias oxidantes e redutoras de Mn

O sequenciamento parcial do gene 16S RNAr revelou que os isolados de bactérias redutoras de Mn pertencem ao gênero *Streptomyces* (Figura

4). Na árvore filogenética foram formados dois grandes grupos, sendo que o grupo I englobou 10 isolados (Re3, Re4, Re5, Re6, Re8, Re11, Re12, Re13, Re14 e Re15), e o segundo (II) agrupou somente dois isolados (Re9 e Re7). Os isolados Re8, Re12 e Re3 formaram um subgrupo com *S. galbus*, integrando um grupo maior com *S. capoamus* e *S. corchorusii*. Um segundo subgrupo se formou com os isolados Re6, Re4 e Re11, *S. phaeopurpureus* e *S. canus*, sendo que o isolado Re6 se agrupou com *S. lincolnensis*. *Streptomyces bikiniensis* se agrupou com o isolado Re9 e *S. spectabilis* formou um subgrupo com o isolado Re7.

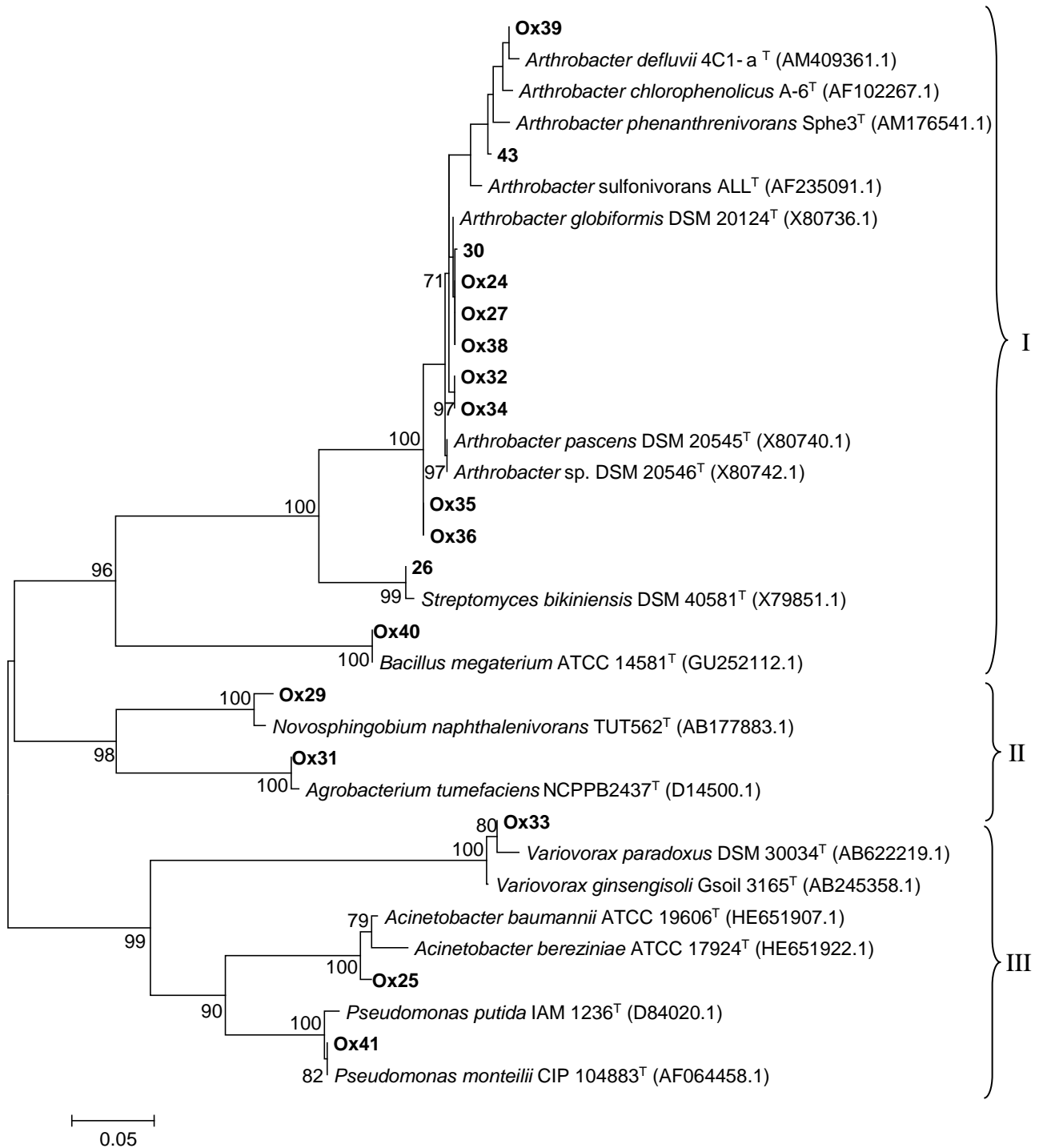
Figura 3.4 Relações filogenéticas de isolados de bactérias redutoras de Mn, obtidos de áreas com e sem sintomas de encarquilhamento foliar em soja, baseadas no sequenciamento parcial do gene 16S RNAr. A árvore filogenética foi construída com o algoritmo Maximum likelihood. Nos ramos são apresentados valores de bootstrap ≥ 70 %, com 1000 repetições.



Fonte: Próprio autor.

A árvore filogenética construída pela comparação das sequências de 16S RNAr das bactérias oxidantes de Mn com sequências depositadas no Genbank apresentou uma variedade de gêneros, que se dividiram em 3 grandes grupos: I, II e III (Figura 5). O grupo I englobou 12 isolados dos gêneros *Arthrobacter*, *Streptomyces* e *Bacillus*, sendo que *Arthrobacter* foi o gênero predominante entre as bactérias oxidantes, apresentando o maior número de isolados. O grupo II concentrou apenas dois isolados de *Novosphingobium* e *Agrobacterium*. *Variovorax*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* formaram o grupo III, com três isolados: Ox30, Ox22 e Ox38, respectivamente. O isolado Ox23 apresentou 99% de similaridade com *Streptomyces bikiniensis* e o Ox37 teve 100% de similaridade com *Bacillus megaterium*. Já os isolados Ox21, Ox24, Ox27, Ox29, Ox31, Ox32, Ox33, Ox35, Ox36 e Ox40 apresentaram 100% de similaridade com *Arthrobacter*. O isolado Ox26 se agrupou com *Novosphingobium naphthalenivorans* e o isolado Ox28 com *Agrobacterium tumefaciens*.

Figura 3.5 Relações filogenéticas de isolados de bactérias oxidantes de Mn obtidos de áreas com e sem sintoma de encarquilhamento foliar em soja baseadas no sequenciamento parcial do gene 16S RNAr. Nos ramos são apresentados valores de bootstrap ≥ 70 %, com 1000 repetições. O algoritmo utilizado foi o Maximum likelihood.



Fonte: Próprio autor.

3.6 DISCUSSÃO

A produtividade de leguminosas é reduzida em condições de desequilíbrio nutricional como deficiência ou excesso de nutrientes (HANNAM et al., 1984; HEENAN; CAMPBELL, 1980; MASCANI; COX, 1985; WALTON, 1978). Na soja, a queda na produtividade, em condições de deficiência ou toxidez de Mn, é atribuída ao baixo número de nós férteis e sementes mais leves (HEENAN; CAMPBELL, 1985). A redução no crescimento das plantas, visível a campo, se confirmou na avaliação da massa seca de parte aérea (MSPA), em ambas as safras avaliadas. A menor MSPA das plantas com sintomas se refletiu na produtividade de grãos de soja, com perdas significativas nestas áreas.

A aplicação de calcário calcítico ou dolomítico na correção do solo é uma prática comum em áreas agrícolas com solos tropicais. A calagem resulta no aumento do pH, da SB e na redução da toxidez por Al, além de aumentar os teores de Ca e Mg do solo (FAGERIA, 2000, 2001a; FAGERIA; STONE, 2004). Em todas as áreas avaliadas, o pH estava na faixa adequada para o cultivo de leguminosas em solos tropicais, variando de 5,3 a 6,4 (FAGERIA; BALIGAR, 2008), condição favorável à máxima disponibilidade de nutrientes no solo (MALAVOLTA, 1979).

Em contrapartida, a calagem excessiva e o aumento da concentração de Ca podem interferir na disponibilidade e absorção de outros nutrientes por competição pelas cargas do solo e/ou imobilização por reações com o CaCO_3 e MgCO_3 (CLARK, 1984; MARSCHNER, 1995). Nas áreas com sintomas de encarquilhamento foliar, o teor de Ca no solo foi menor, mas não resultou em diminuição do teor foliar, enquanto nas áreas sem sintomas, a concentração no solo e nas plantas foi maior. Apesar de não haver diferença estatística entre as plantas com e sem sintomas de encarquilhamento, os teores de Ca nas folhas foram considerados elevados (8,2 a 10,8 mg kg^{-1}) para o desenvolvimento da soja em ambas as áreas (HARGER, 2008), assim como os teores no solo também se mostraram elevados em todas as profundidades avaliadas.

O solo de ambas as áreas, com e sem o encarquilhamento foliar, apresentou teores de K considerados muito bons, entretanto, as plantas não estavam nutricionalmente equilibradas quanto a este nutriente. O aumento na concentração de Ca^{+2} e Mg^{+2} no solo reduz a absorção de K, que pode causar deficiência em plantas por inibição competitiva entre os cátions (CLARK, 1984;

MARSCHNER, 1995; OLIVEIRA; CARMELLO; MASCARENHAS, 2001). O teor de K nas plantas das áreas com sintomas foi baixo ($<22,4 \text{ g kg}^{-1}$), enquanto nas áreas controle foi suficiente a cultura ($22,4 \text{ a } 26,7 \text{ g kg}^{-1}$), sugerindo efeito competitivo da maior disponibilidade de Ca no solo sobre a absorção de K (EMBRAPA, 2014). Por sua vez, os teores de Ca e Mg do solo são considerados altos comparativamente a valores de referência (Ca^{+2} , $>4 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ e Mg^{+2} , $>0,8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) (SFREDO et al., 1999b).

Nas profundidades de 0-5 e 5-10 cm, o teor de P disponível foi significativamente menor nas áreas sem sintomas. Além disso, a disponibilidade do nutriente diminuiu com o aumento da profundidade, atingindo teores baixos a muito baixos em ambas as áreas (EMBRAPA, 2014), conforme esperado, devido à baixa mobilidade desse nutriente no solo. A deficiência de P é comum na maior parte dos solos brasileiros, em consequência do elevado potencial de adsorção a óxidos de Fe e Al (BINI; LOPEZ, 2016). A imobilização do P pela ligação com o Ca é umas das principais vias de redução da disponibilidade desses nutrientes no solo (SAMPLE; SOPER; RACZ, 1980), principalmente em áreas agrícolas, onde a prática da calagem é comum.

Não houve diferenças quanto ao teor de Mn nas áreas com e sem sintomas, mas as concentrações são consideradas elevadas para o cultivo de soja (EMBRAPA, 2014). Embora elevado, o teor foliar de Mn na soja se mostrou menor que os apresentados na literatura para plantas intoxicadas por excesso de Mn. FOY (1984) observou sintomas de toxidez em folhas recém-maduras de soja com teores acima de 160 mg kg^{-1} . Já Marschner (1995) considerou como nível crítico para a soja concentrações superiores a 600 mg kg^{-1} .

As plantas das áreas com sintomas de encarquilhamento foliar diferiram estatisticamente das plantas controle quanto ao teor de Mn, contudo, sem demonstrar dissimilaridade entre as áreas com e sem encarquilhamento foliar quando considerada a combinação de variáveis químicas e microbiológicas na análise multivariada. Além disso, o aumento nos níveis de Ca nos meios de cultivo causa redução da toxidez por excesso de Mn, o que demonstra a influência do Ca na absorção e na translocação do Mn na planta (FOY et al., 1978; LE BOT; KIRKBY; VAN BEUSICHEM, 1990). Do mesmo modo, Moreira et al. (2003) observaram um decréscimo na absorção de Mn, em raízes destacadas de soja, com o aumento da

concentração de Mg na solução nutritiva. Isso remete à teoria da interação entre os íons que parece ter interferido nos resultados.

Altos valores de CTC do solo também contribuem para a redução da ocorrência de toxidez de Mn por retenção do cátion aos sítios de troca, o que altera sua disponibilidade às raízes das plantas (FOY, 1984). Como o solo das áreas sem sintomas de encarquilhamento foliar tiveram maior CTC, sugere-se que a maior quantidade de sítios de troca do solo pode ter favorecido a imobilização do Mn, que se refletiu nos teores foliares. O teor de P é outro fator que contribui na redução da toxidez de Mn, além de desempenhar importante papel na nutrição da planta, melhorando sua capacidade de suportar estresses. A reação entre íons Mn e fosfatos no interior da planta leva à formação de complexos P-Mn insolúveis, o que diminui seu efeito tóxico (FOY, 1984).

O Mn é prontamente transportado das raízes para a parte aérea, sendo os sintomas de excesso do cátion visualizados, primeiramente, nas folhas mais velhas (MARSCHNER et al., 2012). A hipótese deste trabalho era que os sintomas presentes nas plantas de soja fossem causados pelo excesso de Mn no solo. De acordo com os limites estabelecidos pela EMBRAPA (2014), o Mn se encontra em níveis considerados muito altos em todas as áreas avaliadas. Apesar disso, não houve diferença entre as áreas com e sem sintomas para a maioria dos atributos químicos do solo, embora os teores foliares de Mn tenham sido maiores nas plantas com encarquilhamento foliar.

O levantamento do número de UFC de microrganismos oxidantes e redutores de Mn no solo e na rizosfera pode auxiliar a explicar a disponibilidade desse nutriente no solo e os teores encontrados na planta (NOGUEIRA et al., 2007) enfatizando assim o seu papel no ciclo do Mn. Na safra 2012/13, observou-se maior população de bactérias oxidantes de Mn na rizosfera de plantas sem sintomas de encarquilhamento foliar. Por sua vez, na rizosfera das plantas com encarquilhamento houve maior população de bactérias redutoras de Mn. O balanço entre bactérias redutoras e oxidantes de Mn, sobretudo na rizosfera, pode ter influenciado na concentração foliar encontrada neste estudo, mas não é suficiente para atribuir à ocorrência dos sintomas de encarquilhamento foliar ao excesso de Mn, que aparentemente não é resultante de uma única causa.

O CBM constitui a fração viva do carbono orgânico e é considerado um importante indicador de qualidade do solo, sensível a alterações em curto prazo

(SILVA et al., 2010; SOUZA et al., 2013; NAKATANI et al., 2014). Contrariamente ao número de UFC de bactérias oxidantes e redutoras do Mn na rizosfera, o CBM não teve relação com a ocorrência do encarquilhamento foliar. Em geral, a análise de componentes principais (PCA) mostrou relação positiva entre os microrganismos rizosféricos e os teores de Mn do solo, em ambos os extratores, enquanto para os teores de Ca e Mg, se posicionaram em sentido oposto.

A redução do Mn por microrganismos ocorre através de mecanismos indiretos, sendo o mais comum pela produção de metabólitos acidificantes e redutores (GHIORSE, 1988). Os 20 isolados de bactérias redutoras de Mn neste estudo pertenciam ao mesmo gênero, *Streptomyces*. Em plantas de soja micorrizadas, Nogueira et al. (2007) também observaram predominância do gênero *Streptomyces* entre os isolados de bactérias redutoras de Mn da rizosfera. O gênero *Streptomyces* produz compostos antibióticos que podem agir como supressores de outras comunidades de microrganismos (NOGUEIRA et al., 2007), o que ajuda a explicar a redução do número de bactérias oxidantes de Mn na rizosfera das plantas com sintomas.

Uma proporção significativa de isolados de bactérias oxidantes de Mn está intimamente ligada ao gênero *Arthrobacter* (BROMFIELD, 1974), enquanto os demais estão distribuídos entre os grupos de *Streptomyces*, *Bacillus*, *Novosphingobium*, *Agrobacterium*, *Variovorax*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Dentre as bactérias que habitam a rizosfera, *Pseudomonas* spp. tem expressiva importância devido ao seu papel multifuncional, com capacidade para produção de numerosos metabólitos secundários, como enzimas extracelulares e antibióticos, que auxiliam na inibição do crescimento de populações concorrentes (SCHROTH; HILDEBRAND; PANOPOULOS, 2006). A maioria dos grupos de *Pseudomonas putida* está relacionada a transformações do Mn, realizando oxidação enzimática (OKAZAKI et al. 1997; VILLALOBOS et al., 2003).

Em geral, os gêneros de maior ocorrência no solo são *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Hyphomicrobium* (HELMER, 1995; NOGUEIRA et al., 2007; VILLALOBOS et al., 2003; MADIGAN et al., 2010). Dentre os gêneros descritos com menor frequência como oxidantes de Mn estão *Enterobacter* e *Streptomyces* spp. (NOGUEIRA et al., 2007). *Arthrobacter* e *Pseudomonas* estão relacionados com processos oxidativos no solo, sendo capazes de degradar compostos solúveis e xenobiontes, como herbicidas, nicotina, cafeína, fenóis,

carbaryl (HAYATSU et al., 1999; MADIGAN et al., 2010) e benzeno (PARALES; DITTY; HARWOOD, 2000). A alta resistência à restrição hídrica e nutricional conferem às bactérias do gênero *Arthrobacter* condições necessárias à sua disseminação e estabelecimento no solo, apesar de não formarem estruturas de dormência (MADIGAN et al., 2010).

Os resultados deste estudo sugerem que *Streptomyces* spp. pode realizar ambos os processos, oxidação e redução de Mn, conforme o propósito durante seu ciclo de vida. Bactérias do gênero *Streptomyces* são favorecidas por solos com pH próximo à neutralidade ou alcalino e bem drenados, ou seja, em condições de aerobiose (MADIGAN et al., 2010). A propriedade mais notável dos estreptomicetos é a produção de antibióticos, evidente em cultivos de placas em meios sólidos, em que colônias de outras bactérias formam zonas de inibição (MADIGAN et al., 2010). Essa propriedade parece ser a responsável pela concomitante diminuição da ocorrência de bactérias oxidantes de Mn na rizosfera das plantas com encarquilhamento foliar.

3.7 CONCLUSÕES

- a) As plantas provenientes das áreas com e sem sintomas de encarquilhamento foliar apresentaram ligeiro desbalanço nutricional, apresentando teores de P, K e S abaixo do nível crítico e teores Ca, Mn, Fe e Zn acima do nível crítico. Esse desbalanço coincidiu com a redução de porte e de produtividade de grãos nas áreas com sintoma de encarquilhamento foliar;
- b) Os teores foliares de Mn, embora considerados altos, ficaram abaixo daqueles apresentados na literatura como tóxicos e foram similares tanto na presença quanto na ausência de encarquilhamento foliar;
- c) Os atributos microbiológicos foram pouco sensíveis em detectar a diferença entre áreas com e sem sintomas exceto a quantificação de bactérias oxidantes e redutoras de Mn no solo rizosférico. Apesar disso, as diferenças foram sutis e não foram relacionadas diretamente à manifestação dos sintomas de encarquilhamento foliar, podendo ser consequência, não a causa.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não foi possível estabelecer a causa do encarquilhamento foliar observado em soja. Entretanto, algumas hipóteses foram descartadas. Os sintomas não estão relacionados com deficiências nutricionais. Por exemplo, os teores de Zn não diferiram entre as plantas com e sem sintoma, as quais apresentaram teores médios de 60 mg kg^{-1} , valor dentro do nível de suficiência para a cultura. Da mesma forma, os teores foliares de B também ficaram na faixa de suficiência, com teores até maiores nas plantas com sintomas. Além disso, a aplicação foliar de B, constatada no campo, não suprimiu o sintoma. Finalmente, apesar de os teores de Mn no solo e na planta serem considerados altos, não houve grande discrepância entre as plantas e solo das áreas com e sem sintomas, indicando que o excesso de Mn sozinho não pode explicar a ocorrência dos sintomas. Em adição, os teores de Mn encontrados nas plantas com encarquilhamento estão muito abaixo dos relatados na literatura como teores tóxicos. Os teores ligeiramente menores de Ca e ligeiramente maiores de P nas áreas com sintomas sugerem que vários fatores combinados podem estar envolvidos na manifestação dos sintomas.

Chama atenção o fato de a proporção entre microrganismos oxidantes e redutores de Mn diferirem na rizosfera das plantas de soja com sintomas, em relação às sem sintomas. A diminuição de bactérias oxidantes de Mn, como observado nas áreas com sintoma, pode resultar em aumento da disponibilidade de Mn às plantas, o que poderia ter causado efeito na fase inicial do desenvolvimento. Esse efeito, entretanto, parece ter sido suprimido mais tarde por ocasião da amostragem, já que os teores nas plantas com e sem sintomas foram similares. Por outro lado, a diminuição pode também ter sido consequência, e não causa da redução do porte das plantas, já que plantas menores apresentam menos exsudação e, conseqüentemente, diminui a quantidade de carbono disponível à comunidade microbiana da rizosfera, incluindo as bactérias oxidantes de Mn.

Como visto, a manifestação dos sintomas de encarquilhamento foliar em plantas de soja parece ser multifatorial, exigindo futuras pesquisas com maior detalhamento e complexidade para tentar elucidar sua causa.

REFERÊNCIAS

- ABDEL LATEF, A.A.H.; CHAOXING, H. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. **Scientia Horticulturae**, v.127, p.228-233, 2011.
- AHMAD, W.; ZIA, M.H.; MALHI, S.S.; NIAZ, A.; SAIFULLAH. Boron deficiency in soils and crops: a review. In: GOYAL, A. ed., **Crop plant**, p.77-114. doi: 10.5772/36702. 2012.
- ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. editors, **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Academic Press, London. 1995. p. 214-219.
- ALIYEV, J.A.; MIRZOYEV, R.S. Photosynthesis and Productivity of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, n.5-6, v. 65, p. 60-70, 2010.
- AMORIM, L.; SALGADO, C. L. Diagnose. In: BERGAMIN, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia, Princípios e Conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica CERES, 1995, v. 3, p. 224-232.
- ANDRADE, S.A.L.; SILVEIRA, A.P.D.; JORGE, R.A.; ABREU, M.F. Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. **International Journal of Phytoremediation**, v.10, p.1-13, 2008.
- ARINES, J.; VILARIÑO, A.; SAINZ, M. Effect of different inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on manganese content and concentration in red clover (*Trifolium pratense* L.) plants. **New Phytologist**, v.112, p. 215-219, 1989.
- ARFAOUI, A.; EL HADRAMI, A.; MABROUK, Y.; SIFI, B.; BOUDABOUS, A.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F.; CHÉRIF, M. Treatment of chickpea with Rhizobium isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.45, p.470-479, 2007.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**, New York: John Wiley, 2003. 4755 p.
- BABUJIA, L.C.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; BROOKES, P.C. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p.2174-2181, 2010.
- BALOTA, E.L.; MACHINESKI, O.; HAMID, K.I.A.; YADA, I.F.U.; BARBOSA, GRAZIELA, M.C.; NAKATANI, A.S.; COYNE, M.S. Soil microbial properties after long-term swine slurry application to conventional and no-tillage systems in Brazil. **Science of the Total Environment**, v.490, p.397-404, 2014.

BAÑADOS, M.P.; IBÁÑEZ, F.; TOSO, A.M. Manganese toxicity induces abnormal shoot growth in 'O'Neal' blueberry. **Acta Horticulturae**, v.810, p.509-512, 2009.

BETHLENFALVAY, G.J.; FRANSON, R.L. Manganese toxicity alleviated by mycorrhizae in soybean. **Journal of Plant Nutrition**, n.8, v.12, p.953-970, 1989.

BEVERIDGE, T.J. 1989. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. **Annual Review of Microbiology**, v.43, p.147-71, 1989.

BINI, D.; LOPEZ, M.V. Transformações microbianas do fósforo. In: NOGUEIRA, E.J.B.C.; ANDREOTE, F.D, **Microbiologia do solo**, 2 ed., Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 149-166.

BONE, J.; BARRACLOUGH, D.; EGGLETON, P.; HEAD, M.; JONES, D.T.; VOULVOULIS, N. Prioritizing soil quality assessment through the screening of sites: the use of publicly collected data. **Land Degradation & Development**, v.25, n.3, p.251-266, 2014.

BOOGERD, F.C.; VRIND, J.P.M. Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.489-494, 1987.

BOOJAR, M.M.A.; GOODARZI, F. Comparative evaluation of oxidative stress status and manganese availability in plants growing on manganese mine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, p.692-699, 2008.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of Nutrients: Micronutrients. In: MARSCHNER, P. **Marchner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. New York, Academic Press. 2012. 651p.

BROMFIELD, S.M.; SKERMAN, V.B.D. Biological oxidation of manganese in soils. **Soil Science**, v.69, p.337-347, 1950.

BROMFIELD, S.M. Bacterial oxidation of manganous ions as affected by organic substrate concentration and composition. **Soil Biology and Biochemistry**, v.6, p.383-392, 1974.

BROMFIELD, S.M. The effect of manganese-oxidizing bacteria and pH on the availability of manganous ions and manganese oxides to oats in nutrient solutions. **Plant and Soil**, v.49, p.23-39, 1978.

BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, v.19, p.269-279, 1995.

BUCHANAN, M.; KING, L.D. Seasonal fluctuations in soil microbial biomass carbon, phosphorus, and activity in no-till and reduced-chemical-input maize agroecosystems. **Biology and Fertility of Soils**, v.13, p.211-217, 1992.

BURNELL, J.N. The biochemistry of manganese in plants. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J.; UREN, N.C. **Manganese in Soils and Plants**. Kluwer Academic Publ. Dordrecht, 1988, p.125-137.

CAMACHO-CRISTÓBAL J.J.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron deficiency decreases plasmalemma H⁺-ATPase expression and nitrate uptake, and promotes ammonium assimilation into asparagine in tobacco roots. **Planta**, p.226, p.443-451, 2007.

CAMACHO-CRISTÓBAL J.J.; REXACH, J.M.; HERRERA-RODRÍGUEZ, B.; NAVARRO-GOCHICOA, M.T.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron deficiency and transcript level changes. **Plant Science**, v.181, p.85-89, 2011.

CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fostato-de-rocha na simbiose soja-*Rhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.9, p.125-130, 1985.

CARDOSO, E.J.B.N. Interaction of mycorrhiza, phosphate and manganese in soybean. In: **Mycorrhizas in integrated systems: from genes to plant development**. (ed) AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Proceedings of the IV European Symposium on Mycorrhizas, Granada, July 1994. Luxemburg, European Commission Report, 1996, p.304-306.

CARDOSO, E.J.B.N.; NOGUEIRA, M.A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**, 2007, p.79-96.

CLARK, R.B. Physiological aspects of calcium and magnesium, and molybdenum deficiencies in plants. In **“Soil Acidity and Liming”** (F. Adams, Ed.), 2nd Ed. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, 1984, p.99-170.

COLOZZI-FILHO, A.; SIQUEIRA, J.O. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. Efeitos de *Gigaspora margarita* e adubação fosfatada no crescimento e nutrição. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.199-205, 1986.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v.4, n.12, décimo segundo levantamento, CONAB, 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: novembro de 2017.

DALL`AGNOL, A.; ROESSING, A.C.; LAZZAROTTO, J.J.; HIRAKURI, M.H.; OLIVEIRA, A.B. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. Londrina: Embrapa Soja, Londrina-PR, 2007. (Embrapa Soja. Circular Técnica 43).

DAVIS, J.G. Soil pH and magnesium effects on manganese toxicity in peanuts. **Journal of Plant Nutrition**, v.19, n.3-4, p.535-550, 1996.

DE SILVA, M.; PURCELL, L.C.; KING, C.A. Soybean petiole ureide response to water deficits and decreased transpiration. **Crop Science**, v.36, p.611-616, 1996.

DICK, R.P. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: PANKHURST, C.E.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R., editors. **Biological indicators of soil health**. New York: CAB International, p.121-156, 1997.

DONCHEVA, S.; POSCHENRIEDER, C.; STOYANOVA, Z.; GEORGIEVA, K.; VELICHKOVA, M.; BARCELO, J. Silicon amelioration of manganese toxicity in Mn-sensitive and Mn-tolerant maize varieties. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, p.189 -197, 2009.

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Org.) **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, p.3-21, 1994.

DOU, C.M.; FU, X.P.; CHEN, X.C.; SHI, J.Y.; CHEN, Y.X. Accumulation and detoxification of manganese in hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **Plant Biology**, v.11, p.664-670, 2009.

DUBININA, G.A. Functional role of bivalent iron and manganese oxidation in *Leptothix pseudochraceae*. **Microbiology USSR**, v.47, p.631-636, 1979a.

DUNWELL, J.M.; CULHAM, A.; CARTER, C.E.; SOSA-AGUIRRE, C.R.; GOODENOUGH, P.W. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. **Trends in Biochemical Sciences**, v.26, p.741-746, 2001.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Levantamento e Classificação de Solos. 1997. 212 p.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Cultivo soja-Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014**. Londrina, Embrapa Soja, 2013. (Sistemas de Produção / Embrapa Soja, ISSN, 2176-2902; n.16).

ELSTNER, E.F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Annual review of plant physiology**, v.33, p.73-96, 1982.

FAGERIA, N.K. Upland rice response to soil acidity in cerrado soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2303-2307, 2000.

FAGERIA, N.K. Effect of liming on upland rice, common bean, corn, and soybean production in cerrado soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.1419-1424, 2001a.

FAGERIA, N.K.; STONE, L.F. Yield of common bean in no-tillage system with application of lime and zinc. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.73-78, 2004.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C. Ameliorating soil acidity of tropical Oxisols by liming for sustainable crop production. **Advances in Agronomy**, v.99, p.345-399, 2008.

FECHT-CHRISTOFFERS, M.M.; FÜHRS, H.; BRAUN, H.P.; HORST W.J. The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance. **Plant Physiology**, v.140, p.1451-1463, 2006.

FECHE-CHRISTOFFERS, M.M.; MAIER, P.; IWASAKI, K.; BRAUN, H.P.; HORST, W.J. The role of the leaf apoplast in manganese toxicity and tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). In: **Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions** (B. Sattelmacher and W. Horst, eds.), 2007, Springer, Dordrecht, Netherlands, p.307-321.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal Molecular Evolution**, v. 17, p. 368-376, 1981.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p.783-791, 1985.

FERREIRA, E. A. B.; RESCK, D. V. S.; GOMES, A. C.; RAMOS, M. L. G. Dinâmica do carbono da biomassa microbiana em cinco épocas do ano em diferentes sistemas de manejo do solo no cerrado. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, p.1625-1635, 2007.

FRANCHINI, J.C.; DEBIASI, H.; BALBINOT JUNIOR, A.A.; TONON, B.C.; FARIAS, J.R. B.; OLIVEIRA, M.C; N.; TORRES, E. Evolution of crop yields in different tillage and cropping systems over two decades in southern Brazil. **Field Crops Research**, v.137, p.178-185, 2012.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.23, p.239-257, 1983.

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.29, p.511-566, 1978.

FOY, C.D. Physiological effects of hydrogen, aluminium, and manganese toxicities in acid soils. In: ADAMS, F. (Ed). **Soil acidity and liming**. 2.ed. American Society of Agronomy, 1984, p.57-97.

FRANCIS, C.A.; TEBO, B.M. Enzymatic manganese(II) oxidation by a marine α -proteobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4024-29, 2001.

FÜHRS, H.; GÖTZE, S.; SPECHT, A.; ERBAN, A.; GALLIEN, S.; HEINTZ, D.; VAN DORSSELAER, A.; KOPKA, J.; BRAUN, H.P.; HORST, W. J. Characterization of leaf apoplastic peroxidases and metabolites in *Vigna unguiculata* in response to toxic manganese supply and silicon. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.1663-1678, 2009.

GHIORSE, W.C. Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.38, p. 515-550, 1984.

GHIORSE, W.C. The biology of manganese transforming microorganisms in soils. In: GRAHAM, R.D.; HANNAHAM, R.J., UREN, N.C (Ed.). **Manganese in soil and plants**. Boston: Kluwer Academic, cap.5, 1988, p.75-85.

GODO, G.H.; REISENAUER, H.M. Plant effects on soil manganese availability. **Soil Science Society of America Journal**, v.45, p.993-995, 1980.

GOLDBACH, H.E.; WIMMER, M. Boron in plants and animals: is there a role beyond cell-wall structure? **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.170, p.39-48, 2007.

GONZÁLEZ, A., LYNCH, J. Subcellular and tissue Mn compartmentation in bean leaves under Mn toxicity stress. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.26, p.811- 822, 1999.

GRAHAM, J.; LEONARD, R.; MENGE, J.A. Membrane mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus-inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Plant Physiology**, v.68, p.648-652, 1981.

GUPTA, U.C. **Boron and its role in crop production**. CRC press, 1993.

HANNAM, R.J.; DAVIES, W.J.; GRAHAM, R.D.; RIGGS, J.L. The effect of soil- and foliar-applied manganese in preventing the onset of manganese deficiency in *Lupinus angustifolius*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.35, p.529-538, 1984.

HARTMAN, G.L.; WEST, E.D.; HERMAN, T.K. Crops that feed the world 2. Soybean - worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v.3, p.5-17, 2011.

HARGER, N. **Faixas de suficiência para teores foliares de nutrientes em soja, definidas pelo uso do método DRIS, para solos de origem basáltica**. Universidade Estadual de Londrina, 2008, 88p. (Tese de Doutorado).

HAYATSU, M.; HIRANO, M.; NAGATA, T. Involvement of two plasmids in the degradation of carbaryl by *Arthrobacter* sp. strain RC100. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1015-1019, 1999.

HEENAN, D.P.; CARTER, O.G. Influence of temperature on the expression of manganese toxicity by two soybean varieties. **Plant Soil**, v.47, p.219-227, 1977.

HEENAN, D.P.; CAMPBELL, L.C. Growth, yield components and seed composition of two soybean cultivars as affected by manganese supply. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.31, p.471-476, 1980.

HEENAN, D.P.; CAMPBELL, L.C. Soybean nitrate reductase activity influenced by Mn nutrition. **Plant Cell Physiology**, v.21, p.731-736, 1980.

HEDGES, S. B. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap p-value in phylogenetic studies. **Molecular Biology and Evolution**, v.9, p.366-369, 1992.

HEINTZE, J.G. Manganese phosphate reactions in aqueous systems and the effects of application of monocalcium phosphate on the availability of manganese to oats in alkaline fan soil. **Plant and Soil**, v.24, p.407-423, 1968.

HELMER, W.H. Association between Mn-reducing root bacteria and NaCl application in suppression of *Fusarium* crown and root rot of asparagus. **Phytopathology**, v.85, n.12, p.1461-1467, 1995.

HELENE, L.C.F. **Diversidade entre estirpes do gênero *Bradyrhizobium* avaliada por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e Análise Polifásica**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015. 74f.

HORIGUCHI, T. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants. II. Deposition of oxidized manganese in plant tissues. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.33, p.595-606, 1987.

HORST, W.J. The physiology of manganese toxicity. In: GRAHAM, R.D.; HANNAHAM, R.J.; UREN, N.C. (Ed.) **Manganese in soil and plants**. Boston: Kluwer Academic cap.12, 1988, p.175-188.

HUBER, D.M.; GRAHAM, R.D. Techniques for studying nutrient-disease interactions. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**, p. 204-214, 1992.

HUBER, D.M.; McCAY-BUIS, T.S. A multiple component analysis of the take-all disease of cereals. **Plant Disease**, v.77, p.434-447, 1993.

HULLO, M.F.; MOSZER, I.; DANCHIN, A.; MARTIN- VERSTRAETE, I. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5426-30, 2001.

ISLAM, K.R.; WEIL, R.R. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. Agriculture, **Ecosystems and Environment**, v.79, v.1, p.9-16, 2000.

JAKELAITIS, A.; SILVA, A.A.; SANTOS, J.B.; VIVIAN, R. Qualidade da camada superficial de solo sob mata, pastagens e áreas cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.38, p.118-127, 2008.

KANG, B. T.; FOX, R. L. A methodology for evaluating the manganese tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata*) and some preliminary results of field trials. **Field Crops Research**, v.3, p.199-210, 1980.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p.1-13, 2010.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Quantifying effects of different agricultural land uses on soil microbial biomass and activity in Brazilian biomes: inferences to improve soil quality. **Plant Soil**, v.338, p.467-481, 2011.

- KATERJI, N.; VAN HOORN, J.W.; HAMDY, A.; MASTRORILLI, M. Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods. **Agricultural Water Management**, v.62, p.37-66, 2003.
- KAUSS, H. Fluorometric measurement of callose and other 1,3- β -Glucans. In: LINKENS, H.F.; JACKSON, J.F (Ed.) **Modern methods of plant analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1989, p.127-137.
- KANAUCHI, M.; MILET, J.; BAMFORTH, C. W. Oxalate and oxalate in malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v.115, p.232-237, 2009.
- KHABAZ-SABERI, H.; RENGEL, Z.; WILSON, R.; SETTER, T. Variation for tolerance to high concentration of ferrous iron (Fe^{2+}) in Australian hexaploid wheat. **Euphytica**, v.172, p.275-283, 2010.
- KLUTHCOUSKI, J; NELSON, L.E. Variations in the manganese concentrations in soybean trifoliates. Communication. **Soil Science and Plant Analysis**, v. 10, p.1299-1310, 1979.
- KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Direct and indirect effects of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on acquisition of mineral nutrients by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. **New Phytologist**, v.116, p.637-645, 1990.
- KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Effect of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentrations in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.117, p.649-655, 1991.
- KREMER, R.J.; MEANS, N.E. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. **European Journal of Agronomy**, v.31, p.153-161, 2009.
- LAMBAIS, M.R.; RÍOS-RUIZ, W.F.; ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.160, p.421-428, 2003.
- BOT, J.; KIRKBY, E.A.; VAN BEUSICHEM, M. L. Manganese toxicity in tomato plants: effects on cation uptake and distribution. **Journal of Plant Nutrition**, v.13, p.513-525, 1990.
- LIDON, F.C.; BARREIRO, M.G.; RAMALHO, J.C. Manganese accumulation in rice: implication for photosynthetic functioning. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1235-1244, 2004.
- LIU, A.; MA, B.L.; BOMKE, A.A. Effects of cover crops on soil aggregate stability, total organic carbon, and polysaccharides. **Soil Science Society of America Journal**, v.69, p.2041-48, 2005.

- LIU, K. Food use of whole soybeans. In: JOHNSON, L.; WHITE, P.J.; GALLOWAY, R. (Eds.), **Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization**. Urbana, IL: AOCS Press, 2008, p. 441-482.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; DUNLAP, P.; CLARK, D. **Microbiologia de Brock**. 12ª edição, editora Artmed. Porto Alegre. 2010.
- MALAVOLTA, Eurípedes. **ABC da adubação**. Ceres, 1979.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Princípios, métodos e técnicas de avaliação do estado nutricional. In: MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. (Eds.) **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba, POTAFOS. 1997, p.115-230.
- MALAVOLTA, E. **Manual de Nutrição Mineral de Plantas**. Piracicaba: Ceres, 2006. 631p.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic Press, 1995. 889p.
- MARSCHNER, P.; ASCHER, J.S.; GRAHAM, R.D. Effect of manganese-reducing rhizosphere bacteria on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici and on manganese uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.12, p.33-38, 1991.
- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and soil**, v.159, n.1, p.89-102, 1994.
- MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. New York, Academic Press. 2012. 651p.
- MASCANI, H.J. JR.; COX, F.R. Effective rates of fertilization for correcting manganese deficiency in soybeans. **Agronomy Journal**, v.77, p.363-366, 1985.
- MCGEE, P.A. Alterations of growth of *Solanum opacum* and *Plantago drumondii* and inhibition of regrowth of hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi from dried root pieces by manganese. **Plant and Soil**, v.101, p.227-233, 1987.
- MEDEIROS, C.A.B.; CLARK, R.B.; ELLIS, J.R. Effects of excess manganese on mineral uptake in mycorrhizal sorghum. **Journal of Plant Nutrition**, v.18, p.201-217, 1995.
- MENTEN, J.O.M.; MALAVOLTA, E.; SABINO, J.C.; VEIGA, A.A.; TULMANN NETO, A. Virus-like abnormality in the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) induced by manganese toxicity. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.179-185, 1981.
- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. **Soil biology and biochemistry**, v.18, n.2, p.185-190, 1986a.

- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.18, p.191-196, 1986b.
- MIN, Y.; TIE, B.Q.; TANG, M.Z.; AOYAMA, I. Accumulation and uptake of manganese in a hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **Minerals Engineering**, v.20, p.188-190, 2007.
- MONCADA, M.P.; GABRIELS, D.; CORNELIS, W.; LOBO, D. Comparing aggregate stability tests for soil physical quality indicators. **Land Degradation & Development**, v.26, n.8, p.843-852, 2015
- MORA, M.L.; ROSAS, A.; RIBERA, A.; RENGEL, Z. Differential tolerance to Mn toxicity in perennial ryegrass genotypes: involvement of antioxidative enzymes and root exudation of carboxylates. **Plant Soil**, v.320, p.79-89, 2009.
- MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E.; HEINRICHS, R.; TANAKA, R.T. Influência do magnésio na absorção de manganês e zinco por raízes destacadas de soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.38, n.1, p.95-101, 2003.
- MOREIRA, S.G.; PROCHNOW, L.I.; KIEHL, J.C.; NETO, L.M.; PAULETTI, V. Formas químicas, disponibilidade de manganês e produtividade de soja em solos sob semeadura direta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.121-136, 2006.
- MUKHOPADHYAY, M.J., SHARMA, A. Manganese in cell metabolism of higher plants. **Botanical Review**, v.57, p.117-149, 1991.
- MUNNS, D.N.; JACOBSON, L.; JOHNSON, C.M. Uptake and distribution of manganese in oat plants II. A kinetic model. **Plant Soil**, v.19, p.193-204, 1963.
- NASCIMENTO, A.A.C.; ESPREAFICO, E.M.; LARSON, M.L.P.; MONESI, N.; ROSSI, N.M.M.; RODRIGUES, V. **Tecnologia do DNA recombinante**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 1999. 85 p.
- NAKATANI, A.S.; MARTINES, A.M.; NOGUEIRA, M.A.; FAGOTTI, D.S.L.; OLIVEIRA, A.G.; BINI, D.; SOUSA, J.P.; CARDOSO, E.J.B.N. Changes in the genetic structure of Bacteria and microbial activity in an agricultural soil amended with tannery sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, v.43, p.106-114, 2011.
- NAKATANI, A.S., FERNANDES, M.F., de SOUZA, R.A., da SILVA, A.P., dos REIS, F.B., MENDES, I.C., HUNGRIA, M. Effects of the glyphosate-resistance gene and of herbicides applied to the soybean crop on soil microbial biomass and enzymes. **Field Crops Research**, v.162, p.20-29, 2014.
- NAVARRO, R.B. **Níveis de manganês na germinação de esporos e estabelecimento de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em soja (*Glycine max* L. (Merril))**. 1989. 94 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

NOGUEIRA, A.V. As micorrizas e o excesso de metais. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.) **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras/DCS e DCF, 1996. p.135-174.

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Colonização radicular e produção de micélio externo por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.329-338, 2000.

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Interações microbianas na disponibilidade e absorção de manganês por soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1605-1612, 2002.

NOGUEIRA, M.A.; MAGALHÃES, G.C.; CARDOSO, E.J.B.N. Manganese toxicity in mycorrhizal and phosphorus-fertilized soybean plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, p.141-156, 2004.

NOGUEIRA, M.A.; NEHLS, U.; HAMPP, R.; PORALLA, K.; CARDOSO, E.J.B.N. Mycorrhiza and soil bacteria influence extractable iron and manganese in soil and uptake by soybean. **Plant Soil**, v.298, p.273-284, 2007.

OKAZAKI, M.; SUGITA, T.; SHIMIZU, M.; OHODE, Y.; IWAMOTO, K.; de VRIND-de J., de VRIND, J.P.M.; CORSTJENS, P.L.A.M. Partial purification and characterization of manganese oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4793-4799, 1997.

OLIVEIRA, F.A.; CARMELLO, Q.A.; MASCARENHAS, H.A.A. Disponibilidade de potássio e suas relações com cálcio e magnésio em soja cultivada em casa de vegetação. **Scientia agrícola**, v.58, n.2, p.329-335, 2001.

OLLIVIER, J.; TOWE, S.; BANNERT, A.; HAI, B.; KASTL, E.M.; MEYER, A.; SU, M.X.; KLEINEIDAM, K.; SCHLOTTER, M. Nitrogen turnover in soil and global change. **FEMS Microbiology Ecology**, v.78, p.3-16, 2011.

PAGE, E.R.; DAINTY, J. Manganese uptake by excised oat roots. **Journal of Experimental Botany**, v.15, p.428-443, 1963.

PANTHEE, D. Varietal improvement in soybean. In: SINGH, G. (Ed.), **The soybean**. 2010. p. 92-112.

PARALES, R.E.; DITTY, J.L.; HARWOOD, C.S. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4098-4104, 2000.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil Microbiology and biochemistry**. San Diego, CA, USA: Academic press, 2. ed, 1996, p.340

PAULITZ, T.C.; LINDERMAN, R.G. Interactions between fluorescent *pseudomonas* and VA mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 113, p. 37-45, 1989.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S., Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v.55, p.158-161, 1970.

POSTA, K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal maize. **Mycorrhiza**, v.5, p.119-124, 1994.

PURCELL, L.C.; SERRAJ, R.; DE SILVA, M.; SINCLAIR, T.R.; BONA, S. Ureide concentration in field-grown soybean in response to drought and the relationship to nitrogen fixation. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, p.949-966, 1998.

PURCELL, L.C.; KING, C.A.; BALL, R.A. Soybean cultivar differences in ureides and the relationship to drought tolerant nitrogen fixation and manganese nutrition. **Crop Science**, v. 40, p. 1062-1070, 2000.

RENGEL, Z. Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. **Plant and Soil**, v.196, p.255-260, 1997.

RICHARDSON, L.L.; AGUILAR, C.; NEALSON, K.H. Manganese oxidation in pH and O₂ microenvironments produced by phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v.33, p.352-63, 1988.

RIDGE, E.H.; ROVIRA, A.D. Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and non-sterile conditions. **New Phytologist**, v.70, p.1017-1026, 1971.

RODICIO, M.R.; MENDOZA, M.C. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, v. 22, n. 4, p. 238-245, 2004.

RUFTY JR., T.W.; MINER, W. S.; RAPER JR., C. D. Temperature effects on growth and manganese tolerance in tobacco. **Agronomy Journal**, v.71, p.638-644, 1979.

SAMPLE, E.C.; SOPER, R.J.; RACZ, G.J. Reactions of phosphate fertilizer in soils. In: KHASAWNEH, F.E.; SAMPLE, E.C.; KAMPRATH, E.J. (Ed.). **The role of phosphorus in agriculture**. Soil Science Society of America, 1980. p.263-310.

SANTOS, C. A.; PANCHONI, L. C.; BINI, D.; KUWANO, B. H.; CARMO, K. B.; SILVA, S. M. C. P.; MARTINES, A. M.; ANDRADE, G.; ANDRADE, D. S.; CARDOSO, E. J. B. N.; ZANGARO, W.; NOGUEIRA, M. A. Land Application of Municipal Landfill Leachate: Fate of Ions and Ammonia Volatilization. **Journal of Environmental Quality**, v.42, p.1-9, 2013.

SARKAR, D.; PANDEY, S.K.; SUD, K.C.; CHANEMOUGASOUNDHARAM, A. In vitro characterization of manganese toxicity in relation to phosphorus nutrition in potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Science**, v.167, p.977-986, 2004.

- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56 p.
- SCHROTH, M.N.; HILDEBRAND, D.C.; PANOPOULOS, N. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads. **Prokaryotes**, v.6, p.714-740, 2006.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. Nitrogen fixation insensitivity to drought in soybean cultivar "Jackson". **Crop Science**, v.36, p.961-968, 1996.
- SERRAJ, R., VADEZ, V.; DENISON, R.F.; SINCLAIR, T.R. Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. **Plant Physiology**, v.119, p.289-296, 1999b.
- SFREDO, G.J.; BORKERT, C.M.; OLIVEIRA, M.C.N. de; WOBETO, C.; ALMEIDA, J. Determinação da relação ótima entre Ca, Mg e K para a cultura da soja em solos do Paraná: estudo a campo. In: EMBRAPA SOJA. **Resultados de pesquisa de soja 1991/92**. Londrina, 1999b. v. 1, p. 327-355. (Embrapa Soja. Documentos, 138).
- SILVA, A.P.; BABUJIA, L.C.; FRANCHINI, J.C.; SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M. Microbial biomass under various soil- and crop-management systems in short and long-term experiments in Brazil. **Field Crops Research**, v.119, p.20-26, 2010.
- SHENG, M.; TANG, M.; CHEN, H.; YANG, B.; ZHANG, F.; HUANG, Y. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. **Mycorrhiza**, v.18, p.287-296, 2008.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina, Embrapa Soja, 3ª ed. 100p. 2014. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n. 269).
- SOUZA, R.A.; BABUJIA, L.C.; SILVA, A.P.; GUIMARAES, M.F.; Arias, C.A.; HUNGRIA, M. Impact of the ahas transgene and of herbicides associated with the soybean crop on soil microbial communities. **Transgenic Research**, v.22, p.877-892, 2013.
- SPACCINI, R.; MBAGWU, J.S.C.; IGWE, A.; CONTE, P.; PICCOLO, A. Carbohydrates and aggregation in lowland soils of Nigeria as influenced by organic inputs. **Soil & Tillage Research**, v.75, p.161-72, 2004.
- SPARROW, L.A.; UREN, N.C. Oxidation and reduction of Mn in acidic soils: effect of temperature and soil pH. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.143-148, 1987.
- TABATABAI, MA. Enzymes. In: WEAVER, R.W.; AUGLE, S.; BOTTOMLY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A.; editors. **Methods of soil analysis**. Part 2. Microbial and biochemical properties. Madison WI: Soil Science Society of America, 1994. p.775-833.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p. 512-526, 1993.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p. 2731-2739, 2011.

TEBO, B.M.; BARGAR, J.R.; CLEMENT, B.G.; DICK, G.J.; MURRAY, K.J.; PARKER, D.; VERITY, R.; WEBB, S.M. Biogenic manganese oxides: Properties and Mechanisms of Formation. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v.32, p.287-328, 2004.

TISDALE, S.L.; NELSON, W.L.; BEATON, J.D. **Soil fertility and fertilizers**. 4.ed. New York: Macmillan, 1985. 754p.

USA. United States Department of Agriculture-USDA. **Production, Supply, and Distribution (PS&D)**. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/related-data-statistics/>. Acesso em março de 2017.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.703-707, 1987.

VAN DER PUTTEN, W.H. Aboveground-belowground interactions, and species' range shifts. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.43, p.365-383, 2012.

VILLALOBOS, M.; TONER, B.; BARGAR, J.; SPOSITO, G. Characterization of the manganese oxide produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.67, n.14, p.2649-2662, 2003

VISSER, S.; PARKINSON, D. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganism. **American Journal of Alternative Agriculture**, v.7, n. 1, p.33-37, 1992.

VODNIK, D.; GRÈMANA, H.; MAÈEKA, I.; van ELTERENB, J.T.; KOVAÈEVIÈC, M. The contribution of glomalin related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. **Science of the Total Environment**, v.392, p.130-136, 2008.

VOLTOLINI, G.B.; CASTANHEIRA, D.T.; GUIMARÃES, R.J.; ALCÂNTARA, E.N.D.; REZENDE, T.T.; PAULINO, R.N.L.; CARNEIRO, A.H C. Sintomas de fitotoxidez causados pela deriva do herbicida glyphosate em mudas de cafeeiro. In: IX SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2015, Curitiba - PR.

WALTON, G.H. The effect of manganese on seed yield and the split seed disorder of sweet and bitter phenotypes of *Lupinus angustifolius* and *L. cosentinii*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.29, p.1177-1189, 1978.

WANG, J.J. Kinetics of manganese uptake by excised roots of sensitive and tolerant tobacco genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, v.26, p.1439-1450, 2003.

WARINGTON, K. The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. **Annals of Botany**, v.37, p.629-672, 1923.

WERNER, A.K.; SPARKES, I.A.; ROMEIS, T.; WITTE, C.P. Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. **Plant Physiology**, v.146, p.418-430, 2008.

WINKLER, R.G.; POLACCO, J.C.; BLEVINS, D.G.; RANDALL, D.D. Enzymatic degradation of allantoate in developing soybeans. **Plant Physiology**, v.79, p.878-793, 1985.

WILHELM, D.M.; GRAHAM, R.D. ROVIRA, A.D. Control of Mn status and infection rate by genotype of both host and pathogen in the wheat take-all interaction. **Plant and Soil**, v.123, p.267-275, 1990.

XUE, S.G.; CHEN, Y.X.; REEVES, R.D.; BAKER, A.J.M.; LIN, Q.; FERNANDO, D.R. Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). **Environmental Pollution**, v.131, p.393-399, 2004.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.20, n.3, p.391-411, 2003.

ZOBIOLE, L.H.S.; OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; HUBER, D.M.; CONSTANTIN, J.; CASTRO, C.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA JUNIOR, A. Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. **Plant Soil**, v.328, p.57-69, 2010.