

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIO NATIVO EM SOLO CULTIVADO COM LEGUMINOSAS NA ENTRELINHA DO CAFEIEIRO

SCHERER, A.¹; ANDRADE, D.S.²; COLOZZI-FILHO, A.³ e MATOS, M.A.³

Trabalho financiado pelo CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ-CBP&D/Café-

¹ Aluna de Graduação da UEL, Bolsista da FUNAPE/CBP&D-Café, Caixa Postal 481, CEP 86001-970, Londrina, PR, <alesharon@bol.com.br>; ² Pesquisadora do Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, Londrina, PR; ³ Pesquisador do IAPAR, Londrina, PR; ³ Pesquisadora do IAPAR, Londrina, PR.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de rizóbio nodulando *Phaseolus*, isoladas de solo de lavouras de cafeeiro cultivado com leguminosas na entrelinha. As amostras de solo para os isolamentos e o experimento de eficiência simbiótica foram coletadas dos seguintes tratamentos: testemunha, *Leucaena leucocephala*, *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, *Mucuna pruriens*, *Mucuna deeringiana*, *Arachis hypogaea* e *Vigna unguiculata*. Avaliações utilizando feijoeiro cultivado em solução nutritiva completa sem N e estéril mostraram que a nodulação, a matéria seca e o N total da parte aérea foram superiores em plantas inoculadas com estirpes provenientes de solo cultivado com caupi (M281, M282). A eficiência simbiótica em feijoeiro das populações nativas de rizóbio foi avaliada utilizando-se amostras de solo do experimento de campo em vasos de 3 kg de capacidade e quatro repetições. O teor de carbono no solo foi significativamente maior no solo cultivado com leguminosas, e esse efeito foi mais evidente no caso do cultivo da *L. leucocephala*. A população de rizóbio nativo nodulando feijoeiro no solo utilizado para o ensaio de casa de vegetação variou de 10 a 100.000 células por g de solo, de acordo com o histórico da área de coleta do solo. Observou-se que a nodulação e a matéria seca da parte aérea foram alteradas. O cultivo de leguminosas na entrelinha do cafeeiro estimulou de forma diferenciada o tamanho e a eficiência da população nativa de rizóbio do solo e, portanto, o fornecimento de nitrogênio para o sistema.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., fixação biológica de nitrogênio; *Rhizobium*; *Phaseolus vulgaris* L.

SYMBIOTIC N₂ FIXATION OF INDIGENOUS RHIZOBIAL POPULATION AS A FUNCTION OF LEGUME COVER CROPS BETWEEN ROWS OF COFFEE PLANTS

ABSTRACT: The objectives of this study were to evaluate the efficiency and the relative abundance of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations in soils samples collected from a field experiment, which was

set up in a Latosol red soil in the North of the state of Paraná, Brazil with eight different coffee crops management situations: (i) control (without legume cover crops; (ii) *Leucaena leucocephala*, (iii) *Crotalaria spectabilis*; (iv) *C. breviflora*; (v) *Mucuna pruriens*; (vi) *Mucuna deeringiana*; (vii) *Arachis hypogaea*; (viii) *Vigna unguiculata*. Strains from soil cultivated with *Vigna unguiculata* showed higher symbiotic efficient in common bean plants growing in nutritive solution. The organic carbon contents were higher in the soil cultivated with legumes mainly with *Leucaena leucocephala*. The number of Rhizobium trapped by *Phaseolus vulgaris* estimated by MPN technique ranged from 10 to 100,000 cells per g of soil according to cropping history. A significant increase of *Rhizobium* populations was observed in the soil covered by *L. leucocephala* during 8 years. The cultivation of legumes as cover crops between rows of coffee plants had an important effect as improving both abundance and efficiency of indigenous *Phaseolus*-nodulating rhizobial population in the soil.

Key words: legume, *coffea arabica* L., *Phaseolus vulgaris* L., biological nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO

O cultivo de leguminosas de verão, como cobertura de solo, resulta em vários benefícios para o agrossistema, como proteção contra a erosão provocada pelo escoamento superficial de água da chuva, diminuição do crescimento de ervas daninhas e incorporação de matéria orgânica, contribuindo para a melhoria da fertilidade natural dos solos. Estudos com o cultivo de leguminosas de verão na entrelinha do cafeeiro, com objetivo de cobertura do solo e adubação verde, têm sido relatados como alternativa de manejo para o cafeeiro em solos degradados (Chaves et al., 1997). Além dos benefícios da fixação do nitrogênio nos grãos ou na forragem, qualquer nitrogênio adicionado ao solo pode ser usado pela cultura subsequente ou acompanhante (Giller & Wilson, 1993). Os benefícios da utilização de leguminosas como cobertura verde de inverno na produção da cultura do milho foram atribuídos à fixação de nitrogênio (Calegari, 1991; Ebelhar et al., 1984).

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas de grão que sempre teve destaque na agricultura brasileira, por ser importante fonte de proteína para a população brasileira. O feijoeiro pode se beneficiar da associação simbiótica com bactérias genericamente denominadas rizóbio, através do processo de fixação biológica do N₂ (FBN). Este pode ser nodulado efetivamente com pelo menos cinco espécies de rizóbio já descritas: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984), *R. tropici* tipo IIa e IIb (Martinez-Romero et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger et

al., 1997). Quando a associação simbiótica rizóbio-leguminosa é estabelecida com sucesso, poderá resultar em nitrogênio suficiente para o crescimento da cultura e, conseqüentemente, menor dependência dos fertilizantes nitrogenados. A alternância entre cultivos de leguminosas e não-leguminosas ou seu consórcio, pode ser uma boa alternativa para o restabelecimento da biodiversidade em solos degradados pela utilização intensiva. Portanto, o objetivo deste trabalho foi relacionar a eficiência simbiótica do rizóbio, capaz de formar nódulos em feijoeiro, com o cultivo de leguminosas na entrelinha do cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Descrição da área de coleta do solo para isolamento das estirpes de rizóbio e o experimento de casa de vegetação de avaliação da eficiência simbiótica das populações nativas:

As amostras de solo foram coletadas de um experimento de cafeeiro (cultivar Catuaí) cultivado com leguminosas de verão, intercalando as linhas de plantio, no município de Prado Ferreira-PR. O experimento foi instalado em blocos ao acaso, com quatro repetições, e vem sendo conduzido há mais de oito anos. Os tratamentos utilizados foram: leucena (*Leucaena leucocephala*), crotalária spectabilis (*Crotalaria spectabilis*), crotalária breviflora (*C. breviflora*), mucuna-cinzenta (*Mucuna pruriens*), mucuna-anã (*Mucuna deeringiana*), amendoim-cavalo (*Arachis hypogaea*), caupi (*Vigna unguiculata*) e testemunha, que corresponde ao solo sem o cultivo de leguminosa.

2. Eficiência simbiótica das estirpes: Avaliaram-se algumas das estirpes de rizóbio obtidas dos nódulos de feijoeiro inoculado com o solo coletado no experimento de cafeeiro descrito no item 2.1. Suspensões de células destas estirpes foram inoculadas em sementes de feijão (cultivar IAPAR-81) plantado em frascos de vidro contendo solução nutritiva esterilizada para avaliação da eficiência simbiótica do rizóbio. Após 36 dias foram avaliadas a matéria seca da parte aérea e a nodulação (matéria seca, número e coloração interna dos nódulos).

3. Experimento de solo em casa de vegetação: Foi retirado o solo da profundidade de 0 a 20 cm, a partir de três pontos nas linhas da parcela. Nas mesmas amostras de solo destinadas ao experimento de vaso da eficiência simbiótica da população de rizóbio, foram realizadas as seguintes determinações: Al, H, H+Al, pH, C, P, K, Ca, Mg, Na e N total, pelo método da rotina (Pavan et al., 1992). Para a determinação dos teores de fósforo e potássio utilizou-se o extrator de Mehlich; para cálcio e magnésio, o KCL M; e o pH utilizando CaCl_2 0.01 M. Antes do plantio do feijoeiro, a população de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro

foi avaliada pelo método do número mais provável (NMP), através da técnica de inoculação de suspensões diluídas de solo em plantas, como descrito em Andrade & Hamakawa (1994). O plantio de feijoeiro (cultivar IAPAR-81) foi realizado sem a aplicação de nenhum adubo ou corretivo, em vasos de plástico contendo 3 kg de solo para cada tratamento com quatro repetições. Avaliaram-se a nodulação (número, massa seca e coloração interna dos nódulos), a massa seca e o nitrogênio total na parte aérea da planta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Eficiência simbiótica das estirpes: Observou-se variação na eficiência simbiótica das estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de raízes de feijoeiro inoculadas com suspensões de solos provenientes do experimento de campo com as leguminosas. Observou-se efeito positivo na produção de matéria seca da parte aérea do feijoeiro devido à inoculação das estirpes M281 e M282 (isoladas de solo cultivado com caupi) e Mb80 isolada de solo cultivado com mucuna-anã (Figura 1).

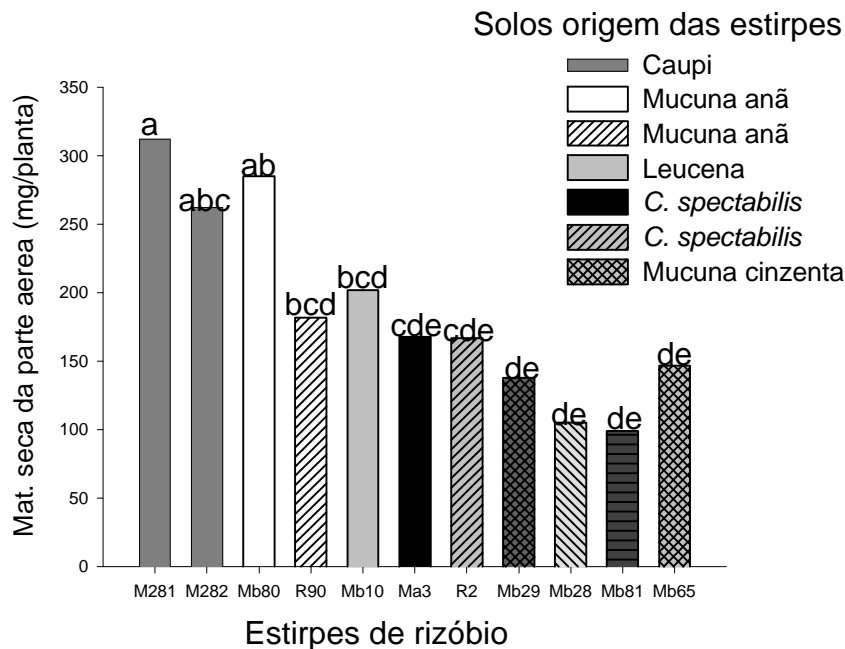


Figura 1 - Matéria seca da parte aérea do feijoeiro (cultivar IAPAR 81) em solução nutritiva completa sem N e inoculado com estirpes de rizóbio isoladas de solo coletado de lavoura de cafeeiro cultivado com leguminosas de verão nas entrelinhas. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas a 5% pelo teste de Duncan.

A massa seca de nódulos maior foi obtida com a inoculação com as estirpes isoladas de feijoeiro crescendo em solos provenientes das parcelas cultivadas com caupi e crotalária *spectabilis* (Tabela 1). A coloração interna dos nódulos é uma avaliação preliminar da eficiência simbiótica da estirpe de rizóbio,

uma vez que os nódulos brancos não são eficientes e os nódulos com coloração vermelha ou rosa são considerados ativos.

Tabela 1 - Nodulação, massa, número e coloração interna dos nódulos, do feijoeiro inoculado com estirpes de rizóbio isoladas de solo cultivado com leguminosas na entrelinha do cafeeiro

| Ident. Estirpes | Solos de origem das estirpes | Nódulos | | |
|--------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------|
| | | ------(mg)----- | ------(Nº)----- | *(coloração interna) |
| Mb 28 | C. spectabilis | 32 d | 7 c | Branco |
| Mb 81 | Mucuna-anã | 32 d | 19 abc | Rosa |
| R 90 | Mucuna-anã | 45 d | 25 abc | Rosa |
| Mb80 | Mucuna-anã | 47 d | 32 ab | Rosa |
| R 2 | C.spectabilis | 52 cd | 6 a b | Branco |
| Mb 10 | Leucena | 67 bcd | 42 a | Rosa |
| Mb 29 | C.spectabilis | 69 bcd | 16 bc | Marrom |
| Mb 65 | Mucuna-cinzenta | 72 bcd | 36 ab | Branco |
| Ma 3 | C. spectabilis | 108 abc | 19 abc | Branco |
| M282 | Caupi | 118 abc | 18 abc | Rosa |
| M281 | Caupi | 139 a | 25 abc | Rosa |
| CV (%) | | 8,72 | 19,22 | |

Médias seguidas da mesma letra, dentro da coluna, não apresentam diferenças significativas a 5% pelo teste de Duncan.*Avaliação para a maioria dos nódulos.

Considerando o número de estirpes avaliadas neste experimento, torna-se difícil concluir sobre o efeito das leguminosas na eficiência simbiótica. No entanto, pela análise de DNA de fungos micorrízicos, isolados de solo da região do arenito paranaense, foi constatado que o cafeeiro e a *Crotalaria breviflora* estimularam populações diferentes de fungos micorrízicos no solo rizosférico (Colozzi-Filho, 1999). Nestes sistemas de cultivo foi sugerido por Colozzi-Filho (1999) que variações nas características químicas e físicas após o cultivo das leguminosas influenciam a comunidade microbiana do solo.

2. Experimento de solo em casa de vegetação

O cultivo de leguminosas na entrelinha do cafeeiro estimulou de forma diferenciada o crescimento da população nativa de rizóbio do solo capaz de formar nódulos no feijoeiro. A população nativa de rizóbio nativo nodulando feijoeiro, no solo utilizado para o ensaio de casa de vegetação, variou de 10 a 100.000 células por g de solo, e esta variação foi em função do histórico de cultivo da área de coleta do solo (dados não apresentados). Entre as leguminosas, a leucena estimulou maior população de rizóbio (10^5 células por g de solo), enquanto no tratamento testemunha sem cultivo de leguminosas observou-se população menor no solo. Estirpes de rizóbio pertencente à espécie *R. tropici* IIB também podem formar nódulos na leucena, o que explicaria o maior estímulo à população nativa por esta leguminosa.

A análise química do solo utilizado no experimento de eficiência da população nativa de rizóbio

(Tabela 2). O teor de carbono no solo foi significativamente maior no solo cultivado com leguminosas, e esse efeito foi mais evidente no caso do cultivo da leucena. Condições mais favoráveis à comunidade biológica no solo, incluindo os fixadores de nitrogênio, são encontradas nos sistemas de manejo do solo e das culturas, os quais deixam maior quantidade de resíduos à superfície. No norte do Paraná, em cafeeiros fertilizados apenas com adubação verde, produções de até 78% daquelas obtidas em cafeeiros conduzidos com adubações químicas tradicionais têm sido obtidas (Chaves, 2000).

Tabela 2 - Características químicas das amostras de solo retiradas nas entrelinhas do cafeeiro cultivado com leguminosas de verão antes do plantio do feijoeiro

| Tratamento | P | C | pH | H+Al | Ca | Mg | K | *S | *T | *V |
|-----------------------|----------------------|---------------------|-----|------|------|------|------|---|------|-------|
| | -mg dm ⁻³ | -g.dm ⁻³ | | | | | | -----Cmoc.dm ⁻³ de solo----- | | |
| | | | | | | | | | | --%-- |
| Leucena | 4,2 | 10,64 | 5,6 | 2,73 | 2,66 | 1,48 | 0,27 | 4,41 | 7,14 | 61,76 |
| Crotalária | 4,5 | 7,38 | 5,8 | 2,35 | 2,07 | 1,12 | 0,18 | 3,37 | 5,72 | 58,91 |
| Crotalária breviflora | 5,9 | 7,18 | 6,1 | 2,03 | 2,45 | 1,36 | 0,18 | 3,99 | 6,02 | 66,27 |
| Mucuna-cinzenta | 7,2 | 8,77 | 5,1 | 3,17 | 2,42 | 1,20 | 0,18 | 3,80 | 6,97 | 54,51 |
| Mucuna-anã | 7,6 | 8,40 | 5,2 | 2,94 | 2,04 | 1,08 | 0,20 | 3,3 | 6,26 | 53,03 |
| Amendoim-cavalo | 5,5 | 7,38 | 5,6 | 2,54 | 2,10 | 1,24 | 0,18 | 3,52 | 6,06 | 58,08 |
| Caupi | 5,6 | 7,22 | 5,4 | 2,73 | 2,13 | 1,12 | 0,25 | 3,50 | 6,23 | 56,17 |
| Controle | 5,5 | 6,81 | 5,8 | 2,35 | 2,25 | 1,28 | 0,18 | 3,71 | 6,06 | 61,22 |

*S= soma de bases; P-K= extrator de Mehlich; *T= capacidade de troca de cátions; Ca e Mg= KCL 1 M; * V= saturação por bases; pH= CaCl 2 0,01 M.

Estudos sobre os efeitos do histórico de cultivo sobre o tamanho da população de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro têm mostrado respostas à planta hospedeira e ao manejo do solo (Andrade et al., 2001; Hungria et al., 1997; Kucey e Hynes, 1989). Algumas espécies de rizóbio podem sobreviver no solo como parte da população microbiana saprofítica, enquanto outras não são detectadas, a não ser que suas plantas hospedeiras estejam presentes.

CONCLUSÕES

- Estirpes de rizóbio provenientes de solo cultivado com caupi foram mais eficientes na fixação biológica do N₂ em feijoeiro.
- O cultivo de leguminosas na entrelinha do cafeeiro alterou a população de rizóbio no solo, sendo a *L. leucocephala* a que apresentou maior estímulo à população de rizóbio no solo com capacidade de nodular o feijoeiro.
- O cultivo intercalar de leguminosas em lavouras de cafeeiro poderá resultar em incrementos de nitrogênio para o sistema solo-planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARGER, N.; MACHERET, V.; AND LAGUERRE, G., 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. International Journal for Systematic Bacteriology, v.47, p.996-1006.
- ANDRADE, D.S., (1999). Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in acid soils from Brazil. PhD thesis, University of London, Wye, Ashford.
- ANDRADE, D.S., HAMAKAWA, P.J., 1994. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculantes por infecção em planta. In: (Eds.), Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola. EMBRAPA-SPI, Brasília, pp.63-94.
- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J., GILLER, K.E., 2001. Enumeration of indigenous rhizobia in an acid soil after liming and cropping with common bean, rice, wheat/soybean and maize. Soil Biology and Biochemistry. (no prelo).
- CALEGARI, A., 1991. Effects of winter cover crops on corn yield in Paraná, Brazil. In: (W. L. Hargrove, ed.), Cover crops for clean water. Soil and Water Conservation Society, Jackson, Tennessee, pp.97-98.
- CHAVES, J.C.D.; PAVAN, M.A.; CALEGARI, A., 1997. Input of dry matter and nutrients to the soil from cover plants cultivated between rows of perennial crops and their effects on soil reaction. Arquivos de Biologia e Tecnologia, v.40, p.47-55.
- CHAVES, J.C.D. 2000. Efeito de adubações mineral, orgânica e verde sobre a fertilidade do solo, nutrição e produção do cafeeiro. In: I Simpósio de pesquisa do Café do Brasil. Poços de Caldas, MG, 2000. Resumo.
- COLOZZI-FILHO, A. (1999). Dinâmica populacional de fungos micorrízicos arbusculares no agrossistema cafeeiro e adubação verde com leguminosas. Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.
- EBELHAR, S.A.; FRYE, W.W.; BLEVINS, R.L., 1984. Nitrogen from legume cover crops for no-till corn. Agronomy Journal, v.76, p.51-55.
- GILLER, K.E.; WILSON, K.F., 1993. Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems. CAB International, Wallingford, 313 pp.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L., 1997. Interactions among soil microorganisms and bean and maize grown in monoculture or intercropped. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.32, p.807- 818.
- JORDAN, D.C.; 1984. Family III. *Rhizobiaceae*. In: (Eds.), Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Co., Baltimore, MD, pp.234-256.

- KUCEY, R.M.N.; HYNES, M.F.; 1989. Populations of *Rhizobium leguminosarum* biovars *phaseoli* and *viciae* in fields after bean or pea in rotation with nonlegumes. *Canadian Journal of Microbiology*, v.35, p.661-667.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A., 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.41, p.417-426.
- PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F.M.; ZEMPULSKI, H.C.; MYAZAWA, M.; ZOCOLER, D.C., 1992. Manual de Análise Química de Solo e Controle de Qualidade. Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR, Londrina, Pr, 40pp.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, P.W.; MARTINEZ-ROMERO, E., 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarm* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.43, p.374-377.