

**Impacto de sistemas de agricultura intensiva sobre a diversidade de rizóbios de guandú.** Heitor L.C. Coutinho<sup>1</sup>, Carla M. Soares<sup>1</sup>, Jefferson L.C. Mineiro<sup>1</sup>, Alessandra F. Novelli<sup>1</sup>, Luciana M. de Hollanda<sup>2</sup>. <sup>1</sup>CNPMA - EMBRAPA, Rod. SP-340, Jaguariúna-SP; <sup>2</sup>Fundação Tropical P.T. André Tosello, R. Latino Coelho 1301, Campinas-SP. (heitor@bdt.org.br)

Palavras-chave: rizóbio, diversidade microbiana, impacto ambiental, guandú

## Introdução

A atividade agrícola nos ecossistemas tropicais resulta, via de regra, em alterações quantitativas e/ou qualitativas da biodiversidade. Uma das causas destas alterações vem a ser a transição de terra nativa, normalmente com muitas espécies de plantas e animais em equilíbrio ecológico, para terra agrícola, onde predominam menos espécies e em desequilíbrio. Muito provavelmente estas alterações se refletem na biologia dos solos, já que a perda de espécies vegetais resulta em alterações no pool de substratos orgânicos para inúmeras espécies de microrganismos, que podem ser extintas ou sofrer adaptações genéticas para sobreviver nas novas condições ambientais. Estas alterações na diversidade microbiana do solo podem ser bastante acentuadas em sistemas agrícolas baseados no uso intensivo de pesticidas, principalmente inseticidas de solo (nematicidas) e fungicidas. O impacto de diferentes práticas agrícolas na diversidade microbiana do solo, particularmente nas comunidades de microrganismos envolvidos em processos vitais para a agricultura, como a fixação de nitrogênio, é desconhecido. Também não sabemos se estes possíveis impactos são deletérios para a manutenção do potencial produtivo dos solos. Nós partimos da hipótese que práticas de menor impacto na biodiversidade resultarão em maior sustentabilidade para a agricultura.

Bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, e *Azorhizobium*, coletivamente denominados de rizóbios, são capazes de infectar pelos radiculares de espécies de leguminosas que as abrigam em estruturas especiais chamadas nódulos. Esta associação planta - bactéria é tida como simbiótica, uma vez que o nitrogênio fixado pelos microrganismos é assimilado pelas plantas, enquanto estas fornecem esqueletos de carbono para o simbiote. Esta simbiose pode ser altamente específica, de parte de ambos os simbiosites. Todavia, vários estudos mostram que a diversidade dos rizóbios suplanta a das leguminosas. A diversidade de rizóbios que nodulam feijão é tão grande que nos últimos 4 anos a espécie (*R. phaseoli*) foi desmembrada em três (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli*, e *R. tropici*) (Martinez-Romero, 1994). No Brasil, a caracterização de rizóbios isolados de nódulos de feijão cultivados em campos de Goiás e Bahia indica uma grande diversidade, com possíveis novas espécies a serem descritas no futuro próximo (Avílio A. Franco, info. pessoal). Rizóbios isolados de guandú (*Cajanus cajan*) também apresentam grande diversidade, incluindo até mais de um gênero (*Rhizobium* e *Bradyrhizobium*) (Lombardi, 1995).

Várias espécies novas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium* vêm sendo descritas nos últimos anos, refletindo o número crescente de grupos de pesquisa envolvidos em estudos da diversidade de rizóbios, o avanço tecnológico que permite a detecção de características discriminantes entre as espécies, e, mais importante, a grande diversidade

destes microrganismos. A maior parte das novas espécies de rizóbios foi isolada de regiões tropicais, realçando a importância dos trópicos com relação à biodiversidade. Se considerarmos os sistemas de agricultura sustentável como pré-requisito para a melhoria de qualidade de vida médio e longo prazos nos países tropicais, e a importância da fixação biológica de nitrogênio para a sustentabilidade dos agroecossistemas, percebe-se a grande relevância e importância do entendimento dos impactos que diferentes tecnologias agrícolas venham a causar à diversidade dos rizóbios no solo.

O potencial de exploração da fixação biológica de nitrogênio em sistemas de agricultura sustentável envolve o uso de leguminosas com diversas finalidades. Sistemas agroflorestais consorciam leguminosas arbóreas para fornecimento de lenha, forragem e sombreamento com culturas anuais como o milho e sorgo. Leguminosas arbóreas também podem ser usadas como barreira ao vento e como cerca viva com grande eficiência e baixo custo. Em sistemas de rotação de culturas, já amplamente difundidos no Brasil, gramíneas como milho, trigo ou cana-de-açúcar são sucedidas por leguminosas como soja, feijão ou amendoim para fertilizar o solo com o nitrogênio fixado além de gerar renda com a comercialização dos grãos. Leguminosas também podem ser usadas como adubo verde, onde o nitrogênio fixado e translocado para as folhas retorna aos solos através da decomposição dos restos vegetais e mineralização do N-orgânico. As espécies mais utilizadas para adubação verde no Brasil são o guandú, crotalária (*Crotalaria juncea*) e a mucuna (*Mucuna mucunoides*).

Este trabalho mostra as alterações ocorridas na diversidade de rizóbios de guandú em solos sob agricultura intensiva de uma área experimental na região de Guaíra, SP. A área total foi cultivada com feijão em abril de 1995 e soja no verão de 1995/1996. O preparo do solo foi o convencional em algumas parcelas e, em outras, foi utilizado o plantio direto. Algumas parcelas foram também tratadas com o nematicida Miral (isazofós; Ciba-Geigy) no plantio do feijão (1995). Com a retirada deste produto do mercado no segundo semestre do ano passado, este tratamento não foi repetido no plantio da soja. Aplicações de herbicidas, outros pesticidas, adubação e calagem foram as normalmente efetuadas pelos produtores da região, incluindo a inoculação da soja com inoculantes comercializados em Guaíra.

## **Metodologia**

Amostras compostas de solo foram coletadas de cada parcela em estudo (plantio direto, plantio convencional, com nematicida, sem nematicida) na época do início da floração da soja e transportadas em gelo para o CNPMA. Foi também incluído uma amostra de solo de uma área sob *Brachiaria* sp., considerada como controle no tempo zero de ocupação. No prazo máximo de uma semana após a coleta os solos, armazenados a 4°C, foram diluídos nas seguintes proporções ( $10^{-1}$ ,  $4^{-1}$ ,  $4^{-2}$ ,  $4^{-3}$ , ...,  $4^{-9}$ ), segundo a metodologia de Somasegaran e Hoben (1985) para estimativa de número-mais-provável (NMP) de rizóbios. As diluições de solo foram inoculadas (2 ml), em triplicata, em sementes de guandú esterilizadas superficialmente, e plantadas em vasos do tipo Leonard. Após trinta dias, foi feita a observação e registro das plantas noduladas. Os nódulos foram preservados em tubos com sílica-gel e algodão até o momento de isolamento.

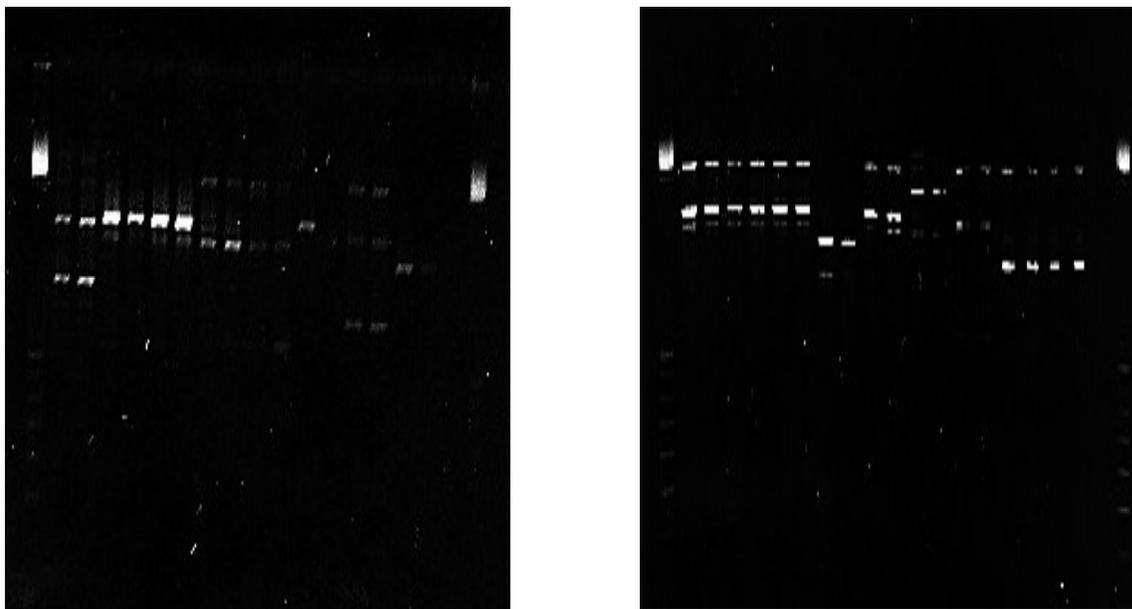
Os rizóbios isolados foram então caracterizados pela técnica molecular RAPD, baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers únicos e arbitrários (Coutinho *et al.*,

1993). Os padrões de bandas gerados são consideradas “impressões digitais” de cada isolado (Figura 1).

### Resultados e Conclusão

Na amostra de solo tomada como controle foi encontrada uma população de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células por grama de solo seco. Apesar de terem sido isolados apenas rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*, os primeiros resultados de RAPD demonstram uma alta diversidade entre eles (Figura 1).

Figura 1. Resultados parciais de RAPD para 17 isolados de *Bradyrhizobium* sp. purificados a partir de nódulos de *Cajanus cajan* cultivados em vasos de Leonard e inoculados com diluições de solos sob um stand de *Brachiaria* sp., em Guaira, SP. Os “fingerprints” estão dispostos em pares de replicatas.



Este estudo será continuado no decorrer dos anos de 1996 e 1997 para o monitoramento da diversidade dos rizóbios ao longo do tempo. Está também previsto para o futuro o plantio de guandú nas parcelas estudadas com a verificação das estirpes nodulantes e estimativa da fixação de nitrogênio nas diferentes parcelas, correlacionando os dados obtidos com a diversidade dos rizóbios.

O primer utilizado foi adequado já que produziu padrões com poucas bandas, simplificando o agrupamento dos isolados e a comparação entre géis, o que auxiliará na avaliação comparativa com os isolados obtidos a partir das amostras de solos das parcelas experimentais.

## **Referências Bibliográficas**

Coutinho, H.L.C. *et al.* (1993). *Letters of Applied Microbiology* 17:282-284.

Lombardi, M.L.C.O. (1995). *Diversidade de Rizóbios Nativos de Solo do Estado de São Paulo*. Tese de Doutorado. ESALQ-USP. Piracicaba. 164 pp.

Martinez-Romero (1994). *Plant and Soil* 161:11-20.

Somasegaran, P. e Hoben, H.J. (1985). *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. NifTAL e MIRCEN. Hawaii. 367 pp.