

Revista de Agricultura

DIRETOR RESPONSÁVEL

Prof. Dr. S. de Toledo Piza Júnior

DIRETOR

Prof. Dr. F. Pimentel Gomes

SECRETÁRIO

Prof. Dr. Luiz Gonzaga E. Lordello

SUMÁRIO

S. de Toledo Piza Jr. - Uma fácil lição de etimologia (só para biólogos)	1
Errata	2
<u>Valdinei Tadeu Paulino, Juan Antonio Ocampo & Eulógio José Bedmar - Interação <i>Rhizobium</i> - micorriza vesículo-arbuscular na fixação de nitrogênio em leguminosas forrageiras tropicais cultivadas em meio inerte</u>	3
O içá	16
<u>Valdinei Tadeu Paulino, Maria Josefa Fernandes Sanchez, Joaquim Carlos Werner & Marcos Antonio Zanini Gonçalves - Efeito alelopático do <i>Eucalyptus</i> no desenvolvimento de forrageiras</u>	17
A vez das forrageiras	36
<u>Anário Jaehn & L. Mesquita Filho - Condução do número de troncos e brotos por cova de café adulto atingido por severa geada e recepado</u>	37
<u>Anário Jaehn & J.B. Matiello - Condução de número de brotos por tronco em cafezal renovado, atingido por fortes geadas e recepado</u>	51

INTERAÇÃO *Rhizobium*-MICORRIZA VESÍCULO-ARBUSCULAR NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS CULTIVADAS EM MEIO INERTE

Valdinei Tadeu Paulino ¹
Júan Antonio Ocampo ²
Eulógio José Bedmar ²

INTRODUÇÃO

Têm sido demonstrados, entre as leguminosas forrageiras tropicais, os efeitos benéficos das micorrizas vesículo-arbusculares, aumentando a nodulação, crescimento e conteúdos de fósforo, em relação às plantas não micorrizadas (CRUSH, 1974; CABALLA-ROSANO & WILD, 1982; HUANG et alii, 1985).

É importante assinalar que o fornecimento de nitrogênio à planta pode, ainda que os resultados obtidos sejam variáveis, ser incrementado pelas micorrizas (SMITH, 1980). O efeito parece ser indireto devido a uma melhor nutrição fosfatada das plantas micorrizadas.

Assim sendo, o papel da simbiose tripla *Rhizobium* - MVA - leguminosa não somente melhora a nutrição em N e P, mas também possibilita que as plantas sejam favorecidas das interações N-P (MUNNS & MOSSE, 1980).

Deve-se ter em conta que a aplicação excessiva de fertilizantes provoca uma diminuição da infecção MVA e nodulação (CHAMBERS et alii, 1980a,b). De maneira similar, a aplicação de fertilizantes fosfatados reduz a infecção micorrizica em algumas leguminosas (ASIMI et alii, 1980; POWELL, 1980). Entretanto, a ação nociva do P parece atuar através de sua concentração na planta (SANDERS, 1975); portanto, é possível pensar que a aplicação de P tenha um efeito diferente segundo o tipo de planta utilizada.

¹ Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP, bolsista do CNPq.

² Estación Experimental del Zaidín, Granada, Espanha.

O uso de fertilizantes nitrogenados precisa ser rigorosamente calculado, tal que, por excesso, não suprima a nodulação e infecção MVA.

Por outro lado, as medidas de infecção micorrízica vesículo-arbusculares desenvolvidas pela técnica de PHYLIPS & HAYMAN (1970) nem sempre se correlacionam com os efeitos sobre o crescimento das plantas (ABBOT & ROBSON, 1978; TINKER, 1978), não dão uma medida da ação de diversos fatores inibidores da micorrização (OCAMPO & BAREA, 1985). Por isso, é conveniente utilizar outras técnicas, tais como a tingção de succinato desidrogênase (MacDONALD & LEWIS, 1979), com objetivo de determinar o possível efeito inibidor dos fertilizantes químicos.

São muito escassas as informações entre as interações fertilizantes nitrogenados, fósforo e inoculação *Rhizobium*-MVA, em leguminosas tropicais. O propósito do presente trabalho foi examinar os efeitos das interações *Rhizobium*-MVA-leguminosa em presença ou não de fertilizantes nitrogenados ou fosfatados.

MATERIAL E MÉTODOS

As leguminosas forrageiras estudadas foram soja pereire (*Glycine wightii* Verd.) e galactia (*Galactia striata* Jacq.), cultivadas em casa-de-vegetação em vasos de 500 gramas contendo uma mistura de vermiculita:areia (1/1, volume/volume) esterilizada. A temperatura foi controlada, com ciclos diurnos e noturnos de 25/18°C e umidade relativa de 70-80%.

Semanalmente foram adicionados 20 ml por vaso de solução nutritiva de RIGAUD & PUPPO (1975), sem N e sem P.

As leguminosas foram inoculadas com uma suspensão de *Rhizobium* sp. do grupo cowpea SMS 022, selecionada junto à Seção de Agronomia de Plantas Forrageiras, em Nova Odessa (SP). A micorriza empregada foi o *Glomus fasciculatum*, o inóculo com solo da rizosfera, contendo esporos, micélio e fragmentos de raízes infectadas, à base de 5 g de inóculo adicionado por vaso.

Os tratamentos estudados foram os seguintes:

1. *Rhizobium* sp. + fósforo (P₁) - RP₁

2. Nitrogênio + fósforo (P_1) - NP₁
3. Nitrogênio + fósforo (P_2) - NP₂
4. *Rhizobium* sp. + Micorriza + fósforo (P_2) - RMP₂
5. Micorriza + fósforo (P_2) - MP₂
6. *Rhizobium* + fósforo (P_1) + Micorriza - RMP₁

O fósforo foi adicionado como KH_2PO_4 à base de 20 ml por semana, num total de 35 ppm de fósforo (P_1) ou como NaH_2PO_4 , à base de 50 ml por semana de uma solução com 26 mg/l, totalizando 5 ppm de fósforo (P_2). O nitrogênio como KNO_3 3 mM, utilizando 20 ml desta solução por semana.

O experimento foi colhido com 8 semanas, avaliando-se o peso seco da parte aérea e das raízes, nodulação (número por vaso), a atividade da nitrogênase, em termos de redução de acetileno (ARA). As raízes foram divididas em duas porções para determinar:

1. a porcentagem de longitude de raízes infectadas;
2. a porcentagem do micélio VA que possuía atividade de succinato desidrogênase (SDH).

A infecção micorrízica foi determinada tingindo-se as raízes pela técnica de PHILLIPS & HAYMAN (1970) e avaliando a porcentagem de infecção pelo método da placa quadriculada (GIOVANNETTI & MÖSSE, 1980).

A atividade SDH (E.C. 3, 99,1) no micélio fúngico foi detectada mediante a redução de sais de tetrazólico, em função do succinato adicionado às amostras de raiz (MacDONALD, 1980) e a porcentagem de micélio VA com atividade SDH foi quantificada mediante observação ao microscópio (OCAMPO & BAREA, 1982).

Determinou-se, também, os conteúdos de N, P nas raízes e na parte aérea.

RESULTADOS

Como pode ser observado no quadro I, a aplicação de doses elevadas de fósforo (P_1) não afetou a porcentagem de micorrização nem a atividade SDH do fungo em soja perene. No caso da galactia, ao contrário, houve uma diminuição da micorrização quando se incrementaram as doses de P aplicadas. A atividade metabólica do fungo di-

QUADRO I - Infecção micorrizica VA das raízes de soja perene e galactia, médias de 5 repetições.

Tratamentos	Soja perene		Galactia	
	Longitude de raízes infectadas (%)	Micélio VA com atividade de SDH (%)	Longitude de raízes infectadas (%)	Micélio VA com atividade de SDH (%)
RMP2	59 ± 9	32 ± 6	61 ± 8	21 ± 7
MP2	43 ± 8	7 ± 2	29 ± 11	8 ± 4
RMP1	70 ± 12	42 ± 9	35 ± 4	13 ± 2

São dados os valores das médias mais o erro padrão da média; para terminologia dos tratamentos ver material e métodos.

minuiu, quando se aplicou nitrogênio ao meio, tanto em soja como em galactia.

Como mostra o quadro II, a aplicação de P (P_1 e P_2) diminuiu a efetividade da simbiose dupla, sendo inferiores ao tratamento em que se aplicaram *Rhizobium* com P_1 , reduzindo, também a atividade da nitrogênase e o número de nódulos da soja perene. Entretanto, o tratamento $R+P_1$ foi significativamente inferior ao $N+P_1$. O tratamento MP_2 foi inferior aos demais. Por outro lado, no quadro III observa-se que a aplicação de P na dose elevada (P_1) diminuiu a efetividade da simbiose dupla, assim como o número de nódulos e a atividade nitrogênase dos mesmos. Porém, a aplicação de doses inferiores de P (P_2) favoreceu a efetividade da simbiose dupla, sendo igual ao tratamento $R+P_1$, apesar de que neste tratamento foi aplicada maior quantidade de fósforo. O tratamento $N+P$ foi superior ao tratamento $R+P_1$, também em galactia. O tratamento MP_2 foi inferior aos demais.

Os conteúdos de fósforo (quadro IV) foram menores nos tratamentos em que intervêm ambos microrganismos no caso da soja perene, sendo inferiores ao tratamento em que se aplica *Rhizobium* com uma dose elevada de fósforo (tratamento $R+P_1$). Isso não ocorreu no caso da galactia, em que o tratamento RMP_2 mostrou tendência de ser igual ao $R+P_1$. O tratamento em que se aplicou a micorriza, sem aplicação de N, observou-se uma apreciável incorporação deste elemento.

DISCUSSÃO

A demanda de fósforo é distinta para cada espécie de planta, sendo o excesso de P presente nos tecidos vegetais que parece determinar a capacidade de infecção das raízes (SANDERS, 1975). Assim, nas condições deste experimento, observou-se que mesmo a dose mais elevada de fósforo aplicada ao meio (tratamento P_1) diminuiu a micorrização no caso da galactia mas não no caso da soja perene (quadro I). No caso da soja perene, tendo maior necessidade de fósforo que a adicionada ao meio, estabeleceu-se uma competição entre os microrganismos simbiotes e a planta, sendo maior no caso da simbiose du-

QUADRO II - Peso seco (parte aérea e raízes), nodulação e atividade da nitrogênase (μ cromoles de acetileno reduzido/planta/minuto) da soja perene.

Tratamentos	Peso seco (g/vaso)		Nodulação		ARA μ mol/pl/min.
	Parte aérea	Raízes	Número/vaso		
RP 1	0,23 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	38 \pm 10		48 \pm 15
RMP 1	0,14 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02	23 \pm 12		28 \pm 14
RMP 2	0,16 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	26 \pm 5		11 \pm 2
NP 1	0,34 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02			
NP 2	0,23 \pm 0,03	0,10 \pm 0,06			
MP 2	0,05 \pm 0,005	0,02 \pm 0,01			

São dados os valores das médias mais o erro padrão da média; para terminologia dos tratamentos, ver material e métodos.

QUADRO III . Peso seco (parte aérea e raízes), nodulação e atividade de nitrogênase (ARA em micromoles de acetileno reduzido por planta por minuto) da *galactia*.

Tratamentos	Peso seco (g/vaso)		Nodulação		ARA μmol/pl/min.
	Parte aérea	Raízes	·Número/vaso		
RP1	0,6 ± 0,02	0,1 ± 0,03	63 ± 14		27 ± 11
RMP1	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,03	38 ± 4		15 ± 4
RMP2	0,18 ± 0,03	0,1 ± 0,04	45 ± 12		43 ± 12
NP1	0,21 ± 0,04	0,1 ± 0,02			
NP2	0,21 ± 0,04	0,1 ± 0,02			
MP2	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,02			

São dados os valores das médias mais o erro padrão; para terminologia dos tratamentos ver material e métodos.

QUADRO IV - Conteúdos de nitrogênio e fósforo (parte aérea e raiz) de soja perene e galactia nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Soja perene						Galactia									
	Parte aérea			Raízes			Parte aérea			Raízes						
	%N	%P	%N	%P	%N	%P	%N	%P	%N	%P	%N	%P				
RP 1	1,01	0,18	1,35	0,22	2,50	0,25	1,90	0,23	1,29	0,13	1,73	0,16	2,72	0,19	2,21	0,23
RMP 1	1,17	0,12	1,07	0,13	2,16	0,21	1,86	0,26	1,45	0,31	1,40	0,23	4,50	0,25	2,97	0,23
RMP 2	1,38	0,22	1,63	0,18	2,15	0,17	1,64	0,26	1,18	0,21	1,51	0,19	1,72	0,17	1,86	0,25
NP 1																
NP 2																
MP 2																

Para terminologia dos tratamentos ver material e métodos.

pla, como consequência do consumo de carboidratos que se produz entre esta última não pode ser compensado (KRECEY & PAUL, 1981) e dá lugar a uma diminuição do crescimento das plantas micorrizadas (BETTALLENFALWAY *et alii*, 1982). Entretanto, no caso da galactia, a necessidade de fósforo foi menor, e portanto a aplicação de doses altas dá lugar a uma diminuição da infecção e efetividade da mesma, traduzindo-se num efeito menor sobre o crescimento das plantas.

As quantidades de fósforo que receberam as plantas de galactia são suficientes como para que *Rhizobium* forneça a quantidade de N₂ necessário às mesmas. Sendo semelhante o efeito sobre o crescimento pela simbiose dupla (tratamento em que se aplicou menor quantidade de fósforo) e a adição de ambos fertilizantes químicos. Indicando que, tal como ocorre em outras plantas, nas leguminosas forrageiras tropicais a ação dos fungos VA sobre a fixação de N₂ por *Rhizobium* parece ser indireta, quer dizer devido a uma melhora no suprimento fosfatado (HARLEY & SMITH, 1983). Entretanto, não se pode descartar a hipótese de uma captação de nitrogênio por parte das micorrizas, já que as plantas cultivadas na ausência de nitrogênio no meio sobreviveram, ainda que a atividade metabólica da micorriza diminuiu consideravelmente. De fato está sendo detectada a presença de enzimas relacionados com a captação de nitrogênio, nas hifas fúngicas (SMITH *et alii*, 1985).

Para concluir, sabe-se que a aplicação de fertilizantes químicos (nitrogênio e fósforo) afetam de forma negativa a infecção VA, quando se aplicam de forma pesada (HAYMAN, 1983), entretanto devem ser consideradas características do solo e também as inerentes à fisiologia de cada planta.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) pela bolsa de estudos que nos permitiu a condução do presente trabalho.

RESUMO

Foram estudados, em casa-de-vegetação, os efeitos das interações entre *Rhizobium*-MVA-leguminosa em presença ou não de fertilizações nitrogenada e fosfatada. As leguminosas forrageiras soja perene (*Glycine wightii*) e galactia (*Galactia striata*) foram cultivadas em meio inerte, mistura de vermiculita e areia esterilizada. Os tratamentos estudados foram dois níveis de fósforo solúvel (5 e 35 ppm), com e sem inoculação com *Glomus fasciculatum*, inoculação com *Rhizobium* sp. do grupo Cowpea ou fertilização nitrogenada. Os parâmetros avaliados foram peso seco da parte aérea e das raízes, conteúdos de N e P, número de nódulos, atividade da nitrogênase. Determinou-se também a porcentagem de raízes infectadas e a porcentagem do micélio VA com atividade succinato desidrogênase (SDH). Para a soja perene a aplicação de P na dose mais elevada (30 ppm) não afetou a porcentagem de micorrização e nem a atividade SDH do fungo. Entretanto, para a galactia houve uma diminuição da micorrização quando se elevaram as doses de P aplicadas. A atividade metabólica do fungo diminuiu quando se aplicou nitrogênio ao meio, tanto em soja perene como em galactia. A demanda de fósforo foi distinta para as duas leguminosas, sendo que o excesso de P presente nos tecidos parece determinar a capacidade de infecção das raízes. A soja perene mostrou maior necessidade de fósforo que a galactia. Na galactia observou-se o efeito da simbiose dupla sobre o crescimento, na menor dose de P, indicando que a ação do fungo MVA sobre a fixação de N₂ por *Rhizobium* parece ser indireta através de uma melhora no aporte fosforado.

SUMMARY

THE EFFECTS OF THE INTERACTION *Rhizobium*-VAM FUNGUS ON NITROGEN FIXATION BY FORAGE LEGUMES GROWING IN INERT MEDIUM

The effects of the interaction *Rhizobium* - VAM on legumes in presence or absence of N and P fertilizations were studied. Two forage legumes, perennial soy-

bean (*Glycine wightii*) and galactia (*Galactia striata*), were grown in inert medium, composed of a vermiculite and sterilized sand. The treatments tested were two levels of soluble phosphorus (5 and 35 ppm), with or without *Glomus fasciculatum* with *Rhizobium* sp. of cowpea group inoculation or nitrogen fertilization. The variables evaluated were dry matter (shoots and roots), N and P contents, nodule number and nitrogenase activity. The root infection (%) and the percentage of VA micellium with succinate dehydrogenase activity (SDH), were also determined. In perennial soybean, the P application in the highest level (35 ppm) neither affected the percentage of mycorrhization VA nor the fungus SDH activity. However, in galactia there was a reduction of the mycorrhization as P fertilization increased. The fungus metabolic activity decreased when nitrogen fertilization was used, both in perennial soybean and galactia. The phosphorus requirement was different for the two legumes. Also the infective capacity of the roots by the fungus VAM seems to be decreased by increasing the P contents in the herbage. Soybean showed higher phosphorus requirement than galactia. In galactia it was observed the effect of double symbiosis on the growth, in the presence of the lowest level of P, indicating that the fungus VAM action upon the *Rhizobium*-N₂ fixation seems to be indirect, improving the P absorption.

LITERATURA CITADA

- ABBOTT, L.K. & A.A. ROBSON, 1978. Growth of subterranean clover in relation to the formation of endomycorrhizas by introduced and indigenous fungi in field soil. *New Phytol.* 81: 575-585.
- ASIMI, S., V. GIANINAZZI-PEARSON & S. GIANINAZZI, 1980. Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium* in soybeans. *Can. J. Bot.* 58: 2200-2205.
- BETTALLENFALWAY, G.J., R.S. PACOVSKYM & M.S. BROWN, 1982. Parasitic and mutualistic fungi and soybean: development of the endophyte. *Phytopathology* 72(7): 894-897.

- CABALLA-ROSAND, P. & A. WILD, 1982. Direct use of low grade phosphate rock from Brazil as fertilizer. II Effects of mycorrhizal inoculation and nitrogen source. **Pl. Soil** 65: 363-373.
- CHAMBERS, C.A., S.E. SMITH & F.A. SMITH, 1980. Effects of ammonium and nitrate ions on mycorrhizal infection, nodulation and growth of *Trifolium subterraneum*. **New Phytol.** 85: 47-62.
- CHAMBERS, C.A., S.E. SMITH, F.A. SMITH, M.D. RAMSEY & D. J. NICHOLAS, 1980. Symbiosis of *Trifolium subterraneum* with mycorrhizal fungi and *Rhizobium trifolii* as affected by ammonium inhibitors. **Soil Biol. Biochem.** 12: 93-100.
- CRUSH, J.R., 1974. Plant growth responses to vesicular mycorrhiza. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. **New Phytol.** 73: 743-752.
- GIOVANNETTI, M. & B. MOSSE, 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytol.** 84: 489-500.
- HAYMAN, D.S., 1983. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. **Canadian J. Bot.** 61(3): 944-963.
- HUANG, S.R., W.K. SMITH & R.S. YOST, 1985. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth, water relations and leaf orientation in *Leucaena leucocephala* (LAM) de Wit. **New Phytol.** 99: 229-243.
- KRECEY, R.M.N. & E.A. PAUL, 1982. Carbon flow, photosynthesis, and fixation of N_2 in mycorrhizal and nodulated fava beans (*Vicia faba* L.). **Soil Biol. Biochem.** 14: 407-412.
- MacDONALD, R.M., 1980. Cytochemical demonstration of catabolism in soil micro-organisms. **Soil Biol. Biochem.** 12: 419-423.
- MacDONALD, R.M. & M. LEWIS, 1979. The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **New Phytol.** 80: 135-141.
- MUNNS, D.N. & B. MOSSE, 1980. In "Advances in Legume Science", R.J. Summerfield & A.H. Bunting, eds., pp. 115-125, H.M. Stationary Office, London.
- OCAMPO, J.A. & J.M. BAREA, 1982. Depressed metabolic activity of VA mycorrhizal fungi by photosynthesis inhibitor herbicides. In *Les Mycorrhizas: Biologie et Utilization* (Ed. by INRA), p.267-270.

- OCAMPO, J.A. & J.M. BAREA, 1985. Effect of carbamate herbicide on VA mycorrhizal infection and plant growth. **Pl. Soil** 85: 375-383.
- PHILLIPS, J.M. & D. HAYMAN, 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 55: 158-161.
- POWELL, C.L., 1980. Effect of phosphate fertilizers on the production of mycorrhizal inoculation in soil. **N.Z.J. Agric. Res.** 23: 219-230.
- RIGAUD, J. & A. PUPPO, 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacterioids. **J. Gen. Microbiol.** 88: 213-228.
- SANDERS, F.E., B. MOSSE & P.B. TINKER, 1975. Endomycorrhizal inoculation in soil. **N.Z.J. Agric. Res.** 23: 219-223.
- SMITH, S.E., 1980. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. **Biol. Res.** 55: 475-510.
- SMITH, S.E., R.J.S.T. JOHN, F.A. SMITH & D. NICHOLAS, 1985. Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L. Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. **New Phytol.** 99: 211-217.
- TINKER, P.B., 1978. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth. **Phy-siol. Veg.** 16: 743-751.