

Isolamento e caracterização de estirpes de Rizóbio para Leguminosas Arbóreas

Karen Nogueira Chinoca; Maria A. Eva Cancian; Rita de Cássia Frenedo

Introdução

A exploração das florestas em face da demanda por espécies de alto valor comercial, bem como o processo de agricultura intensiva em decorrência do crescente aumento populacional, intensificaram o impacto da ação humana sobre os ecossistemas naturais mundiais. As conseqüências da ação humana sobre os ecossistemas resultam na perda da fertilidade do solo, erosão, desertificação e em mudanças climáticas, bem como na perda de recursos biológicos de valor inestimável. Muitos pesquisadores têm ressaltado a importância das leguminosas arbóreas fixadoras de nitrogênio em sistemas agroflorestais, silviculturais ou na recuperação de áreas erodidas (Franco et al., 1991). Quando as leguminosas se associam com bactérias específicas do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, desenvolvendo uma simbiose eficiente, podem obter grande parte das suas necessidades de nitrogênio através da fixação biológica e ainda, influenciar a produtividade dos solos deficientes, incorporando grandes quantidades de nitrogênio atmosférico no sistema solo-planta (Moreira, 1994). Esses atributos contribuem para o desenvolvimento de outras espécies vegetais, garantindo a auto-sustentabilidade do ecossistema com relação ao nitrogênio. Algumas características altamente desejáveis em estirpes de rizóbio indicadas para a inoculação de leguminosas arbóreas são a eficiência simbiótica, capacidade de sobrevivência no solo e habilidade competitiva para colonizar as raízes da planta hospedeira, promovendo uma nodulação abundante (Franco et al., 1991). Intensifica-se então, a demanda para a seleção de estirpes de rizóbio nativas do solo mais eficientes e competitivas e sua preservação em coleção.

Objetivo

O objetivo dessa parte do trabalho foi isolar, caracterizar e agrupar as estirpes de rizóbio, para posteriormente serem testadas quanto à eficiência nas suas leguminosas hospedeiras, visando a obtenção de estirpes promissoras na fixação biológica do nitrogênio.

Materiais e métodos

O trabalho está sendo desenvolvido na APA - Parque do Carmo, situado no Bairro de Itaquera, zona leste da cidade de São Paulo-SP. Através de visitas periódicas a APA, foi feito levantamento, coleta e identificação das leguminosas arbóreas, as quais serão depositadas em herbário. O material bacteriológico utilizado para o isolamento das estirpes foi o meio de cultura "79" sólido (Fred & Waksman, 1928). A coleta dos nódulos foi realizada com a utilização de uma pá de jardineiro; nesta ocasião cavou-se as regiões das proximidades até uma distância de 40 cm do tronco a profundidades de 10 a 20 cm. Após a coleta dos nódulos, os mesmos foram levados ao laboratório, lavados e desinfestados seguindo os procedimentos descritos por Vincent (1970). Os nódulos desinfestados foram cortados longitudinalmente com o auxílio de uma pinça de ponta fina e lâmina de barbear esterilizadas e aqueles com características de efetividade, evidenciados pela presença visual de leghemoglobina, serviram para o isolamento das bactérias. A superfície cortada do nódulo foi riscada na superfície do meio sólido em placas de Petri. Foram efetuadas três repetições por nódulo. As placas foram incubadas em sua posição invertida, em estufa bacteriológica a 28°C, para o desenvolvimento das colônias, e transferidas várias vezes para novo meio de cultura até a obtenção de colônias puras. As culturas puras obtidas a partir de colônias isoladas foram caracterizadas quanto à velocidade de crescimento, reação do pH do meio, quantidade de muco produzido e coloração da colônia, como uma primeira aproximação para identificação do gênero.

A estimativa da velocidade de crescimento das estirpes foi feita de acordo com o número de dias requeridos para que as colônias atingissem 1mm de diâmetro: de três a cinco dias, crescimento rápido (CR); de seis a sete dias, crescimento intermediário (CI); de oito a dez dias, crescimento lento (CL). As culturas foram transferidas para tubos de ensaio com tampa rosqueável contendo meio de cultura inclinado, cobertas com vaselina líquida esterilizada. As estirpes isoladas foram catalogadas e preservadas em coleção.

Resultados e discussão

Até o presente foram identificadas 14 espécies de Leguminosae, sendo: *Bauhinia forficata*, *Caesalpinia echinata*, *Peltogyne* sp, *Sclerolobium denudatum* (subfamília Caesalpinoideae); *Anadenanthera falcata*, *A. colubrina*, *A. macrocarpa*, *Inga sessilis*, *Parapiptadenia rígida*, *Piptadenia gonoacantha* (subfamília Mimosoideae) e *Andira anthelmia*, *Lonchocarpus* sp, *Machaerium nyctitans*, *M. villosum* (subfamília Papilionoideae). Uma maior ocorrência de nódulos foi encontrada nas espécies das subfamílias Mimosoideae e Papilionoideae, não sendo verificados na Caesalpinoideae. Segundo Moreira (1994), a nodulação é mais freqüente entre as Mimosoideae e Papilionoideae e pouco freqüente nas Caesalpinoideae. Nas leguminosas noduladas, os nódulos foram encontrados nas raízes laterais de plantas jovens que cresciam nas bordas da mata, não sendo encontrados nódulos nas espécies que cresciam no interior, ou quando encontrados, eram pequenos (menores que 1 mm) e apresentaram a coloração interna esbranquiçada, podendo ser sugerido que eram inefetivos ou estavam nos estágios iniciais de desenvolvimento (Vidor et al., 1983). Por outro lado, a ausência da nodulação em espécies nodulíferas pode estar relacionada a fatores químicos, físicos ou biológicos do solo (Barbieri et al., 1998; Fernandes et al., 2003). Até o presente, foram isoladas estirpes das espécies: *A. falcata*, *A. colubrina*, *A. macrocarpa*, *P. gonoacantha* e *M. aculeatum*. Os nódulos eram bem desenvolvidos e exibiram a coloração interna vermelha, o que indica presença de leghemoglobina, e aparentemente, eficiência na fixação de nitrogênio (Vidor et al., 1983; Cordeiro et al., 1996). As características culturais e morfológicas do rizóbio fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento (Neves et al., 1998; Fernandes et al., 2003). As estirpes isoladas das espécies do gênero *Anadenanthera* apresentaram colônias gomosas, translúcidas, circulares com diâmetro variando entre puntiforme a maior que 3mm, crescimento rápido e acidificaram o meio de cultura. Segundo Graham (1976) características como tempo de crescimento e a reação do pH do meio são testes fisiológicos significativos na taxonomia do rizóbio. A quantidade de muco produzida determina a forma da colônia e as estirpes de rizóbio diferem tanto na quantidade de muco produzido como no tipo característico. Vários autores classificam as colônias de rizóbio como mucosas “wet” as que produzem muito muco e secas “dry” as que produzem pouco muco e segundo Moreira (1994), esta característica tem mostrado diferenças intrínsecas e ecológicas entre estirpes mucosas e secas. As estirpes isoladas de *P. gonoacantha* apresentaram crescimento intermediário, pouca produção de muco, formatos circulares, opacas e alcalinizaram o meio de cultura. Segundo Barbieri et al., (1998), características como crescimento rápido e acidificante são típicas de *Rhizobium* enquanto crescimento lento e alcalinizantes são típicas de *Azorhizobium*. Podendo ser concluído que as estirpes isoladas de *Anadenanthera* pertencem ao gênero *Rhizobium* enquanto as isoladas de *P.gonoacantha* de *Azorhizobium*. As estirpes estão sendo testadas nas leguminosas hospedeiras para avaliação de eficiência da fixação biológica do nitrogênio.

Referências bibliográficas

- Barbieri, A., Carneiro, M.A.C., Moreira, F.M.S. & Siqueira, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiro no sul de Minas Gerais. **Cerne**, v.4, n.1, p.145-153, 1998.
- Cordeiro, L., Sprent, J.I. & McINROY, S.G. Some development and structural aspects of nodules of *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl., **Naturalia** v.21, p.9-21, 1996.
- Fernandes, M.F., Fernandes, R.P.M. & Hungria, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-deporco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesq. agropec. bras.** Vol.38, n.7. 2003.
- Franco A.A. Campos, D.N., Cunha, C.D., Campello, E.F., Monteiro, E.M.S., Santos, C.J.F., Fontes, A.M. & Faria, S.M. Regevegetação de solos degradados. In: **Workshop sobre recuperação de áreas degradadas**, Itaguaí, RJ. 1990, Anais...Rio Janeiro, UFRRJ, Dep.Ciências Ambientais, 1991, p.133-157.
- Fred, C.B. & Waksman, S.A. **Laboratory manual of general microbiology**. McGraw Hill, New York, 1928, 145p.

- Graham, P.H. Identification and classification of root nodule bacteria. In: NUTMAN, P.S. (ed) **Symbiotic nitrogen fixation in plants**. Cambridge:Cambridge University, 1976.
- Moreira, F.M.S. Fixação biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. In: ARAUJO, R.S., HUNGRIA, M. (eds) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994.
- Neves, M.C.P., Martins, L.M., Xavier, G.R. & Rumjanek, N.G. Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (*Vigna unguiculata*) em solos do nordeste do Brasil. II Zona da Mata. **Agrobiologia**, 1998, 8p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 47).
- Vidor, C. **Fixação biológica do nitrogênio pela simbiose entre Rhizobium e leguminosas**. Rio Grande do Sul: IPAGRO, 1983 (Boletim técnico n.11) 52 p.
- Vincent, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Blackwell Scientific Publ. Oxford, 1970.