

Seleção de Rizóbios Eficientes na Simbiose com *Cratylia argentea*¹

Giovanna Moura Calazans²; José Carlos Cruz³; José Aloísio Alves Moreira³;
Gabriel Avelar Miranda²; Walter J. R. Matrangolo³; Ivanildo E. Marriel^{3,4}

¹ Trabalho financiado pela Fapemig/CNPq

² Acadêmico em Engenharia Ambiental – Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM;

³ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo;

⁴ Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor de Engenharia Ambiental – UNIFEMM

Introdução

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando uma área equivalente a quase um quarto do território nacional. Em razão de sua elevada quantidade e variedade de espécies endêmicas, este bioma encontra-se na lista dos *Hotspots* mundiais em biodiversidade, o que implica prioridade global de conservação (MYERS et al., 2000).

A importância do cerrado no agronegócio brasileiro é expressiva, considerando que este bioma responde por mais da metade da produção nacional de grãos e de carne (BALBINO et al., 2011). Entretanto, os solos predominantes nesta região são caracterizados também pela acidez e concentração de alumínio tóxico elevadas, além de deficiências nutricionais de N, P, K, Ca e Mg, o que aumenta sua vulnerabilidade à degradação. Desse modo, tornam-se indispensáveis estratégias adequadas de recuperação de áreas degradadas para o bioma.

O sucesso no processo de recuperação de áreas degradadas está diretamente relacionado às espécies introduzidas. Essas espécies devem ser preferencialmente nativas, apresentar elevada tolerância a condições edafoclimáticas adversas e proporcionar a recuperação natural do sistema visando o restabelecimento de condições de equilíbrio e funcionamento sustentável dos ecossistemas.

Dentre estas características desejáveis, é importante salientar a eficiência da espécie de planta na associação com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (SILVA et al., 2007), além de porte, classificação nos estágios de sucessão e seu potencial para produção de forragem. Consequentemente, diversos estudos indicam o uso de leguminosas, principalmente arbustivas e arbóreas, em projetos de recuperação de áreas degradadas (FRANCO et al., 2003).

As associações de leguminosas com bactérias fixadoras de nitrogênio constituem o processo denominado fixação biológica de nitrogênio – FBN (SILVA et al., 2007). Essas bactérias, genericamente conhecidas como rizóbios, penetram na raiz criando um cordão de infecção dentro do córtex, onde se multiplicam, formando nódulos. Neste processo simbiótico, os rizóbios convertem o nitrogênio atmosférico (N₂) em amônia, forma assimilável pelas plantas, por meio da enzima nitrogenase, e recebem da planta fontes de carbono e de energia. A FBN é uma alternativa ecologicamente correta para a substituição, total ou parcial, dos fertilizantes nitrogenados que dependem de combustíveis fósseis para sua fabricação, transporte e distribuição. Além disso, as plantas apresentam baixa eficiência de utilização destes fertilizantes aplicados ao solo e o nitrogênio é facilmente carregado para o lençol freático e outros mananciais, contaminando-os e favorecendo o processo de eutrofização. Devido ao processo de FBN, as leguminosas contribuem com o aporte de nitrogênio no solo, favorecendo o desenvolvimento de outras espécies vegetais e da microbiota (SILVA et al., 2007).

A otimização da FBN depende da inoculação de sementes de leguminosas durante o plantio com estirpes de bactérias de alta eficiência, isto é, com alta habilidade de sobrevivência, competitividade e colonização do sistema radicular da planta hospedeira, em

relação às estirpes nativas do solo. Conseqüentemente, tornam-se indispensáveis trabalhos de pesquisa visando a seleção de rizóbios adaptados às condições ambientais do ecossistema de interesse. Por isso, justifica-se a cuidadosa seleção de estirpes mais adaptáveis e eficientes na FBN associada às leguminosas arbóreas forrageiras e nativas do cerrado.

Nesse contexto, a leguminosa arbustiva, lenhosa, nativa do cerrado e da caatinga, *Cratylia argentea*, é recomendada em projetos de recuperação de áreas degradadas devido à extrema adaptação a solos ácidos, solos saturados de alumínio, além da alta tolerância à seca (RAMOS et al., 2003). Em razão de seu elevado teor de proteínas, essas plantas destacam-se como espécie forrageira viabilizando sua utilização em sistemas de integração lavoura-pecuária (SANTOS, 2007). Devido ao seu potencial como planta forrageira e para recuperação de áreas degradadas, as pesquisas com *Cratylia* sp. têm-se intensificado nos últimos tempos.

O objetivo desse trabalho foi testar a eficiência na fixação biológica de nitrogênio de estirpes de rizóbios isoladas da leguminosa arbórea nativa do cerrado, *Cratylia argentea*, visando à utilização desta espécie na produção de forragem e/ou recuperação de áreas degradadas.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. Foram pré-selecionados 25 acessos de rizóbios isolados da *Cratylia argentea* (CALAZANS et al., 2011) para teste de inoculação em casa de vegetação.

Para avaliação da eficiência simbiótica das estirpes, além dos 25 acessos escolhidos como tratamentos, foram incluídos um controle (sem nitrogênio e sem inoculação) e um tratamento com adubação nitrogenada (5mg N planta⁻¹ semana⁻¹, fonte nitrato de amônio). Utilizaram-se vasos com capacidade para 5 Kg de solo, classificado como LATOSSOLO VERMELHO Distrófico, fase cerrado. As sementes foram desinfestadas superficialmente em etanol (90%) sob agitação por 30 segundos, em seguida, imersas em peróxido de hidrogênio por 3 minutos e depois lavadas em água estéril por 10 vezes. Efetuou-se o plantio de 10 sementes por vaso, aplicando-se 2 mL de inoculante contendo 10⁸ células por semente. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. Uma semana após a germinação, foi efetuado o desbaste, deixando seis plantas por vaso. Setenta dias após a germinação, foi efetuado outro desbaste, deixando apenas três plantas por vaso. Todos os tratamentos, incluindo testemunhas, receberam periodicamente solução nutritiva isenta de nitrogênio (SOMASEGARAN; HOBEN, 1985).

Na coleta do experimento, realizada aos 150 dias após o plantio, avaliou-se, por vaso, a massa seca das raízes (MSR), da parte aérea (MSPA), dos nódulos (MSN), ambos secos em estufa a 60 °C até peso constante. Obteve-se o número de nódulos (NN), que foram transformados para $\log x + 1$ para análise estatística.

Foi determinado o teor de N da parte aérea e raízes pelo método Kjeldahl. O N acumulado foi calculado multiplicando a massa pelo teor de N. A soma do N acumulado na parte aérea (NPA) e na raiz (NRA) corresponde ao N total (NT).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade por meio do programa de estatística SISVAR, versão 5.3.

Resultados e Discussão

As sementes de *Cratylia argentea* não foram escarificadas e apresentaram 100% de germinação, ocorrida aos sete dias após o plantio. Os resultados obtidos do teste de eficiência estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Número de nódulos vaso⁻¹ (NN)*, massa seca de nódulos vaso⁻¹ (MSN), massa seca da parte aérea vaso⁻¹ (MSPA), massa seca da raiz.vaso⁻¹ (MSR), nitrogênio total da parte aérea vaso⁻¹ (NPA) e nitrogênio total da raiz vaso⁻¹ (NR), dos diferentes tratamentos; controle (C), 25 estirpes testadas (1 a 25) e com adubação nitrogenada (N)**

Trat	NN (g)	MSN (g)	MSPA (g)	MSR (g)	NPA (g)	NR (g)
C	67 b	0,27 b	5,96 c	4,59 a	0,17 c	0,08 c
1	133 a	0,50 a	8,40 b	6,31 a	0,24 b	0,11 b
2	137 a	0,43 b	8,12 b	6,31 a	0,23 b	0,14 b
3	119 a	0,61 a	9,51 b	6,67 a	0,26 b	0,14 b
4	116 a	0,61 a	9,88 b	6,73 a	0,28 b	0,15 b
5	95 a	0,54 a	9,66 b	6,17 a	0,29 b	0,13 b
6	77 b	0,37 b	7,12 c	5,95 a	0,22 b	0,14 b
7	79 b	0,57 a	8,70 b	5,73 a	0,26 b	0,12 b
8	92 a	0,51 a	6,67 c	7,51 a	0,23 b	0,18 b
9	104 a	0,50 a	8,17 b	5,89 a	0,23 b	0,13 b
10	95 a	0,52 a	8,42 b	6,33 a	0,25 b	0,15 b
11	75 b	0,49 a	7,37 c	6,40 a	0,25 b	0,14 b
12	40 c	0,22 b	4,30 d	2,25 b	0,13 c	0,05 d
13	80 b	0,66 a	7,48 c	5,70 a	0,24 b	0,12 b
14	106 a	0,63 a	7,58 c	5,83 a	0,25 b	0,14 b
15	49 c	0,27 b	4,34 d	1,90 b	0,13 c	0,04 d
16	100 a	0,63 a	7,01 c	5,86 a	0,23 b	0,13 b
17	83 b	0,59 a	6,90 c	5,40 a	0,22 b	0,13 b
18	107 a	0,71 a	8,16 b	5,60 a	0,26 b	0,13 b
19	81 b	0,58 a	7,84 b	5,68 a	0,25 b	0,12 b
20	68 b	0,53 a	7,11 c	5,38 a	0,23 b	0,12 b
21	85 a	0,55 a	8,72 b	5,72 a	0,29 b	0,12 b
22	102 a	0,60 a	9,01 b	6,07 a	0,30 b	0,14 b
23	49 c	0,27 b	7,56 c	1,79 b	0,21 b	0,03 d
24	113 a	0,67 a	6,55 c	6,07 a	0,22 b	0,13 b
25	94 a	0,52 a	8,77 b	5,49 a	0,24 b	0,10 b
N	0 d	-	18,82 a	7,57 a	0,98 a	0,26 a

* O número de nódulos foi transformado para log x+1 para análise estatística.

** Mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Em relação à nodulação, observou-se que o número de nódulos por vaso variou de 40 a 137 (Tabela 1, Figura 1). Entretanto, não foram observados nódulos nas raízes das plantas cultivadas no tratamento com adubação nitrogenada, demonstrando inibição deste processo pela dosagem de N aplicada, o que está de acordo com a literatura (ZILLI et al., 2007). Como a FBN é um processo regulado pelo produto da reação, seu início ocorre somente quando há baixa disponibilidade de N no solo. Observou-se o aparecimento de nódulos nas

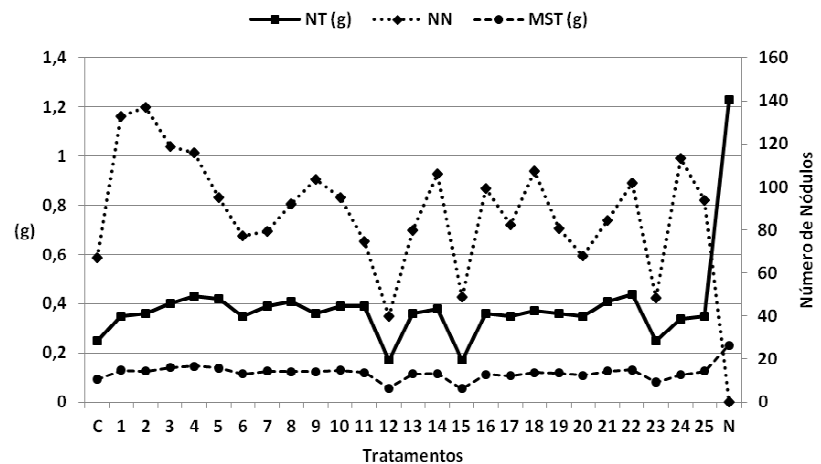


raízes das plantas retiradas no segundo desbaste, efetuado aos 70 dias após a germinação, em todos os tratamentos, inclusive no tratamento controle, sem inoculação e sem nitrogênio. Esses resultados diferem dos relatados por Oliveira et al. (1998), que afirmam que a nodulação da *Cratylia argentea* ocorre somente depois dos 100 dias após a germinação. Os autores observaram ainda a presença de nódulos apenas na raiz secundária, com tamanhos e formas variadas, enquanto, neste trabalho, foi verificado o aparecimento de nódulos tanto na raiz principal, quanto nas secundárias. Os nódulos variavam de tamanho e eram predominantemente esféricos. A maioria dos nódulos apresentava forma individualizada, embora, em alguns casos, tenham sido observados também nódulos siameses. O ocorrência de nódulos nas plantas no tratamento controle confirma a presença natural de *Rhizobium* e/ou *Bradyrhizobium* nos solos de cerrado, com capacidade de nodular esta leguminosa forrageira.

Com relação ao acúmulo de nitrogênio da parte aérea e raiz, houve diferenças significativas entre as estirpes, todavia, o tratamento com adubação nitrogenada foi significativamente superior. A maior quantidade de nitrogênio observada na parte aérea foi no tratamento inoculado com a estirpe 22 (0,3g), e a maior quantidade de nitrogênio na raiz foi com a estirpe 8 (0,18 g), correspondente a 22% e 58% do total de N, respectivamente, em comparação com a testemunha nitrogenada.

A comparação entre a massa seca total vaso⁻¹ (MST), o nitrogênio total vaso⁻¹ (NT) e o número de nódulos vaso⁻¹ (NN) podem ser visualizada na Figura 2. A massa seca e o nitrogênio da parte aérea e das raízes apresentaram diferenças entre os tratamentos inoculados. Com base nestes parâmetros, nota-se que as estirpes 12, 15 e 23 apresentaram menor eficiência simbiótica, com os menores valores observados e os mais elevados no tratamento com adubação nitrogenada.

Todos os tratamentos inoculados apresentaram resultados superiores ao tratamento controle, sem nitrogênio e sem inoculação, exceto para as estirpes 12, 15 e 23. As estirpes 3, 4, 5, 7, 10, 21 e 22 estão entre as dez com maior eficiência simbiótica, isto é, proporcionaram as maiores produções de massa seca total e nitrogênio total. O máximo de nitrogênio total acumulado nos tratamentos inoculados foi 36% inferior em relação à testemunha nitrogenada, e 100%



superior ao tratamento sem inoculação. Esses dados corroboram com os de Cantarutti e Silva (1990), que estudaram a eficiência de rizóbios nativos em leguminosas forrageiras na Bahia e encontraram um acúmulo de nitrogênio nas plantas inoculadas equivalente a menos da metade do encontrado na testemunha nitrogenada.

A correlação entre a massa de nódulos e o logaritmo do nitrogênio total foi de 0,78, resultado que também foi observado por Döbereiner (1966), que observou o aumento do logaritmo de N total linearmente com aumento no peso dos nódulos. Isto sugere que esse parâmetro serve como indicador da eficiência da FBN. A correlação positiva entre número de nódulos e nitrogênio total (0,66) confirma que há uma tendência de aumento do nitrogênio

acumulado com aumento do número de nódulos. Esses resultados também diferem dos observados por Oliveira et al. (1998), que não encontraram correlação entre número de nódulos e nitrogênio fixado na *Cratylia argentea*.

Desse modo, faz-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas em busca de estirpes de rizóbios mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio para a *Cratylia argentea*.

Conclusões

1. As plantas apresentaram nodulação bem estabelecida aos 70 dias após germinação.
2. Os nódulos analisados apresentaram, na maioria dos casos, forma esférica e tamanho médio.
3. A seleção de estirpes torna-se indispensável para otimizar a fixação biológica de nitrogênio em *Cratylia argentea*.

Referências

BALBINO, L. C.; BARCELLOS, A. de O.; STONE, L. F. (Ed.). **Marco referencial em integração Lavoura-Pecuária-Floresta**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011.

CALAZANS, G. M.; MIRANDA, G. A.; MOREIRA, J. A. A.; CRUZ, J. C.; MATRANGOLO, W. J. R.; MARRIEL, I. E. Incorporação de novos acessos de rizóbios isolados da *Cratylia argentea* à coleção de culturas de microrganismos multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/BIC JÚNIOR, 2., 2011, Sete Lagoas. [**Trabalhos apresentados**]. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 1 CD-ROM.

CANTARUTTI, R. B.; SILVA, S. D. V. M. Efetividade de estirpes nativas de Bradyrhizobium com diferentes leguminosas forrageiras. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 27, 1990, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990. p. 321.

DOBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, London, v. 210, p. 850-852, 1966.

FRANCO, A. A.; RESENDE, A. S. de; CAMPELLO, E. F. C. Importância das leguminosas arbóreas na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade de sistemas agroflorestais. In: SEMINÁRIO SISTEMAS AGROFLORESTAIS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, 2003, Campo Grande, MS. **Palestras...** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 1 CD ROM.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403. p. 853-858, 2000.

OLIVEIRA, F. L. de; PITARD, R. M.; SOUTO, S. M. **Seleção de estirpes de rizóbio para leguminosas *Arachis pintoi* e *Cratylia argentea***. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 19 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 53).

RAMOS, A. K. B.; SOUZA, M. A.; PIZARRO, E. A. **Algumas informações sobre a produção e o armazenamento de sementes de *Cratylia argentea***. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 4 p. (Embrapa Cerrados. Circular técnica, 25).

SANTOS, N. de F. A. dos. **Valor nutritivo de *Cratylia argentea* para suplementação de ruminantes na Amazônia**. 2007. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA.

SILVA, G. T. A.; RESENDE, A. S. de; CAMPELLO, E. F. C.; DIAS, P. F.; FRANCO, A. A. **O papel da fixação biológica de nitrogênio na sustentabilidade de sistemas agroflorestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 36 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 231).

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume-Rhizobium technology**. Hawaii: Niftal, 1985. p. 54-63.

ZILLI, J. E.; SMIDERLE, O. J.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. População microbiana em solo com soja e tratado com diferentes herbicidas em área de Cerrado no estado de Roraima. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 37, p. 201-212, 2007.