

Isolamento e seleção de estirpes de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio da *Cratylia argentea*

Giovanna M. Calazans¹, Gabriel A. Miranda¹, Jaqueline N. Teixeira, Walter J. R. Matrangolo², José A. A. Moreira², José C. Cruz² e Ivanildo E. Marriel²

¹Estudante do Curso de Engenharia Ambiental - UNIFEMM, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED

²Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, Sete Lagoas - MG. E-mail: imarriel@cnpmc.embrapa.br

Palavras-chave: inoculante, leguminosa arbórea, simbiose, adubo verde.

Introdução

O ambiente natural vem sofrendo mudanças devido à ação antrópica. O solo, componente importante na interação entre seres vivos, ciclagem de nutrientes e água, tem sido afetado por essas ações, que, muitas vezes, geram impactos negativos. São impactos originados pelo uso inadequado, sistemas de manejo inapropriado, retirada da cobertura vegetal, entre outros. A perda da capacidade produtiva do sistema é um impacto característico de áreas degradadas (WADT, 2003). Há diversas maneiras de recuperação de áreas degradadas, como a regeneração e sucessão ecológica, rotação e consórcio de culturas, sistemas agroflorestais, agricultura orgânica, além da educação ambiental (KOBAYAMA et al., 2001). Ao escolher espécies para a restauração dessas áreas, deve-se selecionar aquelas que apresentam resistência às condições de ambientes adversos, além de contribuir com a recuperação da estrutura do sistema, favorecendo o desenvolvimento de mecanismos e processos naturais de recuperação (RESENDE; KONDO, 2001).

Nesse contexto, o uso de leguminosas é indicado por apresentarem essa resistência (GUIMARÃES et al., 2009). São espécies de extrema adaptação a diversas condições edafoclimáticas, resistência a doenças, participam efetivamente da ciclagem de nutrientes devido ao desenvolvimento de raízes finas e profundas. Outra importante característica é a capacidade que essas espécies têm de se relacionar simbioticamente com bactérias nativas do solo, denominadas rizóbios, que, pela presença da enzima nitrogenase, têm a capacidade de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia (BROUGHTON et al., 2006), forma assimilável pela planta. Em troca, a planta oferece proteção e nutrientes, sendo que cerca de 30% do carbono fixado pela fotossíntese é exsudado pela raiz (RUMJANEK, 2006). Essa relação é conhecida como fixação biológica de nitrogênio. Em resposta à infecção da raiz, é estimulada a formação de nódulos, que, de formas diferenciadas, abrigam as estirpes de rizóbios.

Para a fixação biológica de nitrogênio ser efetiva, é necessário selecionar estirpes adequadas (PELCZAR et al., 2005). Por esse motivo, há no mercado diversos inoculantes, contendo colônias selecionadas de rízbios, específicos para cada espécie de leguminosa. Ao se utilizar leguminosas, antes da semeadura, é viável que se inocule a semente, pois esse processo favorece o aumento de nódulos nas raízes e, conseqüentemente, maior eficiência na



fixação biológica de nitrogênio. Os benefícios deste processo incluem menor custo financeiro, pois reduz o gasto com adubação, possibilita impacto ambiental e aumenta a produtividade da cultura (FRANCO et al., 2002; HUNGRIA et al., 2007).

Algumas leguminosas nativas do Cerrado, como é o caso da *Cratylia argentea*, não possuem ainda inoculante comercial. A *Cratylia argentea* é uma leguminosa arbustiva e é conhecida como camaratuba, copada ou cipó-prata (RAMOS et al., 2003). Há poucas pesquisas sobre a espécie, todavia, já é conhecido seu potencial como planta forrageira devido ao seu alto valor nutritivo (PIZARRO et al., 1995; LASCANO, 1995) e para recuperação de áreas degradadas, por se adaptar facilmente em solos ácidos e com déficit hídrico. Por isso, sua utilização é indicada também em consórcios de pastagem e leguminosas (VOLPE et al., 2008). Portanto, faz-se viável o isolamento e a seleção de estirpes de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio para essa espécie, como candidatas à formulação de inoculantes.

Objetivo

Neste trabalho, procurou-se isolar e selecionar estirpes de rizóbios específicos para a leguminosa arbórea nativa do cerrado *Cratylia argentea*, visando a produção de inoculante.

Metodologia

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas-MG.

1. Coleta e desinfecção dos nódulos

Mudas de doze meses da leguminosa *Cratylia argentea* foram conservadas em sacos plásticos em casa de vegetação. Realizou-se quatro coletas, a cada 15 dias e, a cada coleta, foram analisadas três mudas da espécie. As raízes das plantas coletadas foram cuidadosamente lavadas em água corrente. Após a lavagem, retirou-se de 8 a 16 nódulos de cada planta avaliada. Os nódulos coletados foram imergidos em álcool 90% por 10 segundos e posteriormente transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio 3% por 3 minutos, para desinfecção. Após a esterilização, lavou-se pelo menos cinco vezes os nódulos com água destilada esterilizada, no fluxo laminar.

2. Seleção de nódulos e plaqueamento

Após esterilizados, foram selecionados três nódulos ativos (cor rósea, devido à presença da leghemoglobina) de cada planta avaliada, por coleta. Esses nódulos foram cuidadosamente macerados em solução salina 0,85% com a ajuda de um fórceps esterilizado. Foram transferidos 100µl dessa suspensão para placa de petri com meio extrato de levedura-manitol com corante vermelho congo (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994), em três repetições. As placas foram armazenadas em estufa a 29°C, até o crescimento das colônias.



3. Isolamento

Após o crescimento das colônias, selecionou-se as estirpes de bactérias que apresentavam características típicas de rizóbios que, segundo Hungria e Araújo(1994), apresentam diversas formas, desde achatadas a cônicas, e arredondadas, e podem ser brancas opacas, leitosas, translúcidas, brilhosas ou foscas, podendo escurecer no centro quando a cultura fica mais velha e podem também apresentar aspecto bastante gomoso. Outra característica observada, foi a absorção ou não do corante vermelho congo presente no meio. As colônias de rizóbios não absorvem ou absorvem muito pouco esse corante. Selecionou-se duas colônias por coleta, que foram purificadas. Após crescimento em estufa a 29°C, foram transferidas para tubos de estoque com meio extrato de levedura-manitol (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994) e armazenadas em temperatura ambiente.

Resultados e Discussão

Nas quatro coletas efetuadas durante o estudo, foi analisado um total de 12 mudas, de aproximadamente doze meses após a germinação, com altura em torno de 40-50cm. Foram coletados e analisados 130 nódulos (Tabela 1). Com base em uma avaliação preliminar das características fenotípicas dos nódulos, foram selecionados três nódulos planta⁻¹ para plaqueamento, obtendo em torno de 36 nódulos com características de nódulos efetivos, de cor rósea típica, equivalente a 2,3% dos nódulos. Este fato evidencia que esta espécie apresenta elevado número de nódulos aparentemente inativos, na presença da população nativa do solo, sugerindo que trabalhos de seleção de bactérias adequadas tornam-se promissores para o aumento de produção da cultura através da prática da inoculação.

Os nódulos selecionados, ativos, eram, em sua maioria, de tamanhos pequenos, aproximadamente entre três e cinco milímetros de diâmetro. Já, os nódulos grandes encontrados, em baixo número estavam em estado de senescência.

Tabela 1. Número de coletas, de mudas, de nódulos coletados e plaqueados no processo de obtenção de isolados de *Cratylia argentea*

Coleta	Muda	Nº de nódulos coletados	Nódulos Plaqueados (%)
1	A	10	30
	B	12	25
	C	9	33
2	D	12	25
	E	15	20
	F	13	23
3	G	11	27
	H	10	30
	I	12	25
4	J	8	37,5
	K	9	33
	L	9	33



Total	12	130	28
--------------	-----------	------------	-----------

A partir dos nódulos selecionados e plaqueados, obtiveram-se várias colônias típicas de rizóbio por placa. Destas colônias, foram selecionados oito isolados para testes posteriores de sua eficiência na planta hospedeira.

Conclusão

O isolamento e a seleção de estirpes de rizóbio adequadas deve contribuir para incrementar o crescimento e a produção de biomassa de *Cratylia argentea*, considerando-se que esta espécie de leguminosa arbórea apresenta baixo índice de nódulos aparentemente ativos, quando nodulada na presença da população nativa de rizóbio do solo.

Referências

BROUGHTON, W. J.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUERE, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKIN, W. J. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for Rhizobium SP. Strain NGR234- Legume Symbioses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, May 2006.

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; VIEIRA, C.; TSAI, S. M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1145-1150, 2002.

GUIMARÃES, A. K. V. G.; CAMARÃO, A. P.; SANTIAGO, P. C. S. B.; RODRIGUES FILHO, J. A. Massa de forragem em pastagens cultivadas e consorciadas com leguminosas, estabelecidas com e sem queima da vegetação secundária. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 2, p. 379-384, Abr./Jun. 2009.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Goiânia: Embrapa-CNPAF; Londrina: Embrapa-CNPSo, 1994. p. 183-192. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 46).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

KOBIYAMA, M.; MINELLA, J. P. G.; FABRIS, R. Áreas degradadas e sua recuperação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 210, p. 10-17, maio/jun. 2001.



LASCANO, C. E. Calidad nutritiva y utilización de *Cratylia argentea*. In: TALLER DE TRABAJO SOBRE CRATYLIA, 1995, Brasília. **Potencial del genero Cratylia como leguminosa forrajera**: memorias. Cali: CIAT, 1995. p. 83-97. (CIAT. Documento de Trabajo, 158).

PELCZAR, M. J.; CHAM, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. São Paulo: Pearson Makron Books, 2005. v. 2, 517 p.

PIZARRO, E. A.; CARVALHO, M. A.; RAMOS, A. K. B. Introducción y evaluación de leguminosas forrajeras arbustivas en el Cerrado brasileño. In: TALLER DE TRABAJO SOBRE CRATYLIA, 1995, Brasília. **Potencial del genero Cratylia como leguminosa forrajera**: memorias. Cali: CIAT, 1995. p. 40-49. (CIAT. Documento de Trabajo, 158).

RAMOS, A. K. B.; SOUZA, M. A. de; 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).

RESENDE, A. V.; KONDO, M. K. Leguminosas e recuperação de áreas degradadas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 210, p. 46-56, maio/jun. 2001.

RUMJANEK, N. G. Impacto do uso do Rhizobium no rendimento de feijão-caupi. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 1.; REUNIÃO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 6., 2006, Teresina. **Tecnologias para o agronegócio**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2006. Mini-curso.

VOLPE, E.; CARDOSO, S.; ZAGO, V. C. P. Recuperação de pastagem com calagem, adubação e estabelecimento de leguminosas. In: SEMINÁRIO DE AGROECOLOGIA DE MATO GROSSO DO SUL, 2., 2008, Dourados. **A construção participativa da agroecologia em Mato Grosso do Sul**: anais. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 1 CD-ROM.

WADT, P. G. S. (Ed.). **Práticas de conservação do solo e recuperação de áreas degradadas**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2003. 29 p. (Embrapa Acre. Documentos, 90)

