



Seleção de estirpes de rizóbio para *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan em solo não estéril

Selection of Rhizobium Strains for Parapiptadenia rigida (Benth.) Brenan in Non-Sterile Soil

de OLIVEIRA, Isabelly Santos Rosado¹; da SILVA, Maura Santos Reis de Andrade¹; ZILLI, Jerri²; de FARIA, Sérgio Miana²; JESUS, Ederson da Conceição²

¹Departamento de Ciências do Solo, UFRRJ, isabellyrosado94@gmail.com, maura@ufrrj.br; ² Embrapa Agrobiologia, jerri.zilli@embrapa.br, sergio.defaria@embrapa.br, ederson.jesus@embrapa.br

RESUMO EXPANDIDO

Eixo Temático: Manejo de Agroecossistemas

Resumo: O uso de espécies nativas é um princípio fundamental da agroecologia, pois contribui para a conservação da biodiversidade e a recuperação de ecossistemas. Neste trabalho foram testadas três estirpes de rizóbios (BR 827, BR 3804 e BR 9004) em *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan em vasos com solo, com vistas a utilização de inoculação para a redução do uso de nitrogênio (N). Foram realizados dois experimentos no delineamento inteiramente casualizado com dez e seis repetições, respectivamente. Além das estirpes, utilizou-se tratamentos com e sem N. As variáveis analisadas foram: massa da parte aérea seca, massa das raízes secas e massa dos nódulos secos. Após a coleta, os dados foram submetidos às análises de variância e, quando detectada a significância, utilizou-se o teste Scott-Knott, ambos a 5% de probabilidade. As estirpes BR 827 e BR 9004 promoveram incremento de massa seca da parte aérea, o que indica que elas são eficientes e têm potencial para serem testadas em campo.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio; nodulação; recuperação de áreas degradadas.

Introdução

A espécie *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan é nativa da Mata Atlântica e, por isso, de grande importância para os programas de reflorestamento deste bioma (LORENZI, 1992). A *P. rigida*, possui a capacidade de estabelecer uma relação com rizóbios. Esta interação simbiótica apresenta uma vantagem para plantios de reabilitação (FRANCO et al., 1992; FRANCO e FARIA, 1997) visto que algumas plantas em simbiose com rizóbios não necessitam de adubação nitrogenada. A fixação biológica do nitrogênio (FBN) em leguminosas, ocorre em estruturas radiculares conhecidas como nódulos. O efeito da inoculação e a quantidade de nitrogênio fixado variam de acordo com a estirpe empregada e com a leguminosa hospedeira cultivada (SIQUEIRA & FRANCO, 1998). A partir disto, percebe-se que é de extrema importância a seleção de estirpes, com o objetivo de buscar aquelas que sejam eficientes para cada espécie de leguminosa, visando a produção de



inoculantes específicos, que são um dos componentes fundamentais para o sucesso da implantação dessa tecnologia na recuperação de áreas degradadas (FARIA, 2000). A metodologia de seleção de estirpes de bactérias para leguminosas florestais, segue quatro bases de recomendação: Na base de recomendação I, a seleção é feita em condições controladas de laboratório, com o intuito de conhecer se a bactéria purificada é rizóbio e se possui a capacidade de nodular a planta testada. Para a base de recomendação II as estirpes selecionadas na etapa anterior são testadas em condições estéreis, em casa de vegetação, utilizando-se vasos “Leonard” contendo substrato estéril. A base de recomendação III é feita em vasos com solo não estéril, com o intuito de avaliar a competitividade das bactérias testadas com as estirpes nativas do solo. A base IV consiste no teste das estirpes selecionadas na base III em condições de campo ou viveiro (FARIA, 2000). O trabalho apresentado tem uma contribuição significativa para o manejo de agroecologia, principalmente no contexto da recuperação de áreas degradadas. A utilização de espécies nativas da Mata Atlântica, como a *P. rigida*, aliada à associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, traz benefícios tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico. Reduzindo a necessidade de adubação nitrogenada, o que contribui para a redução dos custos de produção e para a sustentabilidade dos agroecossistemas.

Metodologia

Experimentos em vasos com solo não estéril

Foram realizados dois experimentos, em épocas distintas, com a espécie *P. rigida*, que serão citados como “primeiro” e “segundo” experimento na descrição das atividades realizadas. Os solos utilizados foram argissolo vermelho-amarelo para o primeiro e planossolo para o segundo experimento. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e dez repetições no primeiro experimento e seis repetições no segundo experimento de *P. rigida*. Os tratamentos foram: 1. Inoculação com a estirpe BR 9004 (*Paraburkholderia spp.*); 2. Inoculação com a estirpe BR 3804 (*Mesorhizobium plurifarum*); 3. Inoculação com a estirpe BR 827 (*Ensifer fredii*); 4. Testemunha nitrogenada (com fertilizante nitrogenado na forma de NH_4NO_3); 5. Testemunha absoluta (sem inoculação e sem adubação nitrogenada). A testemunha nitrogenada (TN) recebeu semanalmente uma solução de nitrogênio sob a forma de nitrato de amônio (5 mg N.mL⁻¹). No total, foram aplicados 668 mg de N por planta no primeiro experimento e 1,53g no segundo experimento. As estirpes de rizóbio utilizadas foram pré-selecionadas na seleção sob condições esterilizadas para o mesmo hospedeiro (base II) e para o preparo do inóculo as bactérias foram cultivadas em meio 79 líquido (FRED & WAKSMAN, 1928) sob agitação horizontal orbital (150 rpm) até apresentarem crescimento. A inoculação foi realizada no momento do plantio adicionando 1mL por plântula. Os tratamentos foram inoculados com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em função da alta dependência micorrízica de espécies do grupo Piptadenia (JESUS et al., 2005). Como inóculo de FMAs, foi utilizada uma população estocada



na coleção da Embrapa Agrobiologia, sendo identificadas as seguintes espécies: *Rhizophagus clarum* (TH Nicolson & Schenck NC.) e *Dentiscutata heterogama* (TH Nicolson & Gerd). Para estimar a colonização por FMAs, utilizou-se a metodologia de GIOVANNETTI e MOSSE (1980). A colonização foi estimada pelo método da contagem em placa quadriculada (KOSKE; GEMMA, 1989). A coleta dos experimentos ocorreu no primeiro experimento, após 5 meses (150 dias) e no segundo experimento, após 6 meses (180 dias). As variáveis avaliadas foram: massa seca da parte aérea de cada planta, massa seca das raízes e massa seca dos nódulos. Os dados foram analisados pela ANOVA e seguida pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade). A eficiência e a eficácia de cada tratamento inoculado foram calculadas a partir das seguintes equações: Eficiência = (MPAS Trat/ MPAS Tabs X 100); Eficácia = (MPAS Trat/ MPAS TN X 100). Onde: MPAS Trat = massa da parte aérea seca do tratamento inoculado; MPAS Tabs = absoluta: massa da parte aérea seca da testemunha absoluta; MPAS TN (NH_4NO_3) = massa da parte aérea seca da testemunha nitrogenada.

Resultados e Discussão

Os resultados do primeiro experimento mostraram que a *P. rigida* respondeu à inoculação com as estirpes BR 827 e BR 9004, conforme indicado pelo maior acúmulo de massa seca na parte aérea das plantas inoculadas ($p < 0.05$). As plantas inoculadas com essas estirpes se diferenciaram significativamente da testemunha absoluta e não se diferenciaram da testemunha nitrogenada, o que as sugere como sendo as mais eficientes (Fig.1A). Já as plantas inoculadas com a estirpe BR 3804 apresentaram desempenho inferior àquelas inoculadas com as outras estirpes e não se diferenciaram da testemunha absoluta. Não houve diferença significativa no acúmulo e massa seca das raízes e dos nódulos. Plantas de todos os tratamentos apresentaram nódulos. As testemunhas também nodularam, porém a nodulação não foi frequente, se restringindo a apenas uma repetição de cada tratamento. A colonização micorrízica variou de média (36,59% - testemunha absoluta) a alta (64,81% - tratamento inoculado com estirpe de rizóbio), levando em consideração a classificação proposta por Carneiro et.al (1998), onde a colonização é considerada baixa, média e alta se for menor que 20%, entre 20 e 50% e maior que 50%, respectivamente. Porém, a ANOVA não detectou significância para essa variável. O acúmulo de massa seca em resposta à inoculação com as estirpes BR 827, BR 3804 e BR 9004 foi de 75, 112 e 134%, respectivamente (eficiência). Este acúmulo correspondeu, respectivamente, a 47, 57 e 64% do acúmulo observado para a testemunha nitrogenada (eficácia). A eficácia das estirpes foi um pouco menor que aquela observada no experimento em condições estéreis (74%), porém cabe destacar que neste experimento foram aplicados $668 \text{ mg de N. planta}^{-1}$, enquanto naquele foram aplicados apenas 160 mg (FRANCO & FARIA, 1997). No segundo experimento, as plantas inoculadas com as estirpes BR 827 e BR 9004 mantiveram um bom desempenho em relação a testemunha absoluta e à estirpe BR 3804, porém houve um destaque da testemunha nitrogenada (Fig.1B), em função do maior tempo do experimento em



casa de vegetação e consequente maior aplicação de solução nitrogenada nestas plantas (1.530 mg).

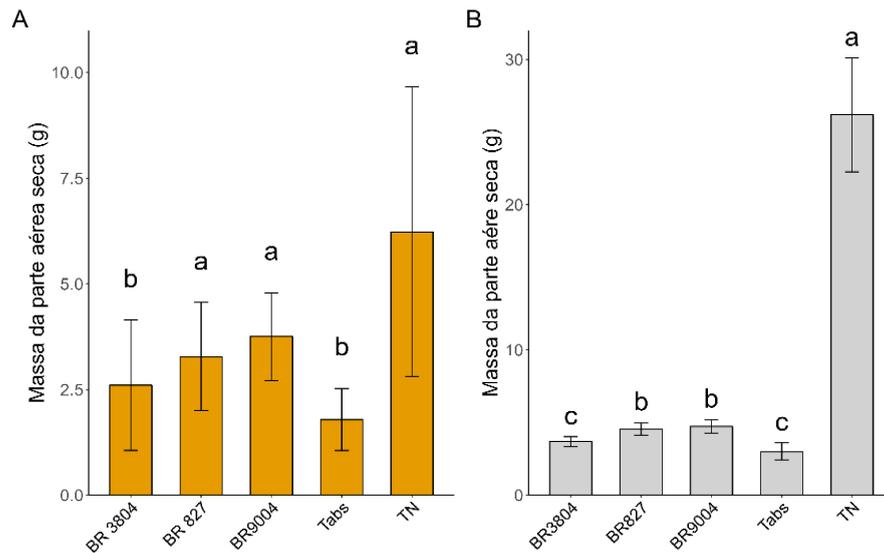


Figura 1: A) Massa da Parte aérea seca do experimento 1 e B) Massa da Parte aérea seca do experimento 2.

Também não houve diferença significativa no acúmulo de massa seca das raízes e dos nódulos, indicando que o efeito da inoculação se expressou majoritariamente no crescimento da parte aérea da planta. A variação dos dados foi bem menor do que aquela observada no primeiro experimento. No segundo experimento, o acúmulo de massa seca em resposta à inoculação com as estirpes BR 3804, BR 827 e BR 9004 foi de 23, 53 e 57%, respectivamente (eficiência). Este acúmulo correspondeu, respectivamente, a 14, 17.6 e 18% do acúmulo observado para a testemunha nitrogenada (eficácia). A baixa eficácia das estirpes nesse experimento se deve à grande dose de N aplicada à testemunha nitrogenada, que corresponderia em termos equivalentes a 750 kg. ha⁻¹ de N em condições de campo. Efeitos no crescimento de plantas em virtude da aplicação de N, são esperados, em razão das diversas funções que o nutriente exerce dentro delas (GONÇALVES et al., 2008). A variação na eficiência entre estirpes em promover o crescimento vegetal por meio da FBN é conhecida de longa data (MOREIRA et al., 2010) e os resultados aqui obtidos destacam a importância do processo de seleção para garantir que estirpes eficientes e competitivas sejam utilizadas como inoculantes. No caso da *P. rigida*, a seleção de estirpes auxiliará na utilização desta espécie em programas de reflorestamento na região da Mata Atlântica, bioma de onde essa espécie é nativa (LORENZI, 1992). Vale ressaltar que, por mais que a testemunha nitrogenada apareça como sendo mais eficiente no segundo experimento, em escalas maiores (condições de campo) seria inviável a aplicação da mesma quantidade de nitrogênio nas plantas, pois o custo seria muito grande. Mesmo no primeiro experimento, o N aplicado corresponderia a cerca de 334 kg ha⁻¹, o que também seria



economicamente inviável nestas condições, pois estas concentrações estão longe de serem encontradas nos solos em condições naturais onde a *P. rigida* ocorre, visto que o N está entre um dos nutrientes mais limitantes (FRANCO & FARIA, 1997). Segundo Marques et al. (2006), estudando diferentes fontes de N na produção de mudas de *Dalbergia nigra*, verificaram que a dose de 180 mg.dm^{-3} foi a que proporcionou melhor desenvolvimento e crescimento para a maioria das características estudadas. Considerando-se doses similares para a *P. rigida*, essa dose corresponde a quase metade da menor dose aqui utilizada, o que possivelmente se refletiria em uma menor diferença de desempenho entre as plantas inoculadas e adubadas. O resultado de melhor desempenho das plantas inoculadas em relação à testemunha absoluta, ressalta que mesmo tendo um desempenho menor que o testemunha nitrogenada, os tratamentos inoculados poderiam ser recomendados para uso no campo. Os resultados deste trabalho também apontam para a necessidade de se incluir um controle com doses de nitrogênio equivalentes àsquelas utilizadas no campo nos próximos experimentos, pois esse controle indicará como a inoculação se compara à realidade. A utilização de leguminosas florestais inoculadas com rizóbios em programas de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas é uma estratégia que contribui não só para a redução dos custos com a aplicação de N, mas também para o acúmulo de N nas áreas reflorestadas. O N fixado é acumulado na parte aérea das plantas e é depositado na superfície do solo por ocasião da queda de galhos e folhas, ajudando a recuperar a fertilidade do solo e a criar condições para o estabelecimento da sucessão vegetal (FRANCO & FARIA, 1997).

Conclusão

As estirpes BR 827 e BR 9004 foram competitivas e eficientes em fixar o nitrogênio e promover o crescimento da espécie *P. rigida*. A espécie respondeu significativamente à aplicação de N mineral quando este foi aplicado em doses altas.

Referências

CARNEIRO, Marco A. C.; SIQUEIRA, José O.; MOREIRA, Fátima M. S.; de CARVALHO, Dulcinéia; BOTELHO, Soraya A.; JUNIOR, Orivaldo S. J. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. **Cerne**, v. 4, n. 1, p. 129-145, 1998.

CARVALHO, Fernanda de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n. 2, p. 74-79, 2010.

FARIA, Sérgio M. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 10p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 116).



FRANCO, Avílio A., FARIA, Sérgio M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 897-903, 1997.

FRANCO, Avílio A.; CAMPELLO, Eduardo F.; DA SILVA Elaine M. R.; DE FARIA Sérgio M. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: Embrapa CNPDS, 8 p. 1992 (Embrapa. CNPDS. Comunicado Técnico, 9).

FRED, Edwin B.; WAKSMAN, Seldman A. **Laboratory Manual of General Microbiology with Special Reference to the Microorganisms of the Soil**. Mac-Graw-Hill book company, Inc.: New York, 1928. 145p.

GIOVANNETTI, Manuela; MOSSE, Barbara. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v.84, n.3, p.489-500, 1980.

GONÇALVES, Elzimar O.; PAIVA, Haroldo N.; NEVES, JULIO C. L.; GOMES José, M. Crescimento de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) sob diferentes doses de macronutrientes. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1029-1040, Dez 2008.

JESUS, Ederson C.; SCHIAVO, Jolimar A.; FARIA, Sérgio M. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 545–552, jul. 2005.

KOSKE, Richard E.; GEMMA, Jane N. A Modified Procedure for Staining Roots to Detect VA Mycorrhizas. **Mycological Research**, v.92, n.4, p486-505, 1989.

LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: *Editora Plantarum*, 1992.

MARQUES, Vanderleia B.; DE PAIVA, Haroldo N.; GOMES, José M.; NEVES, Júlio C. L.; BERNARDINO, Daíse C. de S. Efeito de fontes e doses de nitrogênio sobre o crescimento inicial e qualidade de mudas de jacarandá-da-baía (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex Benth.). **Revista Árvore**, v.30, n.5, 2006.

MOREIRA, Fátima M. de S.; SILVA, Krisle da; NÓBREGA, Rafaela S. A.; SIQUEIRA, José O., FRANCO, Avílio A. **Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 1988.