

Tab. Cost. 70/99
Pésq. And. 70/99

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Av. Beira-Mar 3.250, CP 44, CEP 49001-970 Aracaju SE
Fone (079) 217 1300 Fax (079) 231 9145 Telex 792318 EBPA
E-mail postmaster@cpatc.embrapa.br

PESQUISA EM ANDAMENTO

Nº 70, CPATC, junho/99, p.1-5

SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS DE TABULEIROS COSTEIROS DE SERGIPE COM ALTA CAPACIDADE DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO QUANDO ASSOCIADOS A GUANDU (*Cajanus cajan*)¹

Marcelo Ferreira Fernandes²

Roberta Pereira Miranda Fernandes³

Em estudos realizados anteriormente em área do ecossistema de tabuleiro costeiro observou-se que a inoculação de várias leguminosas com estirpes recomendadas para outras regiões do País falhou em incrementar o crescimento vegetal, os teores de N e a nodulação das plantas estudadas. Supõe-se que esta ausência de resposta à inoculação esteja relacionada à baixa adaptabilidade das estirpes utilizadas às condições de solos de tabuleiros costeiros ou à baixa capacidade de colonização radicular dessas estirpes quando em competição com a população rizobiana nativa. Assim, este estudo tem como objetivo isolar rizóbios nativos de tabuleiros costeiros, de modo a selecionar estirpes já adaptadas às condições locais e que apresentem alta capacidade de fixação biológica do N (FBN) quando associadas ao guandu.

Amostras de raízes noduladas de guandu (*Cajanus cajan*), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) foram coletadas em diferentes áreas de tabuleiro costeiro de Sergipe e transportadas sob baixa temperatura (4°C) até o laboratório, onde foram imediatamente processadas para a obtenção dos isolados de rizóbios. Após lavagem das raízes em água corrente foram retirados os nódulos, mantendo-se cerca de 0,5cm de raízes de ambos os lados destes. A superfície dos nódulos foi desinfetada para reduzir as populações de microrganismos externos e aumentar as possibilidades de isolamento de rizóbios em cultura pura. Para esta etapa de desinfecção, os nódulos foram imersos sequencialmente em etanol 70%, por 3 a 5 segundos, e em hipoclorito de sódio 6%, por 2 minutos, e enxaguados abundantemente em água estéril, para retirar o excesso do hipoclorito. Nódulos provenientes de uma mesma raiz foram transferidos, sob condições assépticas, para tubos de ensaio contendo 2ml de solução salina (NaCl 0,85%) estéril e macerados com a ajuda de um bastão de vidro, até que uma suspensão turva fosse obtida. A partir desta suspensão, procedeu-se a inoculação de placas de meio YEM com vermelho do Congo, utilizando-se técnica de estrias compostas. As placas foram incubadas no escuro por 3 dias a 28°C. As colônias com coloração esbranquiçada a ligeiramente rósea, típicas de rizóbios, foram transferidas novamente para placas de Petri contendo o mesmo meio e incubadas por mais 3 dias. Este procedimento foi realizado sucessivas

¹ Trabalho financiado pela Fundação Banco do Brasil.

² Eng.-Agr., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av Beira-Mar, 3250, Caixa Postal 44, CEP 49001-970, Aracaju, SE.

³ Professora Assistente do Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Cidade Universitária Professor José Aloísio Campos, s/n - Rosa Elze, CEP 49100-000, São Cristóvão, SE.



vezes, até que culturas puras fossem obtidas em cada placa. Observações de preparações microscópicas fixadas e coradas pela técnica de Gram e medições das dimensões celulares foram realizadas para melhor certificação de que as colônias isoladas eram de rizóbios. Foram obtidos 45 isolados de rizóbios das diferentes regiões e espécies de leguminosas. Até o momento, 16 estirpes foram testadas em experimento de casa de vegetação, utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições. Quatro tratamentos adicionais sem inoculação e com adição de doses crescentes de N foram incluídos. Utilizaram-se vasos de Leonard com capacidade de 1 litro em cada um dos compartimentos. Nos vasos dos tratamentos inoculados com rizóbios e nos da testemunha absoluta (sem inoculação e sem adição de N mineral), o compartimento superior foi preenchido com vermiculita contendo teores desprezíveis de N e o inferior, com solução nutritiva livre deste nutriente. O compartimento superior dos tratamentos com N mineral foi preenchido com o mesmo substrato, ao passo que o inferior recebeu a mesma solução nutritiva, porém acrescida de nitrato de amônio nas concentrações equivalentes a 50mg, 100mg ou 150mg N L⁻¹. Três sementes de guandu desinfectadas superficialmente por imersão em hipoclorito de sódio 6% e enxaguê com água estéril foram plantadas por vaso. Após uma semana do plantio foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma planta por vaso. A inoculação com as estirpes isoladas de rizóbios foi feita no momento de plantio das sementes, utilizando-se 3ml de suspensões de rizóbios. As suspensões foram obtidas após o crescimento dos isolados por 48 h em 50ml de meio YEM líquido, sob agitação constante de 150 rpm e temperatura de 28°C. Para padronizar o inóculo adicionado aos vasos, as culturas líquidas foram centrifugadas por 3 minutos a 4.000 rpm e ressuspendidas em NaCl (0,85%) por 3 vezes, de modo a remover a cápsula polissacarídica produzida pelas culturas. Após estas centrifugações, foi realizado o ajuste dos volumes finais das culturas com solução salina para se obter uma densidade óptica de valor 1,0 em um comprimento de onda de 600 nm. Os vasos dos tratamentos não inoculados receberam 3ml de uma suspensão padronizada de rizóbio, porém autoclavada anteriormente por 30 minutos a 121°C. Os compartimentos inferiores dos vasos de Leonard foram completados a cada três dias com a solução nutritiva pertinente a cada tratamento. O experimento foi coletado 60 dias após o plantio das sementes. As plantas foram cortadas na altura do nó cotiledonar e a seiva xilemática exsudada na região do corte foi coletada por 30 minutos em tubos tipo Eppendorf com o auxílio de pipetas e acondicionada a 0°C. Os teores de N-ureídeos e N-total da seiva serão determinados para estimar a eficiência de FBN de cada rizóbio na época do corte pela utilização da equação: Eficiência de FBN = teor N-ureídeo/teor N-total. A superfície foliar das plantas de guandu foi determinada utilizando-se um aparelho Li-Cor. A matéria seca total da parte aérea foi determinada posteriormente, após secagem do material em estufa de circulação forçada a 65°C por 72 horas.

Das 16 estirpes de rizóbios nativos testados neste ensaio, R1, R8 e R11 foram as três que mais se destacaram quanto à capacidade de nodulação (Figura 1), área foliar (Figura 2) e matéria seca da parte aérea (Figura 3), sendo selecionadas para estudos posteriores em condição de campo. Observou-se que a capacidade de nodulação das estirpes testadas apresentou alta correlação com o incremento do crescimento vegetal, tanto em termos de matéria seca de parte aérea quanto de área foliar (Figura 4).

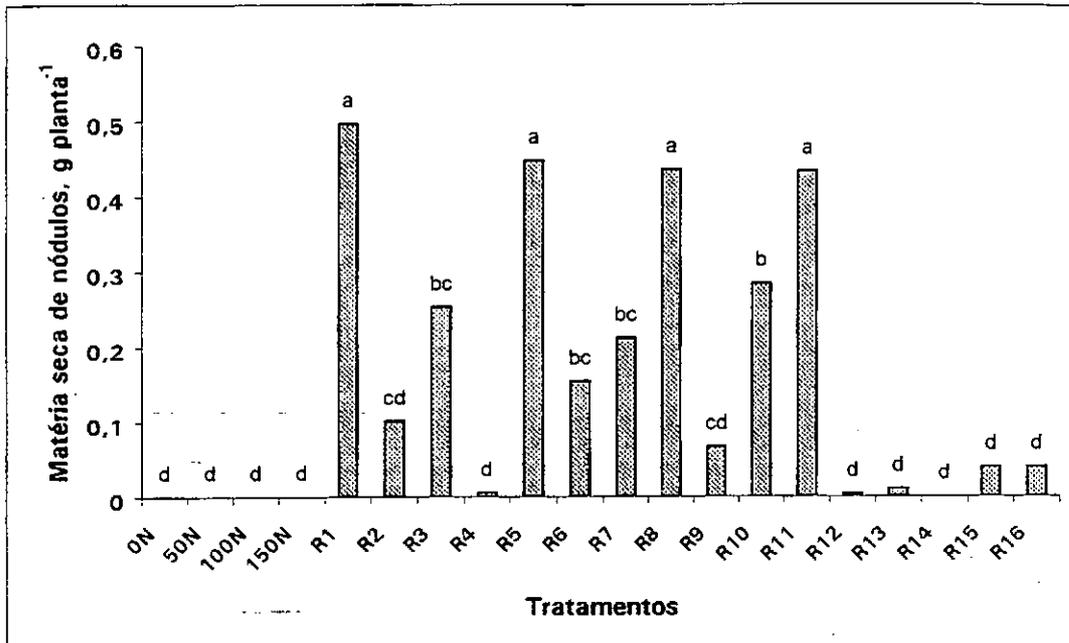


Figura 1. Produção de matéria seca de nódulos (g planta⁻¹) em guandú (*Cajanus cajan*) submetido a diferentes doses de N ou à inoculação com diferentes isolados de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros (R1 a R16).

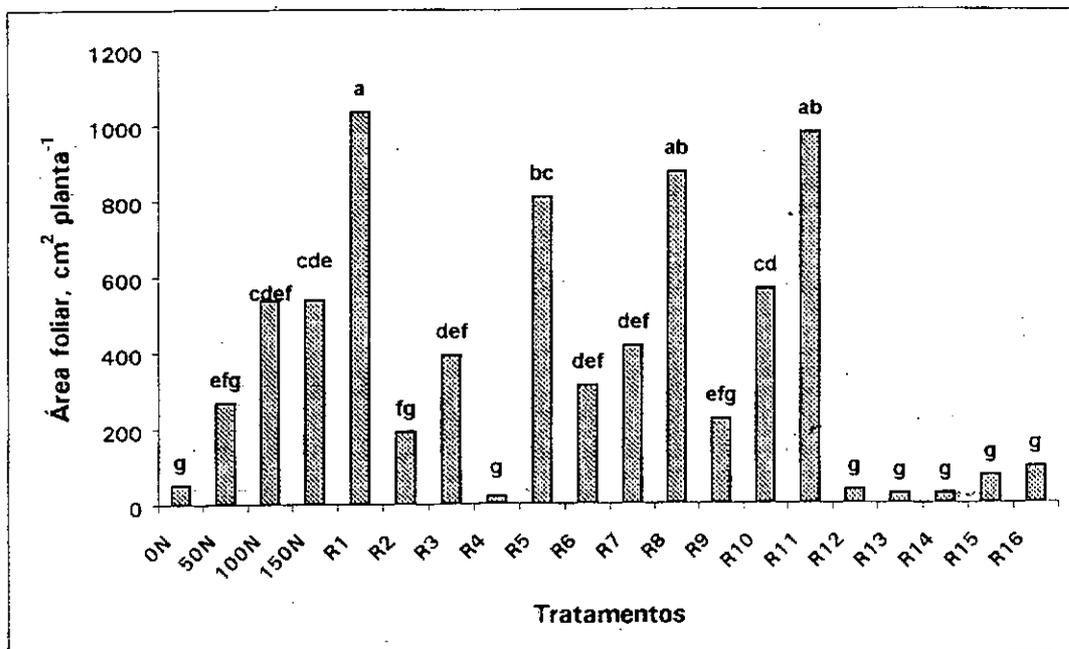


Figura 2. Área foliar (cm² planta⁻¹) de guandú (*Cajanus cajan*) submetido a diferentes doses de N ou à inoculação com diferentes isolados de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros (R1 a R16).

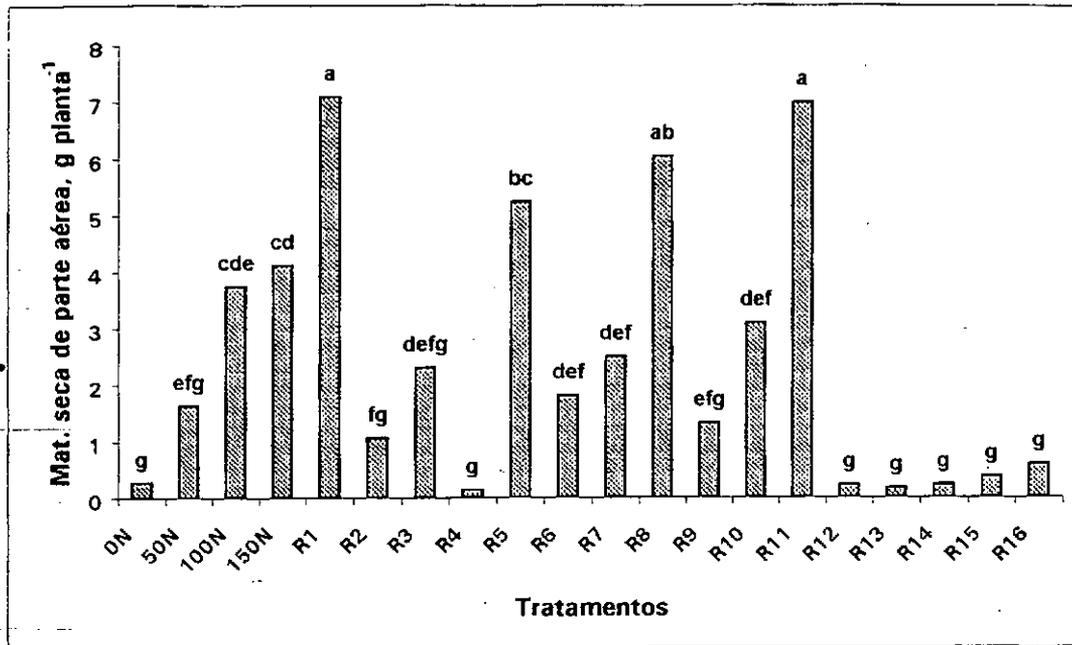


Figura 3. Produção de matéria seca de parte aérea (g planta⁻¹) de guandú (*Cajanus cajan*) submetido a diferentes doses de N ou à inoculação com diferentes isolados de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros (R1 a R16).

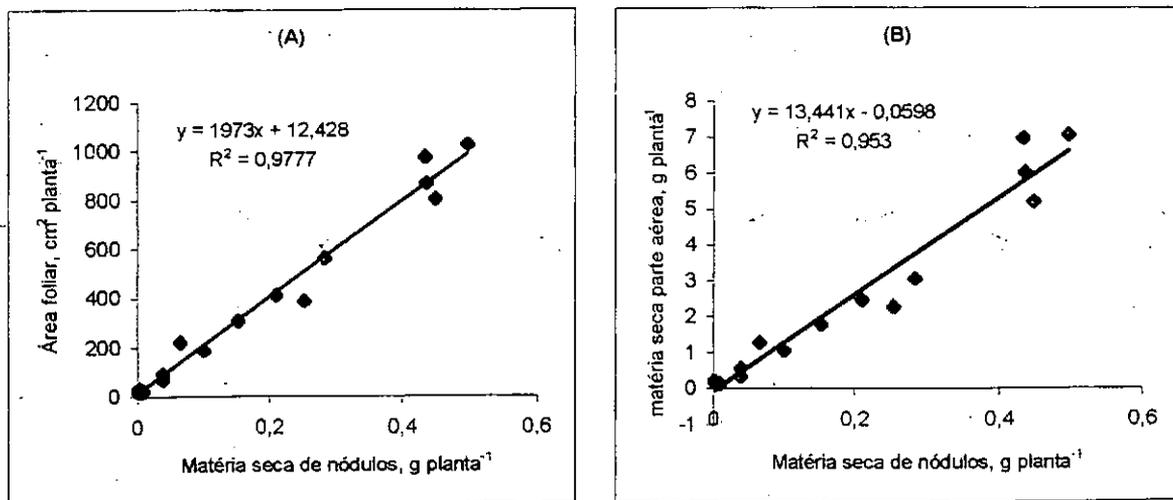


Figura 4. Correlação entre a matéria seca de nódulos com variáveis de crescimento (a) área foliar e (b) matéria seca de parte aérea de guandú (*Cajanus cajan*).

Obs: Os dados dos tratamentos não inoculados não foram plotados nesta análise.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Assistente de Pesquisa *Jadson Alves Nascimento* e aos estagiários *Carlos Aurélio Alves Oliveira* e *Hosanaide Batista dos Santos* pelo apoio dado na condução dos experimentos de casa-de-vegetação e na realização das análises laboratoriais.