

Identificação de Bactérias Eficientes na Fixação Biológica de Nitrogênio para Espécies Leguminosas Arbóreas



República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Marcus Vinícius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

Márcio Fontes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast

José Honório Accarini

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor Presidente

Bonifácio Hideyuki Nakasu

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Diretores Executivos

Embrapa Agrobiologia

Maria Cristina Prata Neves
Chefe Geral

José Ivo Baldani

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Geraldo Baêta da Cruz
Chefe Adjunto Administrativo

Tabela 1. Continuação

Espécies	Base de recomendação ¹	Nº de estirpes testadas	Estirpes recomendadas	Eficiência ²	Eficácia ³
<i>Poecillante parviflora</i>	II	9	BR 8202	92	48
			BR 8206	103	54
<i>Prosopis chilensis</i>	III	51	BR 4007	92	21
			BR 4017	96	22
<i>Prosopis juliflora</i>	II	7	BR 4007	123	100
			BR 3615	117	95
<i>Pterocarpus erinacens</i>	II	50	BR 4406	227	130
			BR 3609	229	131
<i>Pterocarpus indicus</i>	II	3	BR 8651	165	74
			BR 8652	136	62
<i>Pterocarpus lucens</i>	II	3	BR 8653	183	108
			BR 8651	131	77
<i>Samanea samam</i>	II	41	BR 6208	105	69
			BR 6204	103	68
<i>Sclerobium paniculatum</i>	III	45	BR 3617	127	40
			BR 8402	103	33
<i>Sesbania exasperata</i>	III	45	BR 5411	131	88
			BR 5429	127	85
<i>Sesbania virgata</i>	III	16	BR 5412	212	81
			BR 5401	208	80
<i>Stryphonodendron guianenses</i>	III	5	BR 8801	100	23
			BR 3608	93	22
<i>Tephrosia sinapou</i>	II	53	BR 5610	1863	153
			BR 5301	1742	143

¹ II- Vasos esterilizados; III- Vasos com solo sem esterilização;

²Eficiência = 100.(Biomassa seca da estirpe/Biomassa seca do controle sem N e sem inoculação);

³Eficácia = 100.(Biomassa seca de cada estirpe/Biomassa seca do controle com N);



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

ISSN 1517-8498

Outubro/2002

Documentos 158

Identificação de Bactérias Eficientes na Fixação Biológica de Nitrogênio para Espécies Leguminosas Arbóreas

Sérgio Miana de Faria
Avílio Antônio Franco

Seropédica – RJ

2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 47

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: José Ivo Baldani (Presidente)
 José Antônio Ramos Pereira
 Marcelo Grandi Teixeira
 Robert Michael Boddey
 Segundo Sacramento Urquiaga Caballero
 Verônica Massena Reis
 Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Rosângela Stralio

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2002): 50 exemplares

FARIA, S. M. de; FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 158).

ISSN 1517-8498

1. Árvores. 2. Leguminosa florestal. 3. Bactéria. 4. FBN. I. Franco, A. A., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. V. Série.

CDD 582.16

© Embrapa 2002

Tabela 1. Continuação

Espécies	Base de recomendação ¹	Nº de estirpes testadas	Estirpes recomendadas	Eficiência ²	Eficácia ³
<i>Lonchocarpus constatus</i>	II	6	BR 6010	219	53
			BR 6009	209	50
<i>Mimosa acutistipula</i>	II	4	BR 3429	20280	150
			BR 3432	22820	169
<i>Mimosa artemisiana</i>	III	43	BR 3462	145	40
			BR 3609	111	31
<i>Mimosa bimucronata</i>	III	6	BR 3461	95	81
			BR 3470	99	85
<i>Mimosa camporum</i>	II	53	BR 3466	14900	59
			BR 3469	16623	66
<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	III	14	BR 3407	731	123
			BR 3446	742	125
<i>Mimosa flocculosa</i>	III	5	BR 3454	102	107
			BR 3464	101	105
<i>Mimosa pellita</i>	III	49	BR 3467	113	98
			BR 3462	96	82
<i>Mimosa scabrella</i>	III	5	BR 3454	111	38
			BR 3437	119	40
<i>Mimosa tenuiflora</i>	III	47	BR 3405	120	70
			BR 3462	97	57
<i>Ormosia nitida</i>	II	11	BR 4101	107	38
			BR 4103	111	39
<i>Parapiptadenia pterosperma</i>	II	9	BR 9004	168	25
			BR 9003	139	21
<i>Parapiptadenia rigida</i>	II	48	BR 827	164	72
			BR 9002	171	74
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	III	12	BR 4812	179	81
			BR 4802	146	66

Tabela 1. Continuação

Espécies	Base de recomendação ¹	Nº de estirpes testadas	Estirpes recomendadas	Eficiência ²	Eficácia ³
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	II	41	BR 6205	429	128
			BR 4406	520	155
<i>Erythrina falcata</i>	II	47	BR 3611	314	65
			BR 5609	438	90
<i>Erythrina fusca</i>	III	47	BR 5609	122	94
			BR 3628	117	91
<i>Erythrina speciosa</i>	II	34	BR 3609	230	66
			BR 8205	218	63
<i>Erythrina variegata</i>	III	40	BR 96	106	103
			BR 3611	104	101
<i>Erythrina verna</i>	III	53	BR 5609	126	77
			BR 3611	151	92
<i>Gliricidia sepium</i>	III	8	BR 8801	94	66
			BR 8803	99	69
<i>Goldmania paraguensis</i>	II	54	BR 4701	635	17
			BR 6205	669	18
<i>Hydrochorea corymbosa</i>	II	52	BR 5004	1234	73
			BR 6822	1163	69
<i>Inga marginata</i>	III	48	BR 6609	158	66
			BR 6610	134	56
<i>Inga thibaudiana</i>	II	48	BR 5609	515	49
			BR 6610	649	62
<i>Leucaena diversifolia</i>	III	40	BR 3608	124	29
			BR 8801	127	29
<i>Leucaena leucocephala</i>	III	27	BR 827	168	94
			BR 825	156	87

Autores

Sérgio Miana de Faria, PhD

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505,
Cep: 23851-970 – Seropédica/RJ

Avílio Antônio Franco, PhD

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505,
Cep: 23851-970 – Seropédica/RJ

Tabela 1. Continuação

Espécies	Base de recomendação ¹	Nº de estirpes testadas	Estirpes recomendadas	Eficiência ²	Eficácia ³
<i>Albizia procera</i>	III	48	BR 6205	181	116
			BR 5609	150	96
<i>Ateleia glazioviana</i>	III	5	BR 6903	120	93
			BR 5004	120	92
<i>Balizia pedicellaris</i>	II	9	BR 6815	1167	15
			BR 6816	1000	13
<i>Bowdichia virgilioides</i>	III	8	BR 8603	60	43
			BR 8604	53	38
<i>Calliandra surinamensis</i>	III	7	BR 4302	96	42
			BR 4303	100	43
<i>Calliandra macrocalyx</i>	II	43	BR 4305	241	30
			BR 4306	224	28
<i>Chamaecrista ensiformis</i>	II	8	BR 3804	242	7
			---	---	---
<i>Chamaecrista flexuosa</i>	III	68	BR 3808	179	86
			BR 3809	165	79
<i>Clitoria fairchildiana</i>	III	11	BR 8007	117	76
			BR 8003	117	76
<i>Dalbergia nigra</i>	III	20	BR 8401	177	57
			BR 8409	169	55
<i>Dimorphandra exaltada</i>	II	15	BR 5004	113	55
			BR 5005	112	55
<i>Diphysa robinoides</i>	III	48	BR 5004	93	92
			BR 8601	99	98
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	III	16	BR 4406	120	91
			BR 4407	118	83

Tabela 1. Continuação

Espécies	Base de recomendação ¹	Nº de estirpes testadas	Estirpes recomendadas	Eficiência ²	Eficácia ³
<i>Acacia holosericea</i>	III	49	BR 5608	150	98
			BR 4406	130	85
<i>Acacia mangium</i>	III	48	BR 3609T	422	73
			BR 6009	220	38
<i>Acacia mearnsii</i>	II	11	BR 3608	304	101
			BR 3614	275	91
<i>Acacia melanoxylon</i>	III	48	BR 3635	142	22
			BR 3633	139	21
<i>Acacia padalyriifolia</i>	II	4	BR3611	314	83
			---	---	---
<i>Acacia salicina</i>	III	7	BR 5005	89	61
			BR 3804	90	62
<i>Acacia saligna</i>	II	48	BR 8601	3840	251
			BR 3628	2777	181
<i>Acosmium bijugum</i>	II	38	BR 827	---	22
			BR 8205	---	20
<i>Acosmium nitens</i>	III	10	BR 4901	468	157
			BR 4902	341	114
<i>Aeschynomene sensitiva</i>	II	48	BR 6610	1334	1150
			BR 9002	1403	1210
<i>Pseudosamanea guachapele</i>	III	10	BR 6205	111	82
			BR 6821	110	81
<i>Falcataria mollucana</i>	III	13	BR 5609	453	42
			BR 5612	461	42
<i>Albizia lebbek</i>	II	13	BR 5611	600	117
			BR 6610	478	93

Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoque ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

A agricultura sustentável, produtiva e ambientalmente equilibrada apoia-se em práticas conservacionistas de preparo do solo, rotações de culturas e consórcios, no uso de adubação verde e de controle biológico de pragas, bem como no emprego eficiente dos recursos naturais. Infere-se daí que os processos biológicos que ocorrem no sistema solo/planta, efetivados por microrganismos e pequenos invertebrados, constituem a base sobre a qual a agricultura agroecológica se sustenta.

O documento 158 faz parte do esforço no sentido de divulgar metodologia para identificação de bactérias fixadoras de nitrogênio eficientes que possam vir a ser usadas na inoculação de leguminosas arbóreas de modo a eliminar ou diminuir o uso de fertilizantes nitrogenados.

Os estudos que embasam as recomendações descritas no documento tiveram o apoio financeiro do CNPq e o apoio técnico do Sr. Carlos Alberto Vasconcelos a quem os autores agradecem.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	07
2- OBTENÇÃO DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO.....	07
3- ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	08
4- SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EM CONDIÇÕES CONTROLADAS.....	08
5- SELEÇÃO DE ESTIRPES EM VASOS COM SOLO NÃO ESTERILIZADO.....	09
6- CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	09
7- RESULTADOS.....	10
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS	11
9- ANEXO.....	11

eficácia está em torno de 100%, como em *Acacia mearnsii*, *Albizia lebbek*, *A. procera*, *Ateleia glazioviana*, *Leucaena leucocephala* etc. indicam que a simbiose com as estirpes testadas foram capazes de fornecer nitrogênio dentro do potencial máximo de crescimento das espécies.

8. Referências Bibliográficas

FARIA, S. M. de; FRANCO, A. A.; JESUS, R. M.; BAITELLO, J. B.; MUCCI, E. S. F.; SPRENT, J. I. New nodulating legume trees from South-East Brazil. **New Phytologist**, Oxford, v.98, p.317-328, 1984.

FARIA, S. M. de; LEWIS, G. P.; SPRENT, J. I.; SUTHERLAND, J. M. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist**, Oxford, v.111, p.607-619, 1989.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in Legume-Rhizobium Technology**. Hawaii: NifTAL, 1985. 367p.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p. (International Biological Programme, 15).

9. Anexo

Tabela 1. Estirpes de rizóbio recomendadas para espécies florestais pela Embrapa Agrobiologia

Espécies	Base de recomendação ¹	Nº de estirpes testadas	Estirpes recomendadas	Eficiência ²	Eficácia ³
<i>Acacia angustissima</i>	III	53	BR 10049	131	76
			BR 3616	128	74
<i>Acacia auriculiformis</i>	III	8	BR 3465	185	36
			BR 3609	207	40
<i>Acacia crassicarpa</i>	III	49	BR 3636	119	40
			BR 9002	100	34
<i>Acacia farnesiana</i>	III	50	BR 3630	160	62
			BR 9002	103	40

multiplicando por 100 a taxa da biomassa seca de cada tratamento pelo controle que recebeu nitrogênio semanalmente. Este índice mostra a capacidade de cada isolado em fornecer nitrogênio à planta em comparação com a mesma espécie crescendo sem restrição de nitrogênio.

7. Resultados

Nem todas as estirpes testadas, nos mais de 100 experimentos, nodularam e em muitos casos os nódulos produzidos não foram eficientes. Na tabela 1 são apresentados, de forma resumida, os resultados de seleção de estirpes para 69 espécies arbóreas realizadas na Embrapa Agrobiologia. São apresentados somente os índices de eficiência e de eficácia das duas estirpes de rizóbio que mais se destacaram nos experimentos com base de recomendação II, se o experimento foi realizado em vasos esterilizados ou III se os resultados foram de experimento com solo. A lista de estirpes de rizóbio contidas na tabela 1 constitui a base de recomendação de estirpes da Embrapa Agrobiologia e para produção de inoculantes para atendimento aos diversos clientes. Serve ainda como orientação para levantamento da necessidade de busca de novas estirpes, para o caso de mesmo tendo estirpes eficientes como no caso de *Acacia melanoxylon*, *Acosmium bijugum* etc., estas estão ainda muito abaixo do potencial das espécies, fornecendo N para crescimento de aproximadamente 20% do potencial de crescimento da espécie, podendo ainda indicar o potencial máximo da simbiose para a espécie. Além disso, nos casos em que a eficácia foi muito superior a 100%, como em *Acacia saligna*, *Aeschynomene sensitiva* etc. os dados indicam que há necessidade de ajustamento de como os experimentos estão sendo conduzidos, especialmente nos experimentos em vasos esterilizados. Por outro lado, nos casos em que a

Obtenção de inoculantes eficientes para Fixação Biológica de Nitrogênio em espécies leguminosas arbóreas

Sérgio Miana de Faria
Avílio Antônio Franco

1. Introdução

A maioria das espécies de leguminosas é capaz de se associar simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio de vários gêneros de bactérias diazotróficas aqui denominadas coletivamente de rizóbio. A família Leguminosae compreende em torno de 20.000 espécies. No território brasileiro são encontradas aproximadamente 2.500 destas espécies, sendo a maioria de porte arbóreo ou arbustivo. Para se obter estirpes de rizóbio capazes de nodular e eficientes na fixação biológica de nitrogênio para cada espécie arbórea várias etapas são necessárias: verificação da capacidade de nodulação da espécie; coleta dos nódulos, isolamento das bactérias; purificação das colônias; seleção das estirpes mais eficientes em vasos com substrato esterilizado e finalmente em vasos com solo não esterilizado.

2. Obtenção das estirpes de rizóbio

A obtenção das estirpes é feita através da coleta de nódulos de plantas da espécie crescendo em seu habitat natural. Uma vez localizada a espécie desejada, preferencialmente de planta jovem, faz-se a escavação do entorno do sistema radicular. Encontrados os nódulos, estes são identificados e armazenados em frascos hermeticamente fechados contendo cloreto de cálcio anidro sobreposto com uma camada de algodão (Faria et al., 1989). Com

este procedimento os nódulos são desidratados e as bactérias são preservadas até o momento do isolamento. Outra forma de se obter rizóbio eficiente é através da inoculação de várias estirpes, isoladas de espécies vegetais taxonomicamente próximas a espécie alvo, elegendo os nódulos com alta atividade de redução de acetileno para isolamento das bactérias (Faria et al., 1984).

3. Isolamento e purificação das bactérias

O isolamento e purificação das bactérias devem ser feitos preferencialmente em condições controladas de laboratório utilizando capelas de fluxo laminar. Inicialmente os nódulos são rehidratados em água esterilizada, tratados por 30 segundos com álcool etílico anidro, em seguida em água oxigenada por 4 minutos e lavados 8 vezes em água esterilizada. Com uma pinça, aproveitando a última água de lavagem, cada nódulo é esmagado e a suspensão que fica na ponta da pinça, após o esmagamento, é riscada em placa contendo meio de cultura extrato de levedura com manitol (Vincent, 1970). Após 3 a 11 dias de incubação à 30°C, usando uma alça de platina, a massa de bactérias formadas sobre o meio é novamente riscada no mesmo meio de cultura para obtenção de colônias isoladas. Cada cultura que irá constituir uma estirpe deve ser proveniente de uma colônia isolada da bactéria. Mais detalhes sobre isolamento e purificação de rizóbio consultar Vincent (1970) ou Somasegaran & Hoben (1985).

4. Seleção de estirpes de rizóbio em condições controladas

A seleção de estirpes de rizóbio em condições controladas é realizada em casa de vegetação em vasos contendo uma mistura de areia:vermiculita (2:1) (v:v) e solução nutritiva completa menos nitrogênio, ambos esterilizados (Vincent, 1970). Nestas condições pode-se identificar se o isolado nodula, é eficiente e até separar isolados por grau de eficiência dos mesmos. Cada isolado é testado individualmente sendo ainda adicionados dois controles: um sem inoculação e sem adubação com nitrogênio mineral e outro sem

inoculação mas com adubação mineral. No controle com N, na maioria das espécies, são adicionados 10 mg de N por planta toda semana podendo, entretanto, variar esta quantidade para manter o crescimento da espécie no seu potencial máximo de crescimento. Os experimentos são instalados em blocos ao acaso com 3 a 4 repetições, dependendo do número de isolados a serem testados e da disponibilidade de sementes de cada espécie. Ao atingirem 30 a 40 cm de altura as plantas são colhidas e avaliadas a biomassa seca da parte aérea e dos nódulos.

5. Seleção de estirpes em vasos com solo não esterilizado

Os isolados que mais se destacaram na fase anterior são testados em vasos contendo solo não esterilizado. Os experimentos com espécies arbóreas, na Embrapa Agrobiologia, tem sido conduzidos com argissolo ácido (pH 5,0) com correção de P, K e micronutrientes, porém sem calagem já que as espécies leguminosas arbóreas tropicais são geralmente tolerantes à acidez e nessas condições se busca simbiose eficiente. Os experimentos são conduzidos em delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições incluindo os dois controles e as mesmas avaliações indicadas no item 4.

6. Critérios de avaliação e análises estatísticas

Os resultados de cada experimento são submetidos a análise de variância e o teste T ($P \geq 0,05$) para as comparações. Além disso com a biomassa seca calcula-se um índice de eficiência e outro de eficácia para cada estirpe. A eficiência é calculada multiplicando por 100 a taxa da biomassa seca de cada tratamento pelo controle sem inoculação ou adição de N. Este índice mostra se o isolado é eficiente em fixar nitrogênio com a espécie testada e mesmo diferenciar graus de eficiência entre os diferentes isolados. A eficácia é calculada