

AGR-09

AVALIAÇÃO DA HABILIDADE NODULÍFERA DE ISOLADOS BACTERIANOS DA COLEÇÃO DE RIZÓBIOS DO INPA, EM CULTIVOS MONO-AXÊNICOS.

Maria Terezinha Ferreira Monteiro⁽¹⁾; Luiz Augusto Gomes de Souza⁽²⁾
Bolsista CNPq/PIBIC⁽¹⁾; Pesquisador INPA/CPCA⁽²⁾

Os estudos efetuados sobre a fixação biológica de nitrogênio – FBN, entre rizóbios e leguminosas, exigem a formação de coleções de rizóbios, para identificar num grupo heterogêneo de estirpes aquelas de alta eficiência fixadora de N₂, que possam ser utilizadas como inoculante das leguminosas cultivadas de interesse econômico. O teste de cultivo “mono-axênico” é um teste de rotina utilizado em laboratórios de rizobiologia para a confirmação de isolados bacterianos de nódulos e na rotina de avaliação e controle de qualidade de inoculantes. Para que uma dada bactéria possa ser confirmada como rizóbio, esta deve ser capaz de induzir a formação de nódulos radiculares na leguminosa de origem ou em um hospedeiro potencialmente promíscuo, em condições axênicas.

O INPA/CPCA, possui uma coleção de rizóbios para uso agrícola, formada a partir de nódulos obtidos na região amazônica, que tem sido avaliada para identificar leguminosas nativas com potencial de cultivo, e que apresentem taxas elevadas de fixação de N₂, tornando-as potenciais para contribuir na sustentabilidade em nitrogênio, nos sistemas de produção regional (Souza *et al.*, 1997). Este estudo foi efetuado com o objetivo de confirmar a habilidade nodulífera de isolados bacterianos da coleção de rizóbios do INPA, submetendo-os ao teste de cultivo mono-axênico.

Foi conduzido um experimento em tubos de ensaio utilizando-se a leguminosa enxada verde (*Calopogonium mucunoides* Desf.) como planta teste. Como substrato de crescimento das plantas utilizou-se a solução nutritiva de Jensen, pH 6.5, distribuída de forma inclinada nos tubos após a autoclavagem. Os passos metodológicos empregados na técnica experimental adotada neste estudo estão apresentados na Figura 1, e são uma adaptação de Vincent, (1970). A escarificação das sementes foi efetuada pela embebição destas por dez minutos em H₂SO₄ concentrado, seguida da esterilização com álcool e HgCl₂ por 2 minutos cada, sendo posteriormente submetidas a lavagens em água corrente. Após uma hora de embebição em água, as sementes foram distribuídas em placas de Petri com agar (1,5%) e encubadas à 26°C por dois dias. Posteriormente, as sementes pré germinadas, que apresentavam 1,5 cm de radícula nesta fase, foram repicadas para a superfície dos tubos

conforme demonstrado na Figura 1.

Quinze tratamentos foram empregados neste ensaio: T-1 - Testemunha (plantas não inoculadas e não adubadas com N mineral); T-2 - Plantas não inoculadas que receberam água enriquecida com KNO_3 (1%); T-3 até T-15 - Inoculação com isolados bacterianos de nódulos. Neste experimento, foram testados 8 isolados obtidos de mulungu da mata (*Ormosia nobilis* Tul.) e cinco de fava tamboril (*Enterolobium maximum* Ducke), cuja identificação de isolamento foi: ON1, ON2, ON4, ON5, ON6, ON7, ON9, F2, F4, F5, F8 e F10, respectivamente. A inoculação das plantas com os isolados foi feita com o auxílio de uma alça de platina, através de um furo, posteriormente vedado com tampa de borracha (Figura 1). Aos 60 dias após a inoculação as plantas foram colhidas, separadas em parte aérea e raiz, pesadas após a secagem, e os nódulos presentes foram contados e pesados. A secagem foi feita em estufa à 65°C por 72 horas. Considerou-se como rizóbio a estirpe capaz de induzir nodulação em mais de uma planta. Para efetuar comparações entre tratamentos foi utilizado um delineamento experimental inteiramente ao acaso, composto por 15 tratamentos e 2 repetições. As comparações entre médias foram feitas pelo teste de Duncan a 1% de probabilidade. Para efeito de análise, os dados do número de nódulos foram transformados para raiz de $x + 1$.

Aos sessenta dias de desenvolvimento, as plantas encontravam-se com quatro pares de folhas definitivas, havendo formação e desenvolvimento nodular nos tratamentos onde empregou-se inoculação (Tabela 1). Nos tratamentos controles (com e sem adubação com KNO_3), não foram verificados nódulos, revelando ausência de contaminação cruzada. Os isolados bacterianos de nódulos obtidos das duas espécies hospedeiras aqui avaliadas foram compatíveis com *C. mucunoides*, a planta teste adotada. Do total de 13 estirpes inoculadas neste experimento, 76,9% foram confirmadas como rizóbios (dez estirpes). Para mulungu da mata, de oito estirpes inoculadas, seis foram confirmadas (ON1, ON4, ON5, ON6, ON8 e ON9), e para fava tamboril de cinco estirpes inoculadas quatro foram confirmadas (F2, F4, F5 e F10), conforme pode ser verificado na Tabela 1. O número de nódulo entre plantas variou entre zero e sete, as estirpes ON6 e F2, destacaram-se por apresentar uma maior média de nódulos que as demais. Observou-se um maior desenvolvimento aéreo das plantas, do que radicular, verificou-se que a biomassa aérea variou de 9 a 20 mg/planta. Neste sistema de cultivo o desenvolvimento radicular foi pouco acentuado. As plantas inoculadas com as estirpes ON2, ON9, F4, F5 e F10, apresentaram média de parte aérea seca igual ou superior ao das plantas que receberam KNO_3 .

Tabela 01. Efeito da inoculação de isolados bacterianos de nódulos em plântulas de enxada verde (*Calopogonium mucunoides*) conduzidas em cultivos mono-axênicos, aos 60 dias.

Tratamento	Hospedeiros	Peso Seco (mg)		Nº de Nódulos	Confirmação da Nodulação
		Parte Aérea	Raiz		
Testemunha	-	12	1	0 e	(-)
Adubação com N	-	14	1	0 e	(-)
ON ₁	<i>Ormosia nobilis</i>	12	1	5 ab	(+)
ON ₂	<i>Ormosia nobilis</i>	16	1	0 e	(-)
ON ₄	<i>Ormosia nobilis</i>	9	1	1 bcd	(+)
ON ₅	<i>Ormosia nobilis</i>	13	2	1 bcd	(+)
ON ₆	<i>Ormosia nobilis</i>	13	1	7 a	(+)
ON ₇	<i>Ormosia nobilis</i>	13	1	0 e	(-)
ON ₈	<i>Ormosia nobilis</i>	13	2	5 ab	(+)
ON ₉	<i>Ormosia nobilis</i>	14	1	2 abcd	(+)
F ₂	<i>Enterolobium maximum</i>	12	1	7 a	(+)
F ₄	<i>Enterolobium maximum</i>	20	1	3 abcd	(+)
F ₅	<i>Enterolobium maximum</i>	19	1	6 ab	(+)
F ₈	<i>Enterolobium maximum</i>	12	1	0 e	(-)
F ₁₀	<i>Enterolobium maximum</i>	16	1	4 abc	(+)
Coef. de var. (%)		32,56	17,67	54,53	
Teste de F		0,84 n.s	1,00 n.s	4,80**	

n.s = Não significativo

A classificação de microrganismos do solo é complexa e muitas vezes determinada por suas características culturais, microscópicas, metabólicas, bioquímicas, químicas, antigênicas e genéticas (Pelczar *et al.* 1980). Os “rizóbios” são assim classificados por sua capacidade funcional de induzir a formação de nódulos em leguminosas. Desse modo os testes feitos em cultivos mono-axênicos tornam-se indispensáveis em laboratórios de rizobiologia. Este experimento demonstrou que a metodologia adotada foi adequada, quando selecionou-se *C. mucunoides* como planta teste.

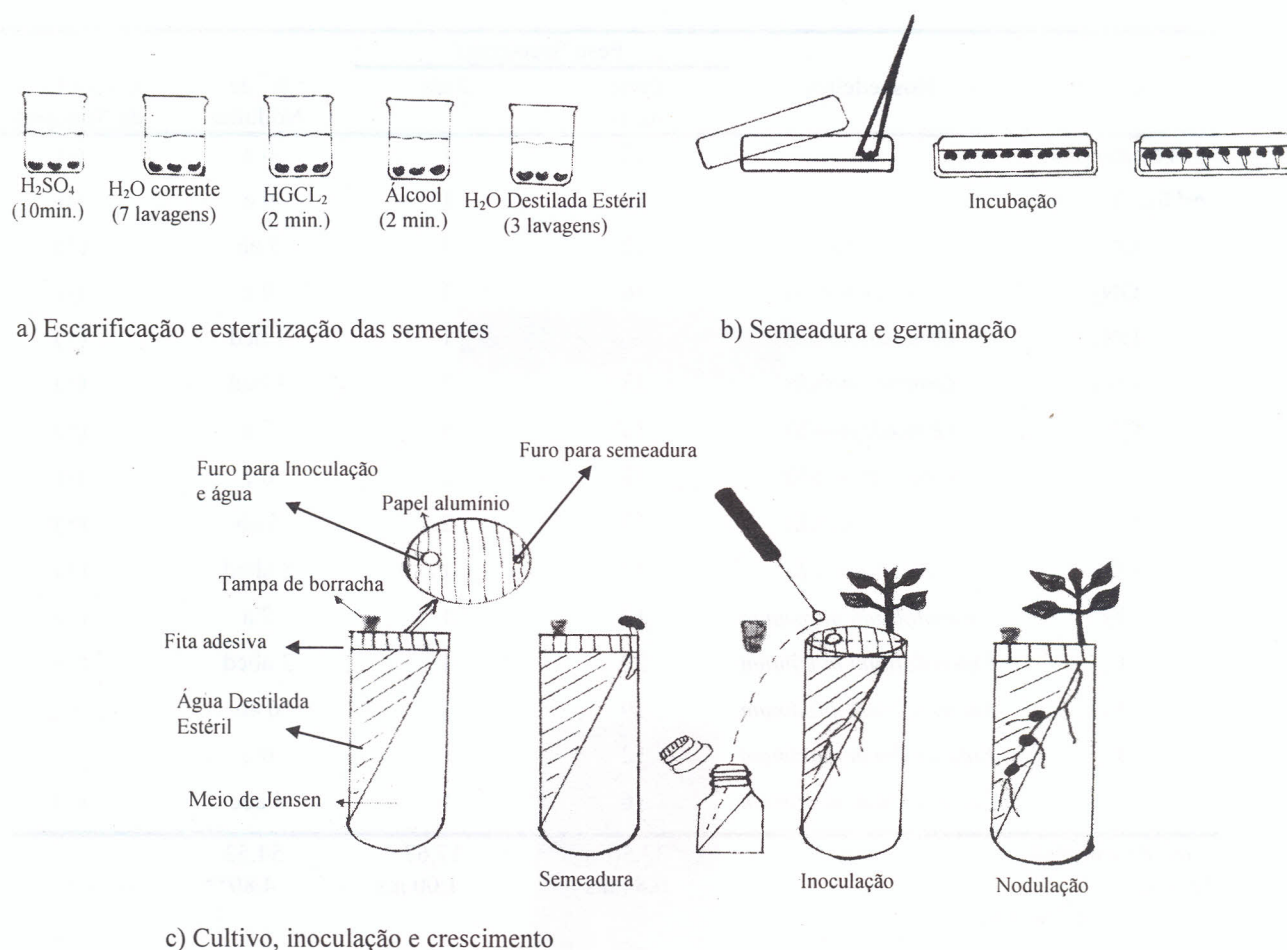


Figura 1. Passos metodológicos empregados na técnica de cultivos mono-axênicos utilizando-se uma leguminosa como planta teste.

Pelczar, M.; Reid, R.; & Chan, E.C.S. 1980. Microbiologia, São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, v. 1, 566p.

Souza, L.A.G.; Silva, M.F. & Moreira, F.M.S. 1997. Associações rizóbios-arbóreas na Amazônia. In: Duas décadas de contribuição do INPA à Pesquisa Agronômica no Trópico Úmido. NODA, H.; SOUZA, L.A.G. & FONSECA, O.J.M. (Ed.). INPA, Manaus, p. 193-219.

Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP, Handbook 15, Blackwells, Oxford.