

OCORRÊNCIA E CARACTERÍSTICAS SIMBIÓTICAS DE *Azorhizobium doebereinae* NO SOLO

Ana Paula P. NUNES¹; Gustavo A. A. JUNQUEIRA¹; Mariana C. SPINELI²; Cássia C. B. MIRANDA³; José R. MANTOVANI⁴; José Messias MIRANDA⁴; Ligiane A. FLORENTINO⁴

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da saturação de bases (V%) no estabelecimento da simbiose entre *Azorhizobium doebereinae* e *Sesbania virgata* e na ocorrência desta bactéria no solo. Foi utilizado um solo com diferentes valores de V%: 22, 30, 40, 50, 60 e 70%. O experimento foi desenvolvido em vasos, sendo a metade destes cultivados com *S. virgata* e o restante mantidos sem a planta, visando verificar se o aumento em V% favoreceria a ocorrência de *A. doebereinae* no solo. O delineamento experimental foi em DIC com quatro repetições. Após 90 dias, avaliaram-se o peso da matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR), o número de nódulos (NN), altura da parte aérea (APA) e o comprimento da raiz (CR). Uma alíquota de solo retirada dos vasos que não continham *S. virgata* foi utilizada para verificar a ocorrência de *A. doebereinae* nos solos contendo diferentes valores de V%. Para isso, *S. virgata* foi utilizada como planta-isca e o cultivo ocorreu em frascos com capacidade de 500 mL, utilizando solução de Jensen esterilizada. No momento do plantio, foi inoculada 1 mL de suspensão de solo. Foi verificado maiores valores de MSPA e APA nas plantas cultivadas em solos contendo V% de 50 e 70%. Já em relação à ocorrência de *A. doebereinae* no solo sem o cultivo de *S. virgata*, foi encontrado nódulos nas plantas-isca inoculadas com suspensões de solos que apresentaram V% maior que 40.

¹Graduando em Agronomia pela UNIFENAS anapaulah_aninhah@hotmail.com; ²Mestranda em Sistemas de Produção pela UNIFENAS marianacarolinespineli@hotmail.com; ³Mestranda em Ciência Animal pela UNIFENAS cassiabakiao@hotmail.com; ⁴Docente da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS – Campus Alfenas mantovanijr@yahoo.com; jose.miranda@unifenas.br; ligiane.florentino@unifenas.br

INTRODUÇÃO

A utilização de leguminosas que formam simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, comumente denominada rizóbios, em sistemas agrícolas e florestais é de grande importância na manutenção da sustentabilidade dos ecossistemas, porque fornece o Nitrogênio (N) necessário para o crescimento da planta e por manter os níveis adequados de N no solo, estimulando a ciclagem de nutrientes. Com isso, os estudos sobre o processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) contribuem para a redução da utilização de fertilizantes nitrogenados, que além de apresentar altos custos, podem exercer impactos sobre o meio ambiente.

A leguminosa *Sesbania virgata* é uma espécie nativa que se desenvolve bem em solos pobres em nutrientes, erodidos e alagados (POTT & POTT, 1994). Devido a isso, tem sido utilizada em áreas de recuperação de solos degradados e em reflorestamento de matas ciliares. Os estudos de FBN envolvendo *S. virgata* mostram a ocorrência de uma especificidade entre esta espécie e seu microssimbionte, *Azorhizobium doebereinae* (FLORENTINO ET AL., 2009; FLORENTINO & MOREIRA, 2009; MOREIRA ET AL., 2006; GONÇALVES & MOREIRA, 2004). Nesse sentido, constata-se nodulação efetiva apenas quando *S. virgata* é inoculada com *A. doebereinae* e este, por sua vez, somente infecta eficientemente *S. virgata*.

Além desta peculiaridade em relação às características simbióticas, em alguns estudos observa-se que no campo, a simbiose entre *S. virgata* e *A. doebereinae* ocorre, principalmente em solos que apresentam valores de pH em torno de 7,0 e altos níveis de Ca^{+2} , Mg^{+2} , P e sem presença de Al^{+3} . Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo estudar o comportamento da simbiose entre *S. virgata* e *A. doebereinae* em solos contendo diferentes valores de saturação por bases (V%) e analisar se o aumento de V% no solo favorece a ocorrência desta bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos, sendo o primeiro em vasos com solo e o segundo, em condições axênicas. Para o experimento 1, foram coletadas amostras de solos na camada 0-20 cm numa área de pastagem do Setor de Ciências Agrárias da Unifenas/Alfenas, que não continha *S. virgata*.

De acordo com a análise química do solo, segundo Embrapa (1997), o valor de pH (CaCl_2) foi de 4,6 e saturação por bases (V%) igual a 22%. A esse solo foram adicionadas diferentes doses de calcário para elevar V% a valores de 30, 40, 50 e 70%. O solo sem adição de calcário constituiu-se na testemunha, totalizando, portanto, cinco tratamentos. O tempo de incubação do calcário dolomítico (PRNT = 90%) foi de 30 dias, mantendo-se a umidade próximo da a nível da capacidade de campo.

O delineamento experimental foi em esquema fatorial 5 x 2 (5 tratamentos e vasos com ou sem *S. virgata*), com quatro repetições, totalizando 40 vasos, para os quais a umidade foi mantida em 80% da capacidade de campo. Basicamente os solos contendo plantas foram utilizados para verificar o comportamento da simbiose entre *S. virgata* e *A. doebereinae* em diferentes valores de pH. Já os vasos sem *S. virgata*, não foi realizada a inoculação e estes foram utilizados para avaliar se, somente a calagem interferiria na ocorrência de *A. doebereinae* no solo.

Antes do plantio, foi realizada a quebra de dormência das sementes por imersão em ácido sulfúrico (P.A.) durante 50 minutos, seguida da lavagem em água esterilizada. Após, as sementes foram colocadas para germinar em placas contendo algodão e papel filtro umedecidos esterilizados em autoclave por 20 min a 121°C. Após a germinação e retirada de seu tegumento, quatro sementes foram semeadas por vaso. Posteriormente, foi feito o desbaste, deixando-se duas plantas.

No momento do plantio, foi realizada a inoculação com a estirpe de *A. doebereinae*, BR 5401^T, cultivada em meio de cultura líquido 79 com azul de bromotimol e com pH 6,8 (FRED e WAKSMAN, 1928), sob agitação por três dias. Cada semente pré germinada foi inoculada com 1 mL de meio de cultura na fase log com 10⁹ UFC (unidades formadoras de colônias) mL⁻¹. A estirpe BR 5401^T foi cedida pela Embrapa Agrobiologia.

Esse experimento foi mantido por 90 dias e, nos vasos contendo *S. virgata* foram avaliados o comprimento de raiz (CR) e parte aérea (CPA), número de nódulos (NN) e matéria seca de raiz (MSR), parte aérea (MSPA) e dos nódulos (MSN). Os dados de MSPA, MSN e NN foram comparados pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar.

Posteriormente, foram coletadas 10 gramas de amostras de solo dos vasos sem *S. virgata*, as quais foram utilizadas para instalação do experimento 2, seguindo a metodologia utilizada por Florentino e Moreira (2009). *S. virgata* foi cultivada, em frascos de vidro escuro reciclado contendo 500 mL de solução nutritiva de Jensen (1942) sem nitrogênio (CaHPO_4 1 gL^{-1} , K_2HPO_4 0,2 gL^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 gL^{-1} , NaCl 0,2 gL^{-1} , FeCl_3 0,1 gL^{-1} , H_3BO_3 2,86 mgL^{-1} , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,03 mgL^{-1} , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 mgL^{-1} , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08 mgL^{-1} e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,09 mgL^{-1}) (pH 6,8) e esterilizada. Cada frasco continha no seu interior uma folha de papel-filtro retangular (2 x 15 cm). Esta folha serviu de suporte e condução de solução para as raízes, principalmente quando elas ainda estavam pequenas. A quebra de dormência das sementes foi realizada conforme citado anteriormente.

Os frascos foram lacrados com fita crepe para evitar contaminação, deixando-se apenas o orifício para a inserção da radícula da semente germinada e posterior inoculação com as suspensões das amostras de solos (1 mL da diluição 10^{-1} das amostras do solo). Além da inoculação com as suspensões de solos, foram adicionados dois controle sem inoculação, um sem N mineral e o outro contendo N Mineral (35 mg.L^{-1} $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$) e outro inoculado com a estirpe 5401^T, utilizada como controle de nodulação.

Esse experimento foi instalado em DIC, com 4 repetições e ainda se encontra em fase de condução, com 45 dias de cultivo, sendo possível observar a presença de nódulos através do frasco de vidro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão apresentados os valores da matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR), número de nódulos (NN), altura da parte aérea (CPA) e o comprimento da raiz (CR) de *S. virgata* após o cultivo em solos contendo diferentes valores de saturação de bases (V%). Observa-se que o maior desenvolvimento de *S. virgata*, de acordo com os valores de MSPA e CPA, foi obtido nos tratamentos que apresentaram saturação de bases de 50 e 70%. O mesmo comportamento foi verificado para o peso e crescimento do sistema radicular. Em relação ao número de nódulos, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos. Isso pode ser explicado pelo fato de todas as plantas terem sido inoculadas no momento do plantio, no entanto,

de acordo com os resultados de MSPA e CPA, verifica-se que a simbiose com a estirpe 5401^T apresentou maior eficiência nos tratamentos V% 50 e V% 70, o que pode ser devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes, devido à calagem (SAMARÃO et al., 1986).

Tabela 1. Peso da matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR), número de nódulos (NN) e comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz (CR) de *Sesbania virgata* cultivada em solos contendo diferentes valores de saturação de bases (V%).

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	NN	CPA (cm)	CR (cm)
Testemunha	1,89 b	0,55 c	16,00 a	18,67 b	28,00 a
V% 30	2,01 b	0,55 c	23,00 a	13,31 c	33,25 a
V% 40	2,50 b	0,53 c	17,00 a	17,00 b	30,17 a
V% 50	3,52 a	0,80 b	15,00 a	20,17 a	34,42 a
V% 70	3,84 a	0,99 a	14,00 a	20,25 a	33,50 a
CV (%)	17,22	17,31	25,07	7,63	13,26

Em relação à ocorrência de *A. doebereineriae* nos solos sem *S. virgata*, foi observado que o aumento de V% favorece o crescimento desta bactéria no solo (tabela 2). A sensibilidade a condições de acidez pela estirpe BR 5401^T já foi observada em outros estudos (FLORENTINO et al., 2012), no qual verificaram que essa estirpe não apresenta crescimento em meio de cultura contendo valores de pH abaixo de 6,0.

Tabela 2. Nodulação de *Sesbania virgata* quando inoculada com solos contendo diferentes valores de saturação de bases (V%).

Tratamentos	Nodulação
BR 5401 ^T	+
Com N mineral	-
Sem N mineral	-
V 22	-
V 30	-
V 40	+
V 50	+
V 70	+

CONCLUSÕES

O valor de saturação de bases do solo interfere na simbiose entre *S. virgata* e *A. doebereineriae* e também no crescimento desta bactéria no solo.

AGRADECIMENTOS

A Fapemig pelas bolsas de iniciação científica e Mestrado e a Capes, pela bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAGERIA, N.K. & BALIGAR, V.C. **Fertility management of tropical acid soil for sustainable crop production.** In: RENGEL, Z., ed. Handbook of soil acidity. New York, Marcel Dekker, 2003. p.359-385.

FLORENTINO, L.A.; GUIMARÃES, A.P.; RUFINI, M.; SILVA, K. da; MOREIRA, F.M. de S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, v.66, p.667-676, 2009.

FLORENTINO, L.A.; MOREIRA, F.M.S FLORENTINO, L. A. ; JARAMILLO, P. M. D. ; SILVA, K. B. ; SILVA, J. S. ; OLIVEIRA, S. M. ; MOREIRA, F. M. S. Physiological and symbiotic diversity of Cuprividus necator strains isolated from nodules of Leguminosae species. **Scientia Agricola** (USP. Impresso), v. 69, p. 247-258, 2012.

FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereinae*, microssimbionte de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, v.33, p. 215-226, 2009.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology - with special reference to the microorganisms of the soil**. New York: McGraw-Hill, 1928. 145p.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F.M.S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and its Nodule Isolates *Azorhizobium johannae* with other Legume Hosts and Rhizobia. I. **Symbiosis**, v.36, p.57-68, 2004.

JENSEN, H.L. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v.66, p.98-108, 1942.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; YOUNG, P. P. W. *Azorhizobium doebereinae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, 29:197–206, 2006.

POTT, A.; POTT, V. J. Plantas do Pantanal. Corumbá: EMBRAPA/CPAP/SPI, 1994, 320p.

SAMARÃO, S. S.; DIDONET, A. D.; NEIVA, L. C. S.; DUQUE, F. F.; GOI, S. R.; JACOB NETO, J.; MONTEIRO, P. M. F. O.; ROLIM, R. B. Influência da calagem e micronutrientes na nodulação da soja por *Rhizobium japonicum* em solos ácidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, p. 237-244, 1986.