

EFEITO DO PERÍODO DA ARMAZENAGEM NA VIABILIDADE DE ESTIRPES E MANUTENÇÃO DA COLEÇÃO DE RIZÓBIOS DO INPA

Danielle Braule Pinto RAMOS¹ ;Luiz Augusto Gomes de SOUZA²

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientador CPCA/INPA.

1. Introdução

O nitrogênio é um macronutriente essencial para a nutrição das plantas e perde-se rapidamente dos sistemas agrícolas por ser um elemento cuja forma estável é gasosa, o N₂. As plantas, entretanto só conseguem assimilá-lo na forma fixada, presente nos solos, conhecidas por amônia e nitrato (NH₄⁺ e NO₃⁻). A fixação de N₂ pode ser resultante de processos espontâneos, biológicos ou industriais. A contribuição da fixação espontânea para a produção agrícola é muito pequena, e a energia do processo é obtida de fenômenos naturais como raios e trovões. Já a fixação industrial, demanda energia fornecida por derivados de petróleo. Entre os processos biológicos existentes que incluem a fixação de N₂ por associações não simbióticas entre microrganismos e plantas (rizocenoses) e microrganismos de vida livre, a simbiose entre rizóbios e espécies de Fabaceae é o mecanismo mais eficiente de reposição de nitrogênio fixado no sistema solo-planta-animal (Marshner, 1990).

Os rizóbios são bactérias que ocorrem naturalmente nos solos, e a família botânica das Fabaceae (Leguminosae) é economicamente uma das mais importantes do mundo (Allen & Allen, 1981). A associação entre a planta hospedeira e as bactérias resulta na formação de nódulos radiculares, sítio onde ocorrem reações bioquímicas que permitem a fixação simbiótica do nitrogênio. O uso de bactérias como inoculante nos cultivos das leguminosas é importante para a sustentabilidade dos agroecossistemas em nitrogênio e têm potencial para reduzir ou excluir a demanda por adubos nitrogenados. As primeiras estirpes de Rhizobia da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA/CPCA foram isoladas no ano de 1979. Souza *et al.* (1996) listou até aquela data 340 estirpes, pertencentes a 39 gêneros das Fabaceae, obtidas a partir de nódulos isolados de 59 espécies. Destas estirpes, 98,2 % foram obtidas de solos da Amazônia. Com quase 30 anos de existência, a preservação da coleção é feita por repicagem periódica das estirpes em meio sólido inclinado, disposto em tubos rosqueáveis. O processo implica em perdas gradativas de viabilidade e pode pôr em risco a sobrevivência das estirpes. A preservação por liofilização ainda não é praticada, sendo, entretanto a mais segura. Para as espécies de maior potencial, um número maior de estirpes vai permitir selecionar as de maior eficiência fixadora de N₂ para uso como inoculante. Um levantamento feito há dez anos, mostrou que a investigação sobre a habilidade nodulífera das leguminosas da Amazônia já abrangeram 426 espécies, que já foram avaliadas quanto a sua capacidade de nodulação, o que representa 32,92 % do total de espécies constantes nos herbários da região (Souza *et al.*, 1997). Em 287 destas espécies foram encontrados nódulos, o que representa 67,32 % do total avaliado, demonstrando a grande importância da simbiose nos diferentes ecossistemas regionais. Nos últimos anos, a coleção de rizóbios do INPA tem aumentado consideravelmente com novos isolamentos de nódulos de leguminosas da Amazônia, demandando medidas de re-organização de suas informações, bem como a multiplicação de replicatas das estirpes com o propósito de assegurar sua preservação.

Este estudo foi conduzido com o objetivo de contribuir para a organização, manutenção e disponibilização de informações sobre a coleção de rizóbios do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA, efetuando novos isolamentos, seguido de sua caracterização fenotípica.

2. Material e métodos

Os trabalhos e atividades desta pesquisa foram conduzidos no Setor de solos, Laboratório de Microbiologia do Solo - LMS, na Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônomicas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - CPCA-INPA, no Campus do V-8, em Manaus, AM, entre os meses de agosto de 2008 e junho de 2009. As estirpes incorporadas na coleção de rizóbios estão preservadas em caixas de madeira compartimentadas acondicionadas em armários de aço, à temperatura ambiente ($\pm 24^{\circ}\text{C}$). A identificação dos tubos da coleção é composta de três informações: o número da estirpe na coleção, o número do tubo e a data de estocagem do material puro. Os tubos puros remanescentes foram incubados em placas de Petri com meio YMA, pH 6,0 sem corante, (Vincent, 1970, adaptado) para avaliação de sobrevivência e observação do grau de pureza das estirpes da coleção. Para cada estirpe, o número de tubos riscados por placa corresponde ao número de tubos disponíveis em cada célula da coleção que pode variar entre 1 e 6 tubos. A incubação foi procedida no escuro em temperatura ambiente de laboratório (23-26°C) por dez dias para estirpes de crescimento rápido e por 25 dias para as de crescimento lento. Para todos os tubos examinados, o tempo de armazenagem foi registrado com fins de verificar a significância da influência do tempo de armazenagem sobre a preservação das estirpes incorporadas ao banco, que podem sugerir o tempo de viabilidade dos tubos pelo processo atual de armazenagem.

Nas atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia do Solo, foram feitos novos isolamentos de rizóbios a partir de nódulos coletados e expedições de coleta de leguminosas a campo, abrangendo um total de 47 nódulos avaliados. As técnicas de isolamento empregadas foram descritas por Hungria, (1994). Do total de nódulos submetidos às técnicas de isolamento foram isoladas 25 novas estirpes bacterianas correspondentes a seis espécies de Leguminosas coletadas nos municípios amazonenses de São Gabriel da Cachoeira (*Dioclea glabra*, *Chamaecrista mimosoides*, *Clitoria falcata* e *Zygia cauliflora*) e em Manacapuru (*Centrosema triquetrum* e *Inga laurina*). Para as estirpes ainda não descritas, estas foram incubadas em meio YMA, pH 6,0 sem a adição de corante. Após o crescimento dos isolados, foram registradas informações sobre a cor da colônia, tempo de crescimento, diâmetro, forma, produção de goma, tendência a coalescência, elevação, densidade e consistência da colônia. O armazenamento dos isolados puros foi efetuado em tubos rosqueáveis com meio YMA inclinado, em quadruplicata. Para tanto, foram aplicados os descritores propostos por Somasegaran & Hoben, (1985). No registro da coleção em meio digital foi preparada uma planilha em Excel, reunindo as informações referentes à coleção.

3. Resultados e discussão

As informações geradas sobre os isolamentos efetuados a partir de nódulos de leguminosas hospedeiras estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Informações sobre novos isolamentos de nódulos efetuados nos meses de dezembro a fevereiro de 2009, no Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA-CPCA, em Manaus, AM.

| Nº de coleta | Espécie (*) | Procedência | Nº de isolamentos efetuados | Nº de isolados obtidos |
|--------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 04/07 | <i>Dioclea glabra</i> | São Gabriel da Cachoeira | 10 | 5 |
| 29/07 | <i>Chamaecrista mimosoides</i> | São Gabriel da Cachoeira | 10 | 4 |
| 42/07 | <i>Clitoria falcata</i> | São Gabriel da Cachoeira | 10 | 7 |
| 07/08 | <i>Zygia cauliflora</i> | São Gabriel da Cachoeira | 3 | 2 |
| 20/08 | <i>Centrosema triquetrum</i> | Manacapuru | 4 | 3 |
| 22/08 | <i>Inga laurina</i> | Manacapuru | 10 | 4 |
| Total | | | 47 | 25 |

(*) Espécies de Fabaceae hospedeiras de cujos nódulos radiculares originaram as estirpes.

Analisando separadamente as espécies, pode-se observar que a *Clitoria falcata* e a *Centrosema triquetrum* tiveram as melhores respostas: de 10 isolados efetuados, sete foram obtidos e de quatro isolados, foram obtidos três. Na Tabela 2, são apresentadas informações sobre as características morfológicas das colônias. Enquanto algumas apresentam aspecto gomoso com média produção de muco, dificultando o isolamento da colônia, outras com o mesmo aspecto apresentam pouco muco. Como pode ser verificado, o diâmetro das colônias variou de 0,5 a 6,0 mm. De modo geral, constataram-se características variáveis entre as colônias obtidas a partir dos isolados efetuados. Essa diversidade morfológica também foi verificada por Martins *et al.* (1997), estudando as características de 27 isolados de rizóbios de raiz e caule de *Discolobium* sp., espécie nativa do Pantanal Mato-Grossense. Segundo Neves *et al.* (1998), a morfologia de colônia tem sido considerada um parâmetro bastante útil na previsão da eficiência simbiótica das estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam soja. A maioria dos rizóbios isolados, ou seja, 76 % apresentaram crescimento rápido e 24 % crescimento lento, sendo que a ocorrência de isolados com crescimento rápido foi maior para os isolados procedentes de São Gabriel da Cachoeira do que os da região de Manacapuru. Entretanto, esse fato pode estar relacionado com a quantidade de amostras coletadas em cada região. Observa-se que dos 19 isolados que cresceram, 26,3 % apresentaram elevada produção de muco, 36,8 % apresentaram média produção e 47,4 % produziram pouca goma na fase de crescimento.

Tabela 2 – Características morfológicas de rizóbios isolados efetuados nos meses de dezembro a fevereiro de 2009

| Nº da estirpe | Tempo de crescimento (dias) | Forma | Diâmetro de colônias (mm) | Produção de goma | Coalescência | Consistência |
|---------------|-----------------------------|------------|---------------------------|------------------|--------------|--------------|
| 04/07-1 | 07 | Circular | 1,0 | Média | Média | Butirosa |
| 04/07-6 | 07 | Circular | 1,0 | Pouca | Média | Butirosa |
| 29/07-2 | 06 | Circular | 6,0 | Alta | Alta | Aquosa |
| 29/07-5 | 01 | Puntiforme | 0,5 | Pouca | Pouca | Butirosa |
| 29/07-7 | 06 | Circular | 2,0 | Pouca | Pouca | Butirosa |
| 42/07-1 | 07 | Circular | - | Média | Alta | Gamosa |
| 42/07-2 | 06 | Circular | 1,5 | Média | Alta | Butirosa |
| 42/07-3 | 07 | Circular | 2,0 | Pouca | Pouca | Gamosa |
| 42/07-5 | 06 | Circular | 1,0 | Média | Média | Butirosa |
| 42/07-8 | 06 | Circular | - | Média | Alta | Gamosa |
| 42/07-9 | 07 | Circular | 1,0 | Média | Média | Butirosa |
| 42/07-10 | 06 | Circular | 1,0 | Média | Média | Butirosa |
| 07/08-1 | 02 | Circular | 3,0 | Média | Pouca | Coreácea |
| 07/08-3 | 06 | Circular | 3,0 | Alta | Alta | Aquosa |
| 20/08-1 | 06 | Puntiforme | 0,2 | Pouca | Pouca | Butirosa |
| 20/08-2 | 06 | Circular | 5,0 | Pouca | Pouca | Butirosa |
| 22/08-5 | 07 | Circular | 0,5 | Pouca | Média | Butirosa |
| 22/08-8 | 07 | Puntiforme | 1,0 | Pouca | Pouca | Coriácea |
| 22/08-10 | 07 | Circular | 1,0 | Pouca | Média | Butirosa |

A Figura 1 ilustra alguns aspectos relacionados com as características descritas para os rizóbios estudados. As características de crescimento do tipo pulvinada (com elevação irregular), consistência aquosa e derramada e o estabelecimento de colônias esféricas puntiformes, puras são habitualmente descritas no grupo dos rizóbios.



Figura 1. Algumas características morfológicas e culturais de rizóbios nativos descritos no Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA-CPA.

Analisando os resultados obtidos com as atividades de preservação da coleção, foi multiplicado um total de 19 espécies hospedeiras. Os trabalhos desenvolvidos incluíram a inserção de novos registros na Coleção de rizóbios do INPA, de isolamentos anteriores ainda não registrados na coleção, abrangendo um total de 70 novas estirpes, totalizando 367 novos tubos multiplicados. Foi adicionalmente verificado que a viabilidade das estirpes não foi afetada pelo tempo de incubação, e algumas replicadas com até 15 anos de preservação permaneciam viáveis, crescendo puras após incubação, ao passo para as replicatas ressequidas ou contaminadas tal fato ocorreu independente do tempo de preservação dos tubos.

4. Conclusões

As atividades desenvolvidas foram relacionadas com a multiplicação, purificação e preservação da coleção de rizóbios. Novos isolamentos foram efetuados e de 47 nódulos oriundos de seis espécies de leguminosas foram obtidos 25 novos isolados bacterianos, que foram caracterizados fenotipicamente, registrando-se suas características culturais em meio de cultivo. A preservação de tubos da coleção não foi relacionada com o tempo de preservação das replicatas e as perdas registradas ocorrem independentes do tempo de armazenamento na coleção.

5. Referências

- Allen, O.N. & Allen, E.K. 1981. *The leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation*. The University of Wisconsin Press, 812p.
- Hungria, M. 1994. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: Hungria, M. & Araújo, R.S. (Eds.) *Manual de Métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola*. EMBRAPA-CNPAP, Documentos 46, Brasília, 45-59.
- Marschner, H. 1990. Nitrogen fixation. In: Marschner, H. 1990. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London, 4^a Ed., Cap. 7, p. 172-193.
- Martins, C. M.; Loureiro, M. F.; Souto, S. M ; Franco, A. A. 1997. Caracterização morfológica e avaliação da tolerância em níveis crescentes de NaCl e altas temperaturas de isolados de rizóbio de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp. nativas do Pantanal Mato- Grossense. *Revista Agricultura Tropical*, Cuiabá, v. 3, p. 7-14.
- Neves, M.C.P.; Martins, L.M.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G. 1998. *Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (Vigna unguiculata) em solos do Nordeste do Brasil*. I. Sertão. Seropédica: Embrapa-Agrobiologia, Maio 10p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 46).
- Somasegaran, P.; Hoben, H.J. 1985. *Methods in legume-Rhizobium Technology*. Univ. do Hawaii, NIFTAL, 367p.
- Souza, L.A.G.; Brito, V.M.; Ramos, R.L. 1996. *Colección de rhizobio de la población nativa de los suelos de la Amazonia*. Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, 18., Santa Cruz de La Sierra, ALAR, Memórias. p. 401-403.
- Souza, L.A.G.; Silva, M.F.; Moreira, F.M.S. 1997. Associações rizóbios-arbóreas na Amazônia. In: Noda, H.; Souza, L.A.G.; Fonseca, O.J.M. (Ed.). *Dois décadas de contribuição do INPA à Pesquisa Agrônômica no Trópico Úmido*. INPA, Manaus. p. 193-219.
- Vincent, J.M. 1970. *A manual for the practical study of root-nodules bacteria*. Burgess, London. 164p.