

Crescimento de leguminosas arbóreas inoculadas com rizóbios em casa de vegetação

(Growth of leguminous trees inoculated with rhizobia in greenhouse)

Cristiano Mantovani Belini¹; Lenice Ribeiro¹; Anaira Denise Caramelo^{1,2}; Renato Fernandes Galdiano Jr²; Wellington Marcelo Queixas Moreira^{1,2}

¹G- Centro Universitário UNIFAFIBE – Bebedouro, SP, Brasil.
cristianobelini@yahoo.com.br; lenice_map@hotmail.com

²UNESP – Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, SP
anairacaramelo@yahoo.com.br; renatofgaldianojr@yahoo.com.br;
moreira_wellington@yahoo.com.br

Abstract. The “amendoinzeiro” (*Pterogyne nitens*) and “angico-do-cerrado” (*Anadenanthera pelegrina*) are leguminous trees that form symbiotic associations with nitrogen-fixing bacteria - rhizobia. The aim of this study was to evaluate the influence of rhizobia for growth of both species. Both species were inoculated on seeds (T1 and T2) or the substrate (T3 and T4), and control (T5). After 60 days the biometric measurements of each replicate were evaluated. To angico-do-cerrado was found statistically significant differences for T1 and T2, the mass parameter fresh and dry mass of the aerial portion, beyond the height parameter. Indeed, we can see that this plant species may respond to inoculation with *B. japonicum* and *B. elkanii*.

Keywords. Inoculation; Leguminous trees; Biological nitrogen fixation

Resumo. O amendoinzeiro (*Pterogyne nitens*) e o angico-do-cerrado (*Anadenanthera peregrina*) são leguminosas arbóreas que formam associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico – os rizóbios. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos rizóbios para o crescimento das duas espécies. Ambas as espécies foram inoculadas nas sementes (T1 e T2) ou no substrato (T3 e T4), além do controle (T5). Após 60 dias foram avaliadas as medidas biométricas de cada repetição. Para o angico-do-cerrado verificou-se diferenças estatísticas significativas para T1 e T2, nos parâmetro massa seca e massa fresca da porção aérea, além do parâmetro altura. Com

efeito, pode-se observar que esta espécie vegetal pode responder à inoculações com B. japonicum e B. elkanii.

Palavras-chave. Inoculação; Leguminosas arbóreas; Fixação biológica de nitrogênio

Introdução

As leguminosas arbóreas *Pterogyne nitens* (amendoinzeiro) e *Anadenanthera peregrina* (angico-do-cerrado) vêm sofrendo com um acelerado processo de exploração por conta da rusticidade que o seu produto madeireiro representa, podendo ser empregado na confecção de móveis finos e na construção civil. A espécie nativa *Pterogyne nitens*, por exemplo, está a ponto de se extinguir da flora paulistana em função dessas explorações, sendo necessária a multiplicação de seus exemplares e também sua conservação genética para perpetuação da espécie (CARVALHO, 1994). É recomendada para arborização de vias urbanas e rodovias. Justamente por apresentar um crescimento relativamente rápido é também recomendada na reposição de mata ciliar e revegetação em sítios arenosos e degradados (LORENZI, 1992).

A conservação e o melhoramento genético da espécie são de suma importância, justamente por ela apresentar alto potencial econômico, para ornamentação e restauração de equilíbrios ecológicos, principalmente pelo fato de ser uma espécie com possibilidades de ser extinta da flora paulistana (SILVA, 2009). O angico-do-cerrado (*Anadenanthera peregrina*) possui alto potencial ornamental em virtude do aspecto retorcido visíveis em seus ramos, podendo ser empregado no paisagismo em geral. Também por ser uma planta bem adaptada ao clima seco é muito utilizada em plantios mistos em áreas degradadas de preservação permanente. A casca do tronco é empregada no curtume (LORENZI, 2002).

As espécies da família Leguminosae têm a capacidade de obter biologicamente o nitrogênio quando em simbiose com bactérias chamadas rizóbios, que por sua vez podem fornecer à planta de 60 a 100% de suas necessidades de nitrogênio (CHAVES, 2003).

Para tanto, se faz necessário o desenvolvimento de mecanismos mais eficientes na produção de mudas destas espécies propiciando conseqüentemente, um melhor desenvolvimento dessas leguminosas arbóreas, e que estas possam ser produzidas com redução de custos, substituindo a adubação nitrogenada por bactérias que fixam biologicamente o nitrogênio. Esta pode ser uma alternativa eficaz para perpetuação destas espécies, para que estas não corram o risco de se extinguirem, principalmente o amendoineiro. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de estirpes de bradirrizóbios (*Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum*) para o crescimento de *Pterogyne nitens* e *Anadenanthera peregrina* em condições de casa de vegetação.

Materiais e Métodos

As estirpes de bradirrizóbios foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da UNESP. As bactérias foram cultivadas em meio de cultura YML (VINCENT, 1970) e mantidos em incubadora TECNAL (modelo TE-420) por aproximadamente 30°C e 220 R.P.M. Após 48 horas, o meio foi retirado da incubadora e logo em seguida utilizado no processo de inoculação das sementes ou substratos.

As sementes utilizadas neste foram coletadas no município de Bebedouro-SP, (amendoineiro) e do angico-do-cerrado foram coletados de matrizes do viveiro municipal de mudas de Pirangi-SP.

O processo de semeadura ocorreu no laboratório de Botânica do Centro Universitário UNIFAFIBE, local no qual o experimento permaneceu por cinco dias e posteriormente transferido para a casa de vegetação do Horto Florestal de Bebedouro/SP, Instituto de Florestas do Estado de São Paulo, cuja estrutura é constituída por uma cobertura com tela de nylon para retenção de 50% da luminosidade e irrigação diária por meio de aspersores.

As sementes do amendoineiro foram retiradas da sâmara, e juntamente com as sementes de angico, foram selecionadas e também submetidas à desinfestação com

hipoclorito 1% por 10 minutos; posteriormente foram lavadas com água destilada e semeadas em números de 3 em cada vaso, contendo vermiculita autoclavada de granulometria média.

O experimento consistiu nos seguintes tratamentos para ambas as espécies: T1 – Inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) nas sementes; T2 – Inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5080) nas sementes; T3 – Inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) no substrato em plantas com 30 dias de vida; T4 – Inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5080) no substrato em plantas com 30 dias de vida; T5 – Controle (sem inoculação). Antes do processo de inoculação no solo, procedido para os tratamentos 3 e 4, realizou-se o desbaste de duas plantas, restando somente uma planta por repetição.

As sementes foram inoculadas com a dose de 200 ml de inoculantes para 50 kg de sementes (MOREIRA, 2009). Os tratamentos que receberam inoculação no substrato, as inoculações foram realizadas 30 dias após a semeadura e foi realizada próxima ao colo das plantas com auxílio de uma pipeta automática mantendo a proporção padrão de 1 ml de inoculante por planta. Aproximadamente 45 dias após a semeadura, 12 ml de solução nutritiva Gibson (1987) com ausência de nitrogênio foi introduzida.

O teor de nitrogênio total foi obtido através do método de Kjeldahl e foi procedido no Departamento de Microbiologia da FCAV/UNESP.

Cada tratamento foi composto por 10 repetições e cada repetição contendo três sementes inicialmente, sendo que, após 30 dias da semeadura duas plantas por repetição foram desbastadas antes do processo de inoculação no solo, permanecendo apenas uma planta por repetição até o final do experimento. O delineamento foi inteiramente casualizado contendo distribuições ao acaso. Após 60 dias da semeadura foram avaliados, mediante análises biométricas das plantas, os seguintes aspectos:

- a) - Diâmetro do caule (DC);
- b) - Altura da parte aérea (APA);
- c) - Comprimento da maior folha (CMF);
- d) - Número de folhas (NF);
- e) - Massa fresca da parte aérea (MFPA);

- f) - Massa fresca da parte radicular (MFPR);
- g) - Massa seca da parte aérea (MSPA);
- h) - Massa seca da parte radicular (MSPR);
- i) - Quantidade de nódulos (QN).

Os dados das massas (fresca e seca) foram obtidos em balança analítica (modelo AG200, Gehaka®), onde a massa seca somente foi analisada após secagem das plantas em estufa a 60°C durante 72 horas até aquisição de peso constante. Os valores foram submetidos à análise de variância (Anava) e as médias separadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade pelo programa estatístico Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

Resultados e Discussão

Ao final do experimento, mediante análise visual de plantas de amendoineiro (*Pterogyne nitens*) (Figura 1) foi possível constatar que não ocorreu o processo de nodulação em nenhum dos tratamentos aplicados para esta espécie.

Figura 1: Plantas de amendoineiro (*Pterogyne nitens*) após 60 dias nos diferentes tratamentos.





No entanto, mesmo assim foram procedidas as análises biométricas do vegetal onde, em consequência da não nodulação, os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativas, exceto para o parâmetro número de folhas no qual o tratamento 1, 2 e 4 se mostrou maior frente ao controle (Tabela 1).

Barberi (1998), avaliando a ocorrência de nodulação em 37 espécies de leguminosas cultivadas em viveiro, sendo 18 pertencentes à subfamília Caesalpinoideae, 13 à Papilionoideae e 6 à Mimosoideae, constatou que nos exemplares da subfamília Caesalpinoideae o processo de nodulação não foi observado em nenhuma das espécies, enquanto que nas outras subfamílias a porcentagem de nodulação foi de 83% para Papilionoideae e 85% para Mimosoideae. É possível relacionar esses resultados a este trabalho, no qual também não se observou a nodulação em amendoineiro (*Pterogyne nitens*), espécie também pertencente à subfamília Caesalpinoideae.

Tabela 1 - Medidas de crescimento para diâmetro do caule (DC), altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da parte radicular (MFPR), massa seca da parte aérea (MSPA) massa seca da parte radicular (MSPR) de amendoineiro (*Pterogyne nitens*) em diferentes tratamentos cultivados em casa de vegetação, Horto Florestal de Bebedouro, 2011.

TRATA- MENTO ^a	DC -----mm-----	APA	CMF	NF	MFPA -----mg-----	MFPR	MSPA	MSPR
T1	1,50a*	12,24a	5,88a	3,71a	28,76a	13,33a	15,19a	8,37a
T2	1,47a	12,06a	5,74a	3,47a	26,97a	11,18a	14,48a	7,47a
T3	1,44a	11,93a	5,80a	3,30b	27,42a	11,79a	13,47a	7,35a
T4	1,44a	11,78a	5,63a	3,48a	26,98a	12,86a	13,81a	8,05a
T5	1,54a	11,68a	5,85a	3,25b	26,70a	11,62a	13,41a	7,46a
CV (%)	8,54	4,57	5,54	9,47	8,71	21,30	12,86	19,85

^a T1 - Inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) nas sementes; T2 - Inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5080) nas sementes; T3 - Inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) no solo em plantas com 30 dias de vida; T4 - Inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5080) no solo em plantas com 30 dias de vida; T5 - Controle (sem inoculação).

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott em nível de 5% de probabilidade.

As análises visuais de plantas de angico-do-cerrado (*Anadenanthera peregrina*) (Figura 2) assim como ocorreu com o amendoineiro não foram observados nódulos característicos das bactérias fixadoras de nitrogênio utilizadas. Foi possível observar diferenças estatísticas significativas para o parâmetro APA no qual as inoculações nas sementes com *Bradyrhizobium japonicum* (T1) manifestou maior crescimento em relação aos outros tratamentos (Tabela 2). Diferenças estatísticas significativas também foram observadas para os parâmetros MFPA e MSPA promovidas pela eficiência dos tratamentos 1 e 2. Embora não tenha ocorrido a nodulação, há a hipótese de que os rizóbios então atuaram como RPCPs.

Gross et al. (2004), trabalhando com angico-do-cerrado (*Anadenanthera peregrina*) em solo de cerrado autoclavado, observaram com sucesso os nódulos que se formaram nas raízes do vegetal. Em contrapartida não descreveu qual estirpe de rizóbio foi

utilizada no trabalho. Concluiu que, os rizóbios quando associados à planta juntamente com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), promoveu melhor crescimento e desenvolvimento do vegetal em relação à associação simbiótica proposta apenas pelos rizóbios, que de fato também foi observada, mas manifestando uma quantidade menor de nódulos no vegetal.

Figura 2: Plantas de angico-do-cerrado (*Anadenanthera peregrina*) após 60 dias nos diferentes tratamentos.



Tabela 2 - Medidas de crescimento para diâmetro do caule (DC), altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da parte radicular (MFPR), massa seca da parte aérea (MSPA) massa seca da parte radicular (MSPR) de angico-do-cerrado (*Anadenanthera peregrina*) em diferentes tratamentos cultivados em casa de vegetação, Horto Florestal de Bebedouro, 2011.

TRATA- MENTO ^a	DC -----mm-----	APA -----mm-----	CMF -----mm-----	NF	MFPA -----mg-----	MFPR -----mg-----	MSPA -----mg-----	MSPR -----mg-----
T1	1,73a*	14,50a	9,02a	2,14a	23,48a	20,36a	15,19a	11,59a
T2	1,63a	14,02b	8,88a	2,07a	23,99a	23,40a	15,27a	12,09a
T3	1,60a	13,83b	8,48a	2,04a	21,82b	21,38a	13,52b	11,84a
T4	1,57b	13,43b	8,49a	2,06a	21,06b	20,09a	13,53b	11,75a
T5	1,47b	13,72b	8,70a	2,07a	21,75b	21,20a	13,87b	12,05a
CV (%)	8,73	4,35	5,87	6,42	7,74	12,66	8,73	12,01

^a T1 - Inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) nas sementes; T2 - Inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5080) nas sementes; T3 - Inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) no solo em plantas com 30 dias de vida; T4 - Inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5080) no solo em plantas com 30 dias de vida; T5 - Controle (sem inoculação).

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott em nível de 5% de probabilidade.

Em trabalhos realizados por Barberi (1998), este avaliou espécies leguminosas em dois viveiros distintos, com vistas a identificar a ocorrência de nodulação. Para a espécie *Anadenanthera peregrina*, observou-se a nodulação apenas nos exemplares de um dos viveiros. Contudo, a ausência de nodulação pode ser atribuída a vários fatores, tais como químicos (deficiência de nutrientes, alteração de pH) ou físicos (erosão, salinização entre outros), mas principalmente por fatores biológicos relatados pela incompatibilidade da estirpe com a planta, já que o processo de nodulação depende de certa especificidade da estirpe.

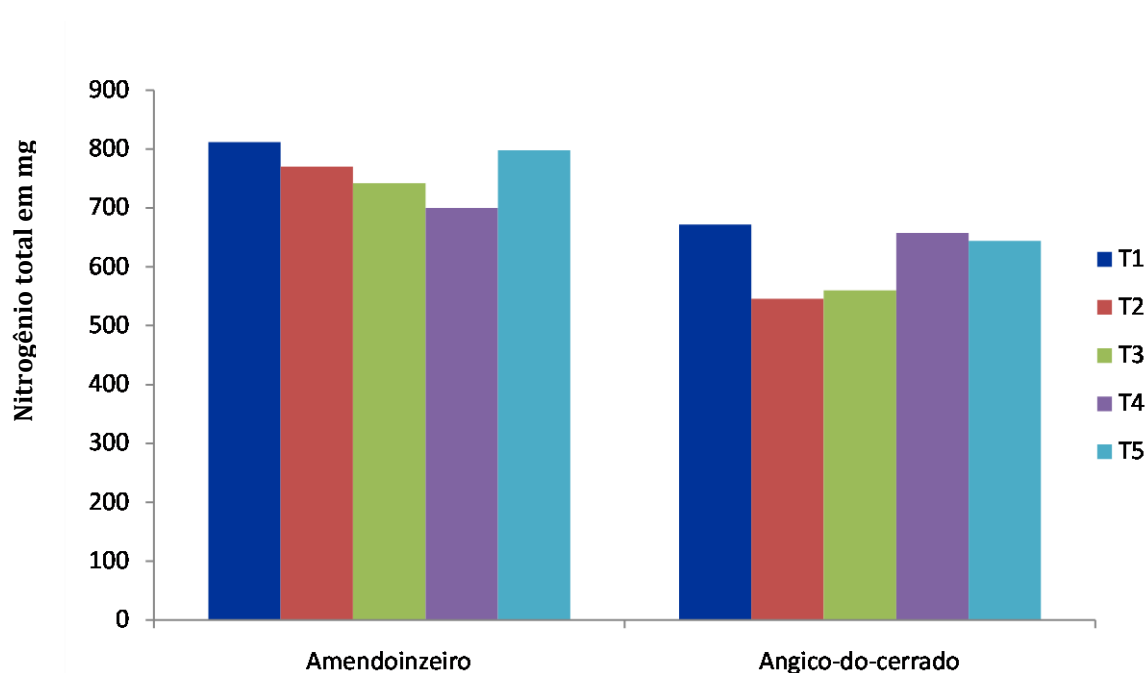
As sementes de amendoineiro e angico-do-cerrado apresentaram baixo percentual de teor de água (Tabela 3), padrão este típico de sementes ortodoxas, sugerindo assim que as mesmas sejam armazenadas em baixas temperaturas quando houver a necessidade (VILLELA, 2004).

Tabela 3 – Percentual de água nas sementes de amendoinzeiro (*Pterogyne nitens*) e angico-do-cerrado (*Anadenanthera peregrina*).

Espécies arbóreas	Amostras	Massa fresca em g	Massa seca em g	% água
Amendoinzeiro (<i>Pterogyne nitens</i>)	1	1,07	0,98	8,41
	2	1,02	0,94	7,85
	3	1,02	0,94	7,85
Angico-do-cerrado (<i>Anadenanthera peregrina</i>)	1	1,14	1,04	8,77
	2	1,09	1	8,26
	3	1,20	1,11	7,5

Com a ausência de nodulação, os teores de nitrogênio obtidos pelas leguminosas arbóreas (Gráfico 1) podem estar associados às reservas energéticas dos cotilédones, principalmente para o angico-do-cerrado, que aos 60 dias após a emergência, ainda apresentava cotilédones persistentes.

Gráfico 1: Teor de nitrogênio total em mg nos diferentes tratamentos de amendoineiro e angico-do-cerrado.



Silva (2011), avaliando a influência de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* para o crescimento e desenvolvimento da leguminosa crotalária (*Crotalaria juncea*), observou em seu tratamento controle (tratamento que não ocorreu o processo de nodulação) níveis de nitrogênio semelhantes aos níveis apresentado no gráfico acima para as duas espécies.

Considerações Finais

Foi observado um resultado contrastante entre as duas leguminosas, enquanto o amendoineiro não manifestou resposta à inoculação, o angico-do-cerrado relatou certa eficiência para o parâmetro MFPA, MSPA e APA nos tratamentos inoculados com *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) nas sementes, concluindo que o mesmo mostrou-se mais responsivo do que o amendoineiro frente às inoculações. Pelo fato de não ter ocorrido o processo de nodulação se fazem necessários a realização de novos estudos com novas estirpes para avaliar a eficácia da relação simbiótica favorecendo espécies leguminosas arbóreas

selecionando estirpes capazes de nodular estas espécies, uma vez que o processo de simbiose é um processo espécie-específico.

Referências

BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 145-153, 1998.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA - CNPF, 1994. 640p.

CHAVES, L. L. B.; CARNEIRO, J. G. A.; BARROSO, D. G.; LELES, P. S. S. Efeitos da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada na produção de mudas de sesbânia em substrato constituído de resíduos agroindustriais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 443-449, 2003.

GIBSON, A. H. **Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the greenhouse and growth chamber**. In: ELKAN, G.H. Symbiotic nitrogen fixation technology. New York: Marcel Dekker Inc., 1987. p. 321-369.

GROSS, E.; CORDEIRO L.; CAETANO, F. H. Nodulação e micorrização em *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* em solo de cerrado autoclavado e não autoclavado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 95-101, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MOREIRA, W. M. Q. **Metabolismo respiratório de bradirrizóbios durante processos *in vitro* e simbiótico analisados por PCR quantitativo em tempo real**. 97f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 2009.

SILVA, L. R. **A eficiência da associação simbiótica de *bradyrhizobium* para o crescimento de crotalária (*Crotalaria juncea*) em condições de casa de vegetação**. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário UNIFAFIBE, Bebedouro, 2011.

SILVA, L. S. **Variabilidade genética em *Pterogyne nitens* Tul. (amendoim-do-campo) em condições de laboratório e de viveiro**. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

VILLELA, F. A.; PERES, W. B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. 2004. cap. 17, p. 265-281.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. ICB HandBook, 15, Oxford: Blackwell Scientific, 200p., 1970.

Recebido em 15/05/2014

Aprovado em 16/10/2014