

AValiação DO CRESCIMENTO DE RHIZOBIUM DE LEGUMINOSAS FLORESTAIS TROPICAIS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA¹

LUIZ AUGUSTO GOMES DE SOUZA², FÁTIMA MARIA MOREIRA MAGALHÃES³
LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA³

RESUMO - Muitos isolamentos de *Rhizobium* de leguminosas florestais em meio convencional "Extrato de levedura com manitol e pH 6,8" (YMA pH 6,8) feitos no laboratório do INPA-Manaus têm sido sem sucesso. Neste estudo, meios com pH diferentes e/ou fontes de carbono (xilose (YXA) pH 5,0; YXA pH 7,0; manitol (YMA) pH 5,0, YMA pH 7,0) foram avaliados para isolamento de *Rhizobium* de 17 leguminosas tropicais. *Rhizobium* foi isolado de todos os nódulos testados, mas dependendo do nódulo, o crescimento não ocorreu em todos os meios. Para a maioria dos nódulos testados, o crescimento só ocorreu em pH 5,0. Em relação à fonte de carbono, não houve diferenças. Os resultados sugerem existir uma variabilidade genética da população de *Rhizobium* de "terra-firme" da Amazônia, com exigências de pH que deve ser considerada no preparo do meio para isolamentos.

Termos para indexação: acidez do solo.

EVALUATION OF THE GROWTH OF RHIZOBIUM LEGUMINOUS FOREST TREE ON DIFFERENT CULTURE MEDIA

ABSTRACT - *Rhizobium* isolations from leguminous forest tree nodules in conventional manitol medium (YMA) pH 6.8, carried out at the INPA laboratory, have frequently been unsuccessful. In this study, media with different pH levels and/or carbon sources (xilose (YXA) pH 5.0, YXA pH 7.0, manitol (YXA) pH 5.0, YMA pH 7.0) were evaluated as substrates for *Rhizobium* isolations from 17 tropical leguminous tree species. *Rhizobium* strains were isolated from all nodules tested, but depending on nodule procedence, isolates were obtained only in certain media. For the majority of nodules tested, *Rhizobium* isolation was only possible in media with pH 5.0. In relation to the carbon source, there were no differences, e.g., the same number of isolates were obtained in both carbon sources tested. The results suggest that genetic variability for pH preference occurs in *Rhizobium* populations in "terra-firme" Amazonian forest and that studies about these associations must consider the isolation media.

Index terms: soil acidity.

¹ Pesquisa financiada pelo Projeto POLAMAZÔNIA, INPA/CNPq.

² Bolsista do CNPq. Aluno do Curso de Agronomia da Fundação Universidade do Amazonas.

³ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - I.N.P.A., Departamento de Silvicultura Tropical, Estrada do Aleixo, 1756 - 69000 Manaus, AM.

INTRODUÇÃO

Na Amazônia tropical, os vários tipos de solo, em sua maior extensão pobres em nutrientes e com baixos valores de pH, suportam uma vegetação bastante heterogênea. A família Leguminosae é uma das famílias botânicas mais abundantes em termos de indivíduos (Klinge & Rodrigues 1971), e apresenta a maior diversidade em espécies, sendo alguma delas importantes no mercado madeireiro atual, segundo Loureiro et al. (1979). A ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme da Amazônia brasileira foi reportada por diversos autores (Norris 1969; Silvester-Bradley et al. 1980 e Magalhães et al. 1982). No entanto, tentativas de isolamento de *Rhizobium* dos nódulos destas espécies em meio convencional (YMA) com pH neutro, realizadas no laboratório de microbiologia do solo do INPA (Oliveira & Asakawa, dados não-publicados), várias vezes não foram bem sucedidas. Neste trabalho, foram avaliados meios de cultura diferindo quanto à fonte de carbono e pH, como substratos para o isolamento de *Rhizobium* dos nódulos de algumas espécies de leguminosas florestais da Amazônia.

MATERIAL E MÉTODOS

Nódulos de mudas de leguminosas florestais tropicais, juntamente com a parte aérea para posterior identificação, foram coletadas em duas reservas florestais do INPA: Reserva Ducke e Estação Experimental de Silvicultura Tropical do km 60. De cada espécie, um nódulo foi selecionado e, após esterilização da superfície, esmagado em dois ml de água destilada estéril. A suspensão de cada nódulo foi riscada nos seguintes meios de cultura, diferindo quanto à fonte de carbono e/ou pH: Manitol (YMA), com valores de pH 5,0 e 7,0 e xilose (Y X A), com valores de pH 5,0 e 7,0. Em todos os meios foi adicionado por litro: 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g NaCl; 100 ml de água de levedura; 0,4 g KH_2PO_4 , 0,1 g K_2HPO_4 ; 20 ml de azul de bromotimol (solução alcoólica). Foram feitas duas repetições por tratamento. A xilose ou manitol foram adicionados na base de 5 g/l, conforme a composição do meio. A xilose foi esterilizada separadamente por filtração de solução aquosa em papel de filtro "Millipore" (poro 0,2 μm), e adicionada ao meio com os demais sais após autoclavagem. O agar foi adicionado na dosagem de 15 g/l nos meios de pH 7,0 e de 25 g/l nos meios de pH 5,0. Colônias isoladas de cada meio foram armazenadas em tubos com tampa rosqueável, contendo meio correspondente ao isolamento, e posteriormente foram testadas quanto à capacidade de induzir nodulação em siratro (*Macropitium atropurpureum*). A identificação das espécies florestais em estudo foi feita pelo Departamento de Botânica do INPA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra o resultado do crescimento de *Rhizobium* de nódulos de 17 espécies de árvores florestais nos meios manitol (YMA) ácido, manitol (YMA) neutro, xilose (XYA) ácido e xilose (XYA) neutro. Todos os isolados relacionados nesta Tabela foram capazes de induzir nodulação em siratro. No entanto, alguns isolados (4), apresentando características típicas de *Rhizobium* que não induziram nodulação em siratro, não foram incluídos, e deverão ser testados posteriormente em outra espécie. O número de repicagens de cada nódulo em cada tipo de meio não permite conclusões a respeito da seletividade de crescimento de cada estirpe, ou seja, a falta de crescimento e/ou obtenção de isolados de determinada estirpe num tipo de meio pode ter sido devido a perdas na repicagem dos bacteróides para o meio de cultura ou durante o processo de isolamento. Porém, pelo número total de isolados obtidos em cada tipo de meio, pode-se notar que foram obtidos isolados em todos os tipos de meio utilizados e em maior número nos meios de pH ácido. Não houve diferença entre as fontes de carbono, embora, em meio ácido com

xilose, tenha sido obtido o maior número de isolados. O tipo de *Rhizobium* encontrado foi variável. A Tabela 2 mostra que foram isoladas estirpes com características de crescimento diferentes, sendo algumas com crescimento mais rápido que outras.

TABELA 1. Crescimento de *Rhizobium* sp, isolado de diferentes espécies de leguminosas florestais tropicais em quatro tipos de meio de cultura.

Subfamília	Espécie	Nome vulgar	Crescimento*			
			YXY		YMA	
			pH5	pH7	pH5	pH7
Mimosoideae	<i>Cedrelinga catenaeformis</i>	Cedrorana	+	-	-	+
	<i>Inga</i> sp. 1	Ingá-de-capoeira	+	-	+	-
	<i>Inga</i> sp 2	Ingá-comum	-	-	-	+
	<i>Inga</i> sp 3	Ingá-de-mata	-	+	-	-
	<i>Inga</i> sp 4	Ingá-vermelho	-	-	+	-
	<i>Inga</i> sp 5	Ingá	+	-	+	-
	<i>Inga</i> sp 6	Ingá	-	-	+	+
	<i>Parkia multijuga</i>		+	-	-	+
	<i>Pithecellobium</i> sp	Faveira-parkia	+	-	+	-
	<i>Pithecellobium racemogum</i>	Angelim-rajado	+	-	-	-
Papilionoideae	<i>Derris</i> sp		-	-	-	+
	<i>Hymenolobium</i> sp 1	Sucupira-preta	+	-	-	-
	<i>Hymenolobium</i> sp 2	Sucupira-vermelha	-	-	+	-
	<i>Mucuna</i> sp		+	-	+	-
Caesalpinioideae	<i>Swartzia</i> sp 1	Muiragibóia girimum	+	-	-	-
	<i>Swartzia</i> sp 2	Sucupira	+	-	-	-
	<i>Dimorphandra</i> sp		+	-	-	-
Número total de isolados			11	1	7	5

* Provenientes de um único nódulo de cada espécie; (+) cresceu e (-) não cresceu.

TABELA 2. Características culturais e morfológicas de estirpes de *Rhizobium* sp., isoladas de leguminosas florestais tropicais em diferentes meios de cultura.

Origem da estirpe	Meio de cultura*	pH	Colônias		
			Diâmetro máximo (mm)	Tempo p/atingir Ø max. (dias)	Aspecto
<i>Hymenolobium</i> sp	YXA	5	1,5	6	branca
<i>Inga</i> sp	YXA	5	0,5	6	branca
	YMA	5	0,5	6	branca
<i>Inga</i> sp 3	YXA	7	2,5	6	amarelada
<i>Inga</i> sp 5	YMA	5	2,5	3	branca-amarelada
<i>Inga</i> sp 6	YMA	5	1,5	3	branca
	YMA	5	1,5	3	branca
<i>Parkia multijuga</i>	YXA	5	2	6	translúcida
<i>Pithecellobium</i> sp	YMA	5	2	3	branca-amarelada
<i>Swartzia</i> sp	YXA	5	0,5	6	branca

* Meios de isolamento.

Os resultados do presente trabalho sugerem que existe variabilidade em relação à população de *Rhizobium* presente em floresta de terra firme da Amazônia, e que, em estudos sobre as associações de *Rhizobium* com leguminosas florestais, deve-se dedicar atenção para a constituição dos meios de isolamento e multiplicação das estirpes a serem testadas.

REFERÊNCIAS

- KLINGE, H. & RODRIGUES, W.A. Matéria orgânica e nutrientes na mata de terra firme perto de Manaus. *Acta Amaz.*, 1(1):69-72, 1971.
- LOUREIRO, A.A.; SILVA, M.F. da & ALENCAR, J.C. Essências madeireiras da Amazônia. INPA, 1979. v.1 e v.2.
- MAGALHÃES, F.M.M.; MAGALHÃES, L.M.S.; OLIVEIRA, L.A. de & DÖBEREINER, J. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme nativas da Região de Manaus, AM. *Acta Amaz.*, 12(3):509-14, 1982.
- NORRIS, D.O. Observations on the nodulation status of rainforest leguminous species in Amazonia and Guyana. *Trop. Agric. (Trin)* 46:145-51, 1969.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; OLIVEIRA, L.A. de; PODESTÁ FILHO, J.A. de & ST. JOHN, T.V. Nodulation of legumes, nitrogenase activity of roots and occurrence of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp in representative soils of Central Amazonia. *Agro-Ecosystems*, 6:249-66, 1980.