

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM SPP. DE LEGUMINOSAS FLORESTAIS EM MEIO DE CULTURA TOLERANTES À ACIDEZ E À TOXIDEZ DO AL

GISELE GOMES DA SILVA¹ AVILIO A. FRANCO²

RESUMO - Estirpes de *Rhizobium* sp., isoladas de várias espécies de leguminosas arbóreas de ecossistemas diversos, foram testadas em meio de cultura, para seleção das estirpes capazes de crescer, sob condições de acidez.

De 211 estirpes de *Rhizobium* testadas, 85,7%, 48,8% e 28,0% isoladas, respectivamente, das subfamílias *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae* cresceram em meio de cultura com pH 4,6 com e sem 50 μM Al^{3+} . Uma estirpe cresceu na ausência, mas não cresceu na presença de Al^{3+} .

Os resultados mostraram ainda que das 211 estirpes originalmente testadas, 77 cresceram após aumentar o pH do meio e somente 19 foram capazes de crescer em pH 4,6 sem antes elevar o pH do meio. Para seleção de estirpes para solos ácidos, somente estas deveriam ser testadas na planta, abreviando assim o processo.

Termos para indexação: leguminosa arbórea, simbiose.

SELECTION OF RHIZOBIUM SPP. STRAINS IN CULTURE MEDIUM FOR ACID SOILS

ABSTRACT - A group of *Rhizobium* sp. strains isolated from several legume trees from diverse environments was assayed in culture medium at pH 4,6 with and without 50 μM Al^{3+} , using bromocresol green indicator and at pH 6,2 using bromocresol purple indicator.

From 211 *Rhizobium* strains isolated from legume trees, 85.7%, 48.8% and 28.0% from the subfamilies *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* and *Papilionoideae* respectively did grow in culture medium with pH 4.6 and without 50 μM Al^{3+} . One strain did grow without but not with Al^{3+} .

Of the 211 strains 77 grow after increasing the pH of the medium and only 19 were able to grow at pH 4,6 without increasing the pH of the medium. These strains seem the most promising for further tests with plants for acid soils.

Index terms: legume tree, symbiosis.

¹ Estudante de Engenharia Florestal da UFRRJ, bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

² Pesquisador III da - EMBRAPA-UAPNBS, km 47 Seropédica, 23460 Rio de Janeiro.

INTRODUÇÃO

O estabelecimento e o desenvolvimento das diversas etapas da interação *Rhizobium* - leguminos dependem direta ou indiretamente das condições do ambiente do solo, onde o sistema simbiótico se desenvolve.

Tanto a sobrevivência do *Rhizobium* no solo (Schmidt 1978) como o processo de infecção e formação de nódulos (Munns 1977) são sensíveis ao pH ácido, que afeta também em intensidade variável o crescimento das plantas (Carvalho 1978; Munns & Franco 1981).

O incremento da fixação biológica de nitrogênio, especialmente em pastagens e reflorestamento onde é pouco viável modificar as condições do pH do solo, está condicionado à obtenção de *Rhizobium* eficiente e adaptado a estas condições pouco favoráveis.

A pré-seleção em meio de cultura ácido pode abreviar o processo de seleção, eliminando as estirpes que não são capazes de se multiplicar em pH baixo (Graham et al. 1982), ficando o teste de eficiência restrito às estirpes tolerantes.

Este trabalho objetiva pré-selecionar em meio de cultura ácido as estirpes existentes na EMBRAPA/UAPNPBS, isoladas de leguminosas florestais.

MATERIAIS E MÉTODOS

O meio de cultura foi preparado segundo Ayanaba et al. (1981), constando de: 5 μM K_2HPO_4 , 5 μM KH_2PO_4 , 750 μM K_2SO_4 , 10 μM KCl , 300 μM MgSO_4 , 300 μM CaCl_2 , 1 μM MnSO_4 , 0,1 μM CuSO_4 , 0,02 μM NaMoO_4 , 0,002 μM $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, 100 μM Fe-EDTA , 5 g/l D-arabinose, 5 g/l D-galactose, 1,8 g/l glutamato de Na, 20 g/l agar, sendo ainda acrescentado 0,4 g/l de extrato de levedura Difco.

Foi preparado um meio de cultura com pH 4,6 com e sem 25 μM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, ambos contendo 0,005% de verde de bromocresol e pH 6,2 contendo 0,005% de bromocresol púrpura. O pH do meio foi ajustado após esterilização, usando soluções de H_2SO_4 ou KOH 0,5% também esterilizados. A solução de alumínio foi esterilizada por filtração em membrana "millipore" e adicionada ao meio após esterilização deste.

As estirpes de *Rhizobium* da coleção de culturas da EMBRAPA/UAPNPBS km 47, originalmente mantidas em meio de cultura 79 de Fred & Waksman (1928), foram purificadas e repicadas para tubos contendo o meio com pH 6,2, onde cresceram por, aproximadamente, uma semana a 30°C. A seguir um esfregaço de cada cultura foi transferido para 3 ml de solução estéril dos sais componentes do meio de cultura diluída cinco vezes, visando obter em torno de 10^5 bactérias/ml. Desta suspensão foi repicado aproximadamente 40 μl para as placas com meio pH 6,2, pH 4,6 e pH 4,6, usando uma alça platina calibrada. Cada estirpe foi repicada em duas placas para cada tratamento; com as placas divididas em quadros de 1 cm^2 puderam receber 12 estirpes diferentes. As placas foram incubadas a 30°C e diariamente foram efetuadas observações do desenvolvimento das colônias e das mudanças do pH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 211 estirpes de leguminosas arbóreas testadas, 45% (95 estirpes) cresceram em pH 4,6, sendo que 76 destas estirpes alcalinizaram o meio, 15 estirpes cresceram sem modificar o pH e as restantes (4) acidificaram o meio (Tabela 1).

TABELA 1. Tolerância em meio de cultura de *Rhizobium* sp. isolados de diversos florestais a pH baixo.

Espécies	Número de estirpes de <i>Rhizobium</i> sp				
	testadas	Resistentes		com produção de alcali	
		pH 4,6	pH 4,6 + Al	pH 6,2	pH 4,6
Subfamília MIMOSOIDEAE					
<i>Acacia mollissima</i>	6	2	2	1	1
<i>Albizia falcataria</i>	5	0	0	0	0
<i>Albizia lebbek</i>	5	3	2	1	1
<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	2	2	2	2	2
<i>Entada polyphyla</i>	2	1	1	1	1
<i>Enterolobium timbouva</i>	8	0	0	0	0
<i>Inga marginata</i>	3	1	1	0	0
<i>Leucaena leucocephala</i>	19	1	1	0	0
<i>Mimosa acutistipula</i>	4	4	4	4	4
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	31	26	26	25	25
<i>Mimosa invisa</i>	1	1	1	1	1
<i>Mimosa malacocentra</i>	3	3	3	3	3
<i>Mimosa scabrella</i>	17	17	17	16	17
<i>Piptadenia gonocantha</i>	14	12	12	12	12
<i>Pithecoelobium multiflorum</i>	11	0	0	0	0
<i>Plathymenia</i> sp	5	0	0	4	0
<i>Prosopis juliflora</i>	6	1	1	1	1
<i>Samanea saman</i>	12	1	1	0	0
Subfamília FABOIDEAE					
<i>Bowdichia virgilioides</i>	2	0	0	0	0
<i>Centrolobium tormentosum</i>	8	0	0	0	0
<i>Clitoria fairchildiana</i>	6	5	5	5	5
<i>Dalbergia nigra</i>	6	0	0	0	0
<i>Erythrina speciosa</i>	5	0	0	0	0
<i>Lonchocarpus discolor</i>	2	2	2	0	0
<i>Lonchocarpus sericeus</i>	1	0	0	0	0
<i>Lonchocarpus</i> sp	3	0	0	0	0
<i>Machaerium</i> sp	8	7	7	7	1
<i>Poecilanthus</i> sp	4	0	0	0	0
<i>Sesbania marginata</i>	5	0	0	0	0
Subfamília CAESALPINIOIDEAE					
<i>Cassia calycioides</i>	2	2	2	1	1
<i>Dimorphandra mollis</i>	3	3	3	2	0
<i>Tachigalia</i> sp	2	2	2	1	1

Em relação às subfamílias de onde foram isoladas estas estirpes, a relação decrescente de tolerância a pH 4,6 foi: Caesalpinoideae (85,7%), Mimosoideae (48,7%) e Papilionoideae (28,0%).

Dentro das diferentes tribos (Tabela 2) e até mesmo dentro do mesmo gênero, observaram-se respostas diferentes quanto ao crescimento em pH baixo, como no caso de *Albizia lebbek*, com três estirpes tolerantes, e *Albizia falcataria* com nenhuma. O gênero *Mimosa* presente com cinco espécies mostrou-se mais homogêneo quanto à tolerância, já que 51 das 56 estirpes testadas cresceram em pH baixo.

A tolerância à acidez das estirpes de leguminosas florestais foi relacionada à espécie, e parece estar ligada às condições da região de ocorrência natural das espécies de onde foram isoladas. Esta tendência evidencia-se nos casos de espécies com maior número de estirpes como *Leucaena leucocephala* e *Samanea saman* de origem em solos de pH mais alto, onde as estirpes podem ser classificadas como não-tolerantes e *Piptadenia gonoacantha* de ocorrência em solos ácidos, onde a maioria das estirpes mostrou-se capaz de crescer em pH baixo.

Na subfamília Papilionoideae as três espécies do gênero *Lonchocarpus* apresentaram estirpes não-tolerantes nas espécies *Lonchocarpus sericeus* e *Lonchocarpus* sp, entretanto, na espécie *Lonchocarpus discolor*, as estirpes tiveram habilidade de crescer em pH baixo sem alcalinizar o meio.

As estirpes da subfamília Caesalpinoideae apresentaram a maior porcentagem de estirpes tolerantes à acidez, entretanto, o número de estirpes testadas (7) foi reduzido, o que prejudica uma comparação com as demais subfamílias.

TABELA 2. Tolerância de *Rhizobium* sp a pH baixo por tribo e subfamília^a

Subfamília	Tribo	Número de espécies	Número de estirpes de <i>Rhizobium</i>	% de estirpes tolerantes a pH 4,6
Papilionoideae	<i>Dalbergiae</i>	3	22	31,8
	<i>Phaseoleae</i>	2	11	45,5
	<i>Tephrosieae</i>	4	10	20,0
	<i>Robinieae</i>	1	5	0
	<i>Sophoreae</i>	1	2	0
	Total	11	50	28,0
Mimosoideae	<i>Acaciaeae</i>	1	6	33,3
	<i>Mimoseae</i>	11	104	65,4
	<i>Ingeae</i>	6	44	11,4
	Total	18	154	48,8
Caesalpinoideae	<i>Caesalpinieae</i>	2	5	80,0
	<i>Cassieae</i>	1	2	100,0
	Total	3	7	85,7

^a As espécies foram agrupadas em tribos, segundo Polhill & Raven (1978).

Exceto para uma estirpe isolada de *Albizia lebbek*, todas as estirpes que cresceram em pH 4,6 cresceram também na presença de $50 \mu\text{M Al}^{3+}$, apresentando, entretanto, um decréscimo generalizado na velocidade de crescimento. Keyser & Munns (1979) mostraram que mesmo estirpes tolerantes têm seu crescimento reduzido em função da presença de Al, que também aumenta a "lag fase", e este decréscimo poderia prejudicar a colonização do solo, rizosfera e a nodulação.

Os resultados deste trabalho indicam que as características de tolerância das estirpes podem estar ligadas às espécies, mas ocorre variação dentro do conjunto de estirpes do mesmo gênero e também de mesma espécie. Das 211 estirpes testadas, somente 19 estirpes foram capazes de crescer em pH 4,6 sem alcalinizar o meio antes do aparecimento da colônia, portanto, deverão ser testadas na planta para obtenção de estirpes para solos ácidos.

REFERÊNCIAS

- AYANABA, A.; ASANUMA, A. & MUNNS, D.N. An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to aluminium. In: AMER. RHIZOBIUM CONFERENCE, 13, Winnipeg-Canadá, 1981. Anais. . .
- CARVALHO, M.M. A comparative study of response of six *Stylosanthes* species to acid soil factors with particular reference to Al. Queensland, University of Queensland, 1978. Tese Doutorado.
- FRED, E.B. & WAKSMAN, S.A. Laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw-Hill Book Company, 1928. 145p.
- GRAHAM, P.H.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.T. & PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Phaseolus vulgaris*. Field Crop Res., 5:121-8, 1982.
- KEYSER, H.H. & MUNNS, D.N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminium and phosphate. Soil Sc. Soc. of Am. J., 43:519-23, 1979.
- MUNNS, D.N. Soil acidity and related factors. In: VINCENT, J.M., ed. Exploiting the legume *Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. University of Hawaii, 1977. p.211-36. (Univ. Hawaii College Trop. Agric. Misc. Publ., 145).
- MUNNS, D.N. & FRANCO, A.A. Soil constraints to legume production. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C. eds. Biological nitrogen fixation tech. for tropical agric. Cali, Colombia, CIAT, 1981. p.133-52.
- POLHILL, R.M. & RAVEN, P.H. Advances in legume systematics. In: PROC. INT. LEGUME CONFERENCE, Kew, 1978. Part 2, p.1049.
- SCHMIDT, E.L. Legume symbiosis - Ecology of the legume root nodule bacteria. In: DOMMERGUES, Y.R. & KRUPA, V. eds. Interactions between non pathogenic soil microorganisms and plants. 1978. p.269-303. (Série Elsevier Scientific Publishing Company).