

**INOCULAÇÃO CRUZADA EM *MINOSA BIMUCRONATA* (D.C.) O. KUNTZE) E
MINOSA SCABRELLA (BENTHAM) DE ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM* spp
ISOLADAS DESTAS ESPÉCIES EM SANTA CATARINA**

GERSON HENRIQUE WUTHSTRACK
GERMANO NUNES SILVA FILHO

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (88049) Florianópolis, SC - Brasil.

RESUMO

Verificou-se a ocorrência de inoculação cruzada em maricã (*Mimosa bimucronata* (D.C.) O. Kuntze) e bracatinga (*M. scabrella* Benthham) pela inoculação de isolados obtidos de nódulos coletados de ambas as espécies em diferentes regiões do estado. As plântulas foram cultivadas axenicamente em tubos de ensaio contendo meio de Jensen suplementado com solução de micronutrientes em casa de vegetação.

O maricã nodulou com todos os isolamentos em pelo menos 1 dos 3 tubos inoculados, e a bracatinga com a quase totalidade dos isolados de maricã. Tais dados demonstram a ocorrência de inoculação cruzada e que algumas estirpes podem ser específicas. Como alguns isolados não nodularam nenhuma das plântulas dos 3 tubos ou nodularam em 1 ou 2, suspeita-se que possa ter ocorrido problemas no meio utilizado, ou que as plântulas eram muito jovens, ou ainda devido à grande variabilidade das sementes.

UNITERMOS: Inoculação cruzada - *Bradyrhizobium* - Nodulação.

Cross inoculation of *Mimosa bimucronata* (D.C.) O. Kuntze) and *Mimosa scabrella* (Bentham) with strains of *Bradyrhizobium* spp obtained from these species in Santa Catarina.

ABSTRACT

The occurrence of cross inoculation of "marica" (*Mimosa bimucronata* (D.C.) O. Kuntze) and "bracatinga" (*M. scabrella*) by isolates obtained from nodules collected in both species was verified in different regions in the State of Santa Catarina. Seedlings were axenically cultivated in tubes of Jensen medium supplemented by a micronutrient solution and were maintained in the growth chamber.

"Marica" formed nodules after inoculation in at least 1 out of 3 inoculated tubes and "bracatinga" with almost all isolates of "marica". These data show the occurrence of cross inoculation and the specificity of some strains. As some isolates did not induce nodulation or nodulation occurred in only 1 or 2 seedlings it is possible that the medium used might not be adequate or that seedlings age or genetic variability might have influenced the results.

KEY WORDS: Cross inoculation - *Bradyrhizobium* - Nodulation.

Introdução

A fixação biológica do nitrogênio é o sistema que mais contribui para reciclar o nitrogênio atmosférico (Franco, 1982), sendo que, mediante tal processo, a maioria das espécies de leguminosas têm a capacidade de abastecer todas as suas necessidades com relação ao nitrogênio (Silva e Dobereiner, 1982). Além disso, tais plantas podem contribuir para a manutenção da fertilidade dos solos (através da adição de nitrogênio), bem como restaurar características físicas, químicas e biológicas de solos degradados (Vidor et al., 1983).

Como há um grande número de espécies de leguminosas (mais de 1300, segundo Joly, 1983) e uma grande variabilidade de rizóbios, ocorre a inoculação cruzada. Um grupo de inoculação cruzada se refere a um conjunto de espécies de leguminosas que desenvolvem nódulos quando em contato com rizóbios obtidos

INOCULAÇÃO CRUZADA

de nódulos de qualquer membro desse grupo particular de plantas (Alexander, 1980). São estabelecidos mais de 20 grupos de inoculação cruzada, dos quais somente sete são de importância. Destes grupos, seis são suficientemente delimitados para que a bactéria responsável pela nodulação seja classificada quanto à sua espécie. Os demais grupos de inoculação cruzada são incluídos num grupo denominado caupi, ao qual pertence a maioria das leguminosas tropicais (Norris, 1967, apud Campelo e Campelo, 1970).

As leguminosas tropicais são caracterizadas por apresentarem associação simbiótica com rizóbios que infectam leguminosas fora de sua classe particular, não havendo uma maior especificidade entre a bactéria e a planta. A inoculação cruzada, pode ser benéfica ou não às plantas hospedeiras, já que uma estirpe que nodula e fixa nitrogênio eficientemente em determinada espécie de leguminosa pode apresentar baixo potencial de fixação em outras leguminosas, que nodulam e fixam de forma eficaz com outras estirpes (Vidor et al., 1983). A má eficiência na nodulação e fixação do nitrogênio, acarreta prejuízos à planta hospedeira quanto ao seu crescimento (principalmente em solos pobres), além de reduzir a quantidade de matéria orgânica e, conseqüentemente, de nitrogênio adicionado ao solo.

Dentre as leguminosas nativas de Santa Catarina, encontramos o maricã (*Mimosa bimucronata* (D.C.) O. Kuntze) e a bracinga (*Mimosa scabrella* Benth). O maricã é uma arvoreta característica e exclusiva da "floresta ombrófila densa" (Santa Catarina, 1986). É uma espécie muito rústica, indicada para programas de revegetação em áreas de mineração, terrenos pedregosos e rasos, e em solos erodidos (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1986), contribuindo para a melhoria das condições físicas, químicas e biológicas desses solos. Sua madeira é considerada de primeira qualidade como lenha, queimando mesmo verde (EMBRAPA, 1986), sendo que sua maior utilização está no suprimento de lenha para olarias, padarias e demais fornalhas (Reitz et al., 1978). Também é citado seu uso na marcenaria, carpintaria, produção de moirões, cercas vivas (Bur-

kart, 1979), e na estabilização de voçorosas (Rio Grande do Sul. Secretaria de Agricultura, 1983).

A bracatinga tem ocorrência natural nas submatas dos pinhais em todo o planalto do Estado de Santa Catarina, aparecendo como elemento estranho nos núcleos de pinhais existentes na "floresta ombrófila densa" (Reitz et al., 1978; Santa Catarina, 1986). A bracatinga é uma espécie de rápido crescimento e pouco exigente quanto às condições físicas e químicas dos solos (Reitz et al., 1978; Burkart, 1979; Catharino et al., 1982 e Poggiani et al., 1982). É recomendada para uso em reflorestamento nas regiões de ocorrência natural, fornecendo lenha, carvão, madeira branca, celulose e pode servir como forrageira nos estágios iniciais de crescimento (Silva e Dobereiner, 1982; Klein et al., 1983).

Devido às suas características, a bracatinga tem sido introduzida em regiões afastadas do seu habitat natural, inclusive no litoral catarinense, região de ocorrência natural do maricã, que nodula abundantemente com rizóbio nativo. Pelo fato de ambas as espécies pertencerem ao mesmo gênero, é possível que haja a ocorrência de inoculação cruzada, embora provenham de habitats naturais distintos.

Desta forma, procuramos desenvolver o presente trabalho para verificarmos a ocorrência ou não da inoculação cruzada em maricã e bracatinga, pela inoculação de estirpes isoladas de nódulos coletados em ambas as espécies em diferentes regiões do Estado de Santa Catarina.

Material e Métodos

1) Obtenção dos Isolamentos

Os isolamentos foram obtidos a partir de nódulos coletados de raízes de árvores de bracatinga (*M. scabrella*) tomadas ao acaso, situadas nas localidades de Três Riachos (Biguaçu - SC), Ribeirão Matilde (Atalanta - SC) e no Campus Universitário da UFSC (Florianópolis - SC). Os isolamentos de maricã (*M.*

INOCULAÇÃO CRUZADA

bimucronata) foram obtidos de raízes de árvores localizadas ao longo da BR-101 (trajeto Florianópolis-Itajaí, SC), na estrada que liga Itajaí a Brusque - SC e no Campus Universitário da UFSC. No local da coleta, retirou-se superficialmente o solo ao redor das plantas, até se localizar as raízes finas onde estavam os nódulos. Após a remoção das raízes, os nódulos foram guardados em sacos plásticos, com etiquetas indicando seu local de coleta.

Em laboratório, os nódulos foram lavados em água corrente e, em seguida, passaram pelo processo de desinfecção, que consistia numa imersão em álcool 70% por 30 segundos e formol 5% durante 2 minutos, sendo em seguida lavados por sete vezes em água esterilizada.

Cada nódulo, após a desinfecção, foi colocado em tubo de ensaio contendo 2 ml de água estéril e, em seguida, macerado com auxílio de bastão de vidro previamente esterilizado, para a liberação das bactérias.

Depois da maceração, com auxílio de alça de platina estéril, foi realizada a semeadura dos rizóbios em placas de Petri contendo 10 ml do meio de cultura "MANITOL AGAR (Vincent, 1975), com vermelho congo". Depois disso, as placas foram postas a incubar em estufa a 30°C.

Passado um período de 3 a 5 dias de incubação, foi escolhida uma colônia, por placa, com características culturais de rizóbio (Vincent, 1975), a qual foi repicada por sucessivas vezes, até a obtenção de cultura pura. Estas foram repicadas para tubos de ensaio contendo 4 ml do meio "MANITOL AGAR com vermelho congo" inclinado que, passado o período de incubação, foram guardados em geladeira para posterior utilização.

Dois isolamentos de maricã foram obtidos do Laboratório da EMBRAPA-PNPBS, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro - RJ.

Cada isolamento foi codificado pela ordem de obtenção da cultura pura, tendo como iniciais UFSC-MIP-001 e UFSC-MIP-002, para maricã e bracatinga, respectivamente.

2) Obtenção das Plântulas

As plântulas foram obtidas de sementes desinfectadas (de acordo com procedimento utilizado na desinfecção dos nódulos) e pré-germinadas em placas de Petri contendo meio de cultura de Jensen (1942), suplementado com solução de micronutrientes (Gibson, 1963), ambos citados por Vincent (1975), e mantidas em estufa a 30°C.

As plântulas pré-germinadas (com radícula de 1 a 3 mm), foram transplantadas para tubos de ensaio (18 x 180) contendo 10 ml de meio de cultura esterilizado. Foram utilizadas 2 plântulas por tubo.

Antecedendo à desinfecção, foi realizada a quebra de dormência das sementes, segundo metodologia citada pelo LASEF-Horto Botânico-UFSC (Informação pessoal). As de maricã tiveram a dormência quebrada mediante imersão em ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos, seguidas de lavagem em água corrente. As sementes de bracatinga sofreram procedimento semelhante, alterando apenas o tempo de imersão no ácido para 3 minutos.

3) Inoculação Cruzada

Quando as plântulas apresentavam as folhas cotiledonares completamente desenvolvidas, foram inoculadas com culturas de *Bradyrhizobium* (inoculadas por 24 horas a 30°C), mediante uso de alça de platina estéril, através de picada junto da raiz das plântulas.

Cada isolamento foi inoculado em 6 tubos de ensaio, sendo 3 tubos com plântulas de maricã por tubo e 3 tubos com 2 plântulas de bracatinga por tubo.

Como controle, foram deixados 3 tubos com plântulas de maricã e 3 tubos com plântulas de bracatinga sem inoculação.

Os tubos contendo as plântulas foram colocados em casa de vegetação sob condições de meio ambiente, sendo semanalmente examinados para verificação da ocorrência de nodulação. As observações foram feitas até um período de 60 dias, a partir do qual, geralmente, era verificada a morte das plântulas.

INOCULAÇÃO CRUZADA

Resultados e Discussão

De acordo com os dados apresentados na tabela I, observou-se que todos os isolamentos obtidos a partir de nódulos coletados em raízes de bracatinga, quando inoculados em plântulas de maricã, induziram a formação de nódulos em pelo menos 1 dos 3 tubos inoculados e, que de acordo com a tabela II, a quase totalidade dos isolamentos de nódulos de raízes de maricã também induziram a formação de nódulos na bracatinga em pelo menos 1 dos 3 tubos inoculados.

Tabela I - Formação de nódulos em plântulas de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) e maricã (*Mimosa bimucronata* (D.C.) O. Kuntze) inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* spp isoladas de nódulos de raízes de bracatinga.

Código do Isolamento	Bracatinga Repetições			Maricã Repetições		
	I	II	III	I	II	III
UFSC-MIP - 002 / 002	+1/	+	+	+	+	+
003	+	+	+	+	+	+
004	+	+	+	+	+	+
005	+	+	+	+	+	+
006	+	+	+	+	+	+
007	+	+	+	+	+	+
008	+	+	-	+	+	+
009	-	-	-	+	-	-
010	-	+	-	+	+	+
011	-	-	+	+	+	+
013	+	+	+	+	+	+
014	+	+	-	+	+	+
015	+	+	+	+	+	+
016	-	+	-	+	+	+
017	-	+	-	+	+	+
018	+	+	+	+	+	+
019	-	+	+	+	+	+
020	+	+	-	+	+	+
021	-	+	+	+	+	+
022	-	+	+	+	+	+
023	+	+	+	+	+	+
028	+	-	+	+	+	+
029	+	+	-	+	+	+
030	-	+	-	+	+	+
031	+	+	+	+	+	+
032	+	+	+	+	+	+
033	-	-	+	+	-	-
034	-	+	+	+	+	+

1/ + = Presença de nódulos - = Ausência de nódulos

Tabela II - Formação de nódulos em plântulas de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) e maricã (*Mimosa bimucronata* (D.C.) O. Kuntze) inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* spp isoladas de nódulos de raízes de maricã.

Código de Isolamento	Bracatinga Repetições			Maricã Repetições		
	I	II	III	I	II	III
UFSC-MIP - 001 / 001	-1/	+	+	+	+	+
002	+	+	+	+	+	+
003	+	+	-	+	+	+
004	-	-	-	+	+	+
005	+	-	+	+	+	+
007	+	+	+	+	+	+
010	+	+	+	+	+	+
011	+	+	+	+	+	+
013	+	+	+	+	+	+
017	+	+	-	+	+	+
018	+	+	-	+	+	+
020	-	+	+	+	+	+
021	-	-	-	+	+	+
022	+	+	-	+	+	+
023	-	+	-	+	+	+
024	-	-	+	+	+	+
025	+	-	+	+	+	+
027	+	+	-	+	+	+
028	+	+	+	+	+	+
029	-	+	+	+	+	+
030	+	+	-	+	+	+
032	+	+	-	+	+	+
033	+	+	+	+	+	+
034	+	+	+	+	+	+
035	+	-	+	+	+	+
036	-	-	-	+	-	+
039	+	-	+	+	-	+
041	+	+	+	+	+	+
042	+	+	+	+	+	+

1/ + = Presença de nódulos

- = Ausência de nódulos

Os isolamentos de maricã, UFSC-MIP 001/004; 001/021 e 001/036 (Tabela II), não formaram nódulos em bracatinga, sugerindo que algumas estirpes podem ser específicas para o maricã. Porém, pode ter ocorrido que as condições nas quais foi conduzido o experimento impediram a infecção ou a nodulação. Observa-se também que a estirpe UFSC-MIP 002/009 (Tabela I), isolada de nódulos de raízes de bracatinga, não nodulou tal espécie,

INOCULAÇÃO CRUZADA

mas induziu a nodulação em plântulas de maricã, embora o tenha feito em apenas 1 dos 3 tubos inoculados.

Como todos os isolamentos de maricã e de bracatinga infectaram plântulas de maricã em pelo menos 1 tubo, supõe-se que uma das questões que pode ter ocasionado a não nodulação de raízes de bracatinga pelas estirpes UFSC-MIP 001/004; 001/021; 001/036 e 002/009, deva estar relacionada com o meio de cultura utilizado. Segundo informação pessoal de Franco (1987), tem-se observado um alto desenvolvimento de plântulas de bracatinga em pH 5,0, sendo que acima ou abaixo deste valor as plantas não têm tido um bom desenvolvimento, fato também ocorrido quando em altas concentrações de fósforo; as condições adversas acima mencionadas prevaleceram no meio de cultura por nós utilizado (pH 7,0 e alta concentração de fósforo).

Outra questão que pode ter influenciado a não nodulação das raízes pelas estirpes anteriormente citadas, deve estar relacionada com a pequena idade das plântulas, já que em trabalho realizado com *Erythrina cristagalli*, Gaiad e Carpanezzi (1984) aventam a hipótese de que a ausência de nódulos nas mudas desta espécie, esteja relacionadas com a pouca idade das mudas (3 meses), uma vez que naturalmente, no campo, foi encontrada nodulação.

Vale salientar ainda que, devido às sementes serem de procedência desconhecida, existe a possibilidade de que haja uma alta variabilidade genética, pois além das estirpes UFSC-MIP 001/004; 001/021; 001/036 e 002/009 não terem induzido a formação de nódulos em bracatinga, verifica-se que muitos isolamentos só nodularam em 2 ou em apenas 1 das plântulas de 1 só tubo. Se considerarmos que a variabilidade genética dessas sementes talvez seja grande, a ponto de poderem constituir-se em variedades, haverá uma variabilidade bastante grande na presença de nódulo se estivermos trabalhando com isolados de alta especificidade hospedeira (Vidor et al., 1983).

Apesar do maricã e da bracatinga serem característicos de habitats distintos, não foi possível estabelecer nenhuma relação entre os locais de procedência dos nódulos e a ocorrência

destes nas plântulas do experimento, pois todos os isolamentos de bracatinga nodularam em pelo menos um tubo contendo o maricã, independentemente da região de proveniência, o que fica demonstrado ao se verificar que as estirpes UFSC-MIP 002/028; 002/029; 002/030; 002/031; 002/032; 002/033 e 002/034, provenientes de Atalanta-SC, região onde não foi verificada a ocorrência de maricã, induziram a formação de nódulos com esta leguminosa. O mesmo vale para a bracatinga, pois não ocorrendo naturalmente na região litorânea, habitat característico do maricã, nodulou com a quase totalidade das estirpes, independentemente do local de coleta.

Diante dos resultados obtidos no experimento, verifica-se a ocorrência de inoculação cruzada em maricã e bracatinga, independentemente da procedência dos nódulos. Em trabalhos semelhantes, realizados por Campelo e Dobereiner (1969), Campelo (1976, apud Silva e Dobereiner, 1982), também foi verificada a ocorrência de inoculação cruzada entre várias espécies do gênero *Mimosa* e da subfamília *Mimosoideae*. Assim, é possível que os membros da subfamília *Mimosoideae*, da qual fazem parte o maricã e a bracatinga, devam constituir um grupo de inoculação cruzada (Campelo e Dobereiner, 1969; Campelo e Campelo, 1970; Lieberman et al., 1985), ficando à parte do grupo caupi, no qual são incluídas por alguns autores (Burkart, 1952; Masfield, 1958; Burton, 1965; Morris, 1965, apud Campelo e Campelo, 1970; Alexander, 1980).

A inoculação cruzada entre o maricã e bracatinga, abre a perspectiva de que possa ser feita seleção de *Rhizobium* para ambas as espécies de maneira conjunta. Além disso, sugere que a bracatinga poderá nodular quando introduzida em regiões onde não ocorre naturalmente, mas onde exista ocorrência natural de maricã. Há no entanto, a necessidade de se verificar se essa associação conseguirá suprir as necessidades da planta com relação ao nitrogênio. Caso isso venha a ocorrer, não haverá necessidade premente de se fazer inoculação artificial. Contudo, se essas estirpes forem ineficientes, será necessário promover inoculação artificial com estirpes de bactérias que tenham

INOCULAÇÃO CRUZADA

alto potencial de fixação de nitrogênio atmosférico, que sejam competitivas para a formação dos nódulos e que tenham boa capacidade de sobrevivência no solo sob condições adversas (Scholles et al., 1984).

Referências Bibliográficas

- Alexander, M. (1980). *Introducción a la microbiología del suelo*. Libros y Editoriales, México. 491p.
- Burkart, A. (1979). Leguminosas Mimosoídeas. In: *Flora Ilustrada Catarinense - Legu*. Reitz, R., Itajaí, p.1-129.
- Campelo, A.B. e Dobereiner, J. (1969). Estudo sobre inoculação cruzada de algumas leguminosas florestais. *Pesq. Agropec. Bras.*, 4:67-72.
- Campelo, A.B. e Campelo, C.R. (1970). Eficiência da inoculação cruzada entre espécies da subfamília Mimosoideae. *Pesq. Agrop. Bras.*, 5:333-337.
- Catharino, E.L.M.; Cristina, C.S.M. e Kaguyama, P.Y. (1982). *Biologia floral da bracatinga (Mimosa scabrella Benth.)*. Silvicultura em São Paulo; Revista Instituto Florestal. São Paulo, v. 16-A Pt. 1, p.525-531. 1-687p. Edição especial.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. Programa Nacional de Pesquisa de Florestas. (1986). *Zoneamento ecológico para plantio florestais no Estado do Paraná*. Brasília, EMBRAPA-DDT, 89p. (EMBRAPA-CNPq. Documentos, 17).
- Franco, A.A. (1982). Simbiose Leguminosas-Rhizobium e ciclo de nitrogênio. In: *Seminário sobre Atualidades de Perspectivas Florestais: Associações Biológicas entre Espécies Florestais e Microorganismos para Aumento da Produtividade Econômica dos Reflorestamentos*, 7, Curitiba, EMBRAPA-URPFCS, p. 19-32. 95p.
- Gaiad, S. e Carpanezzi, A.A. (1984). Ocorrência de *Rhizobium* em leguminosas de interesse silvicultural para a região sul. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 19:155-158, jun. 362p. Edição Especial.
- Joly, A.B. (1983). *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 6a.ed., Nacional, São Paulo, 777p.
- Klein, R.M.; Reis, A. e Reitz, R. (1983). Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. *Sellowia*, Itajaí, 34/35:1-52p.

- Lieberman, M.T.; Mallory, L.M.; Simkins, S. e Alexander, M. (1985). Numerical taxonomica analysis of cross-inoculation patterns of legumes and *Rhizobium*. *Plant and Soil*, 84(2): 225-244.
- Poggiani, F.; Chiranda, R. e Lapa, R.P. (1982). Efeito do reflorestamento com *Mimosa scabrella* na recuperação do solo degradado pela exploração do xisto betuminoso. *Silvicultura em São Paulo; Revista do Instituto Florestal*. São Paulo, v.16-A Pt. 3, p.1962-1970, 1397-2010p. Edição Especial.
- Reitz, R.; Klein, R.M. e Reis, A. (1978). **Projeto Madeira em Santa Catarina**. Itajaí, SUDESUL/IBDF/HBR, 320p.
- Rio Grande do Sul. Secretaria da Agricultura (1983). **Manual de Conservação do solo e água; uso adequado e preservação dos recursos naturais renováveis**. 2a.ed. atualizada. Porto Alegre, 228p.
- Santa Catarina. Gabinete de Planejamento e Coordenação Geral. Sub Chefia de Estatística, Geografia e Informática (1986). **Atlas de Santa Catarina**. Aerofoto Cruzeiro, Rio de Janeiro, 173p.
- Scholles, S.; Mendes, N.G. e Kolling, J. (1984). Levantamento preliminar de ocorrência de nodulação em algumas espécies leguminosas florestais de importância econômica. In: **Congresso florestal Brasileiro**, 5, 17 a 22 de setembro, Nova Prata - RS, v.3, p.646-653.
- Silva, E.R. da e Dobereiner, J. (1982). O papel das leguminosas no reflorestamento. In: **Seminário sobre Atualidade e perspectivas Florestais: Associações Biológicas entre Espécies Florestais e Microorganismos para o Aumento da Produtividade Econômica dos Reflorestamentos**, 7, Curitiba, 1982. EMBRAPA-URPFCS, p.33-52. 95p.
- Vidor, C.; Kolling, J.; Freire, J.R.J.; Scholles, D.; Brose, E. e Pedroso, M.H.T. (1983). Fixação biológica do nitrogênio pela simbiose entre *Rhizobium* e Leguminosas. **Bol. Téc.IPAGRO**. Porto Alegre, p.11, 1983. 52p.
- Vincent, J.M. (1975). **Manual practico de rizobiologia**. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 200p.