

## EFICIÊNCIA DA INOCULAÇÃO CRUZADA ENTRE ESPÉCIES DA SUBFAMÍLIA MIMOSOIDEAE<sup>1</sup>

ADALIS BEZERRA CAMPELO<sup>2</sup> e CORNÉLIO RAMALHO CAMPELO<sup>3</sup>

### Sinopse

Em casa de vegetação foi feito um experimento em vasos de Leonard, sobre inoculação cruzada entre 6 leguminosas, continuação de uma série, nos quais se procurou comprovar a especificidade do *Rhizobium* do sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) e de outras leguminosas florestais.

Foram usadas 5 espécies da subfamília Mimosoideae: sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.), sensitiva (*Mimosa pudica* L.), maricá (*Mimosa bimucronata* (DC.) O.K.), *Mimosa incisa* Mart., leucena (*Leucaena glauca* Benth.) e uma espécie Faboideae, sesbânia (*Sesbania* sp.) a qual foi incluída apenas para se confirmarem resultados encontrados na literatura.

As estirpes de *Rhizobium* usadas foram isoladas do sabiá, do angico, da sensitiva e da *Mimosa incisa* Mart.

O sabiá nodulou com tôdas as estirpes usadas, parecendo ser específica para o *Rhizobium* da subfamília Mimosoideae.

Apareceram nódulos prêtos nas espécies do gênero *Mimosa*, quando inoculadas com uma das estirpes de sabiá, e na leucena, quando inoculada com uma mistura de estirpes do sabiá.

Os nódulos produzidos pelas estirpes M<sub>1</sub>, M<sub>4</sub> e 18-7 no sabiá e na sensitiva apresentaram boa eficiência, enquanto a fixação das restantes foi muito fraca.

### INTRODUÇÃO

Muitas pesquisas sobre a disponibilidade biológica do nitrogênio no solo têm sido feitas, com mais intensidade nos últimos anos, principalmente com relação aos microorganismos fixadores simbióticos.

Levando em consideração a capacidade das leguminosas de enriquecer o solo com nitrogênio, quando associadas às bactérias fixadoras do N atmosférico, é que alguns pesquisadores (Döbereiner 1966, 1967, Campêlo & Döbereiner 1968) têm dado atenção ao aproveitamento de algumas espécies lenhosas no reflorestamento.

Apesar de Tutin (1958) citar que aproximadamente 85% das leguminosas são lenhosas, que as 100 espécies conhecidas do gênero *Mimosa* nodulam, e portanto, podem fixar o nitrogênio atmosférico, a literatura sobre o emprêgo dessas plantas no reflorestamento é escassa. Trabalhos sobre grupos de inoculação cruzada, fazendo referências às espécies da subfamília Mimosoideae, existem poucos.

Alguns gêneros de leguminosas possuem representantes em mais de um grupo de inoculação cruzada, mas, geralmente, espécies do mesmo gênero pertencem a um mesmo grupo, sendo que a maioria das tropicais lenhosas é enquadrada no clássico grupo "Cowpea" (Norris 1965, Burkart 1952, Burton 1965, Masefield 1958).

Norris (1967) definiu grupo de inoculação cruzada como um agrupamento de leguminosas, botanicamente relacionadas, as quais só nodulariam eficiente e reciprocamente com o *Rhizobium* de espécies que façam parte desse grupo.

Wilson (1939) estudou a *Mimosa pudica* L., a *M. incisa* Mart. e a *Leucaena glauca* Benth., em inoculações cruzadas com *Rhizobium* pertencentes aos principais grupos de inoculação e observou que o estabelecimento desses grupos era mais um obstáculo do que um auxílio no estudo da relação planta-bactéria; entretanto, Allen e Allen (1947) acharam que essa relação é o único fator, do qual se dispõe atualmente, para a identificação do *Rhizobium*, sendo, assim, de importância o referido estabelecimento.

Em um trabalho sobre o assunto, Galli (1958) não fez referência a nenhuma *Mimosa*. A *Leucaena glauca* Benth. mostrou-se altamente específica, só nodulando com *Rhizobium* da própria espécie, o que foi confirmado mais recentemente por Trinick (1963).

<sup>1</sup> Recebido 30 out. 1969, aceito 10 dez. 1969.  
Boletim Técnico n.º 93 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS). Apresentado no XX Congresso Nacional de Botânica, Goiânia, 1969.

<sup>2</sup> Eng.º Agrônomo da Seção de Solos do IPEACS, Km 47, Campo Grande, GB, ZC-26.

<sup>3</sup> Professor Assistente do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Campo Grande, GB, ZC-26.

Ishizawa (1955) observou simbiose da *M. invisa* Mart. quando inoculada com *Rhizobium* da *Leucaena glauca* Benth. e da *Vigna catjang* Walp. var. *sinensis*. No mesmo trabalho, o autor mencionou grupos de inoculação: *Sesbania* e *Mimosa*.

Jensen (1967) incluiu o gênero *Mimosa* como pertencente ao grupo *Lupini*.

Döbereiner (1966, 1967), isolando estirpes de *Rhizobium* de nódulos da sabiá, selecionando as mais eficientes e inoculando sementeiras, obteve bons resultados no que se refere ao efeito da inoculação sobre o estabelecimento das mudas no campo.

Campêlo e Döbereiner (1968) estudaram, além da sabiá, outras 5 leguminosas florestais em inoculações cruzadas.

No presente trabalho, o sabiá (espécie arbórea da subfamília Mimosoideae), por ser a única florestal usada, recebeu maior atenção, pois a nossa finalidade principal é a inoculação de leguminosas lenhosas, uma vez estabelecido o grupo de inoculação a que pertencem.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Usando-se vasos de Leonard esterilizados, com areia, foi feito em casa de vegetação um experimento com 6 leguminosas, sendo 5 da subfamília Mimosoideae e uma da subfamília Faboideae, sobre inoculação cruzada. O esquema experimental foi em blocos ao acaso, com 3 repetições, 6 leguminosas (sabiá, leucena, sensitiva, *M. invisa*, *sesbânia* e maricá), e 5

tratamentos de inoculação: A) x1 (estirpe isolada da sabiá); B) mistura de 3 estirpes: x10, 11 e 13 (da sabiá); C) mistura de 2 estirpes: Ag1, Ag2 (do angico); D) mistura de 2 estirpes: M1, M4 (da sensitiva), e E) estirpe 18-7 (da *M. invisa*).

Com exceção da estirpe 18-7, enviada pelo Dr. Iván Guzmán, da República Dominicana, tôdas as estirpes foram isoladas em nosso laboratório.

Em cada vaso foram colocados 400 ml da solução nutritiva de Norris (1964). As sementes foram cuidadosamente escarificadas (com exceção das da sabiá) com  $H_2SO_4$ , esterilizadas com  $HgCl_2$  (1:1.000), lavadas várias vezes em água esterilizada, postas para secar e em seguida plantadas (4 sementes/vaso). Germinadas, foi feita a inoculação, com 1 ml/vaso, de cultura líquida. Após 20 dias, procedeu-se ao desbaste, deixando-se apenas 2 plantas/vaso e depois de 2 meses, foi feita a colheita.

O inoculante líquido foi preparado em meio 79 (Fred & Waksman 1928), repicando-se em cada Erlenmeyer, uma, duas ou três estirpes de *Rhizobium*, testadas quanto à pureza.

Depois da colheita, foram cuidadosamente lavadas em água corrente as raízes das plantas, contados os nódulos, observada a posição dos mesmos nas raízes, a forma, a cor externa e interna (cortando-se o nódulo ao meio) e a cor das fôlhas. Em seguida, planta e nódulos foram levados à estufa a  $65^\circ C$  e, uma vez secos, foi determinado o peso da planta e dos nódulos, N% e N total na planta pelo método Kjeldahl (semi-micro).

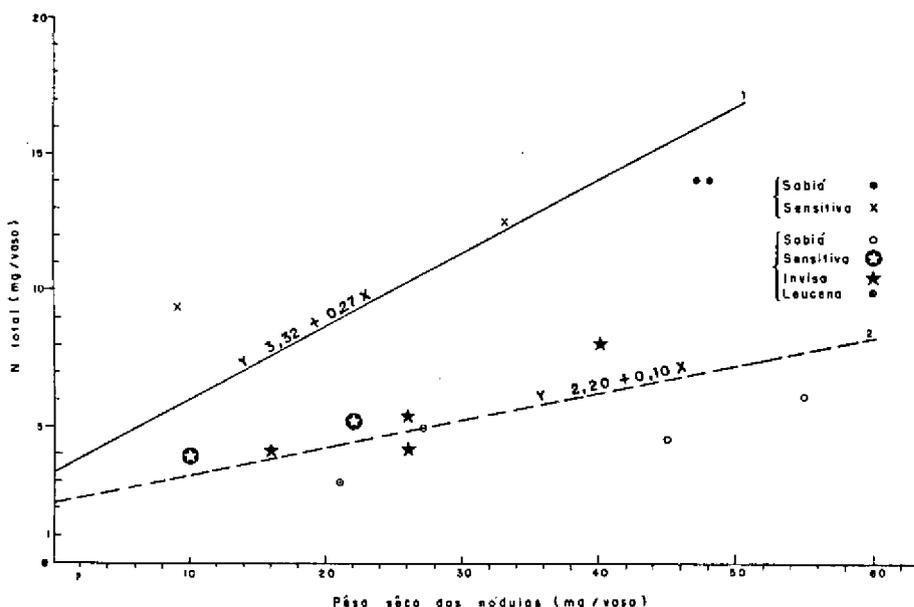


FIG. 1. Regressão do N total da planta sobre o peso dos nódulos (calculada com valores individuais, mas representadas as médias de 3 repetições).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos podem ser observados no Quadro 1 e Fig. 1.

O sabiá nodulou eficientemente com tôdas as estirpes usadas, sendo maior a fixação de nitrogênio quando inoculada com estirpes de sensitiva e de *M. invisa*. Em experimentos anteriores, onde foram usadas estirpes de *Rhizobium* isoladas de várias espécies que não pertenciam à subfamília Mimosoideae, incluindo-se a inoculação com *Rhizobium* do grupo "Cowpea", que segundo Norris (1967) entra em simbiose com a maioria das leguminosas tropicais, a referida espécie florestal não nodulou a não ser com *Rhizobium* da própria espécie. Parece haver uma afinidade entre as espécies dessa subfamília com respeito à inoculação cruzada.

A sensitiva, excetuando-se a inoculação com a estirpe x1, que apresentou nódulos prêtos ineficientes, mostrou uma boa fixação quando inoculada com as demais estirpes, sendo maior a fixação com a estirpe 18-7 da *M. invisa* e com a da própria espécie. Wilson (1939) conseguiu nodulação excelente quando inoculou a *M. invisa* e a sensitiva com *Rhizobium* de algumas Faboideae, razão pela qual foi incluída a Sesbânia (Faboideae) nesse experimento.

A *M. invisa* não nodulou com a mistura de estirpes (x10,11,13) da sabiá, mas conseguiu boa fixação com a x1 (nódulos prêtos e rosas) também da sabiá. Ishizawa (1955) mencionou simbiose eficiente da *M. invisa* com o *Rhizobium* da *Leucaena glauca* Benth. e com o *Rhizobium* do grupo "Cowpea".

O maricá, apesar de apresentar nódulos com tôdas as estirpes, apenas com x1 (nódulos prêtos) e com

QUADRO 1. Efeito de 5 tratamentos de inoculação em leguminosas da subfamília Mimosoideae (médias de 3 repetições)

Estirpes	Espécies	Posição dos nódulos	Côr dos nódulos	Nº. dos nódulos/vaso	Peso seco dos nódulos (mg/vaso)	Forma dos nódulos	Planta			
							Côr das folhas	Peso seco (mg/vaso)	Teor N%	N total (mg/vaso)
x1 <sup>a</sup>		Sec. Prim.	Preta	18	45	Coralóide	Verde-amarelada	384	1,21	4,61
x10, x11, x13 <sup>b</sup>		Sec. Prim.	Branca e rosa	36	27	Cor. e esférica	Verde-amarelada	367	1,29	5,00
Ag1, Ag2 <sup>c</sup>	Sabiá	Prim. e Sec.	Branca e rosa	30	55	Coralóide	Verde-amarelada	503	1,24	6,14
M1, M4 <sup>d</sup>		Prim. e Sec.	Rosa e branca	27	48	Coralóide	Verde-amarelada	802	1,33	14,05
18-7 <sup>e</sup>		Prim. e Sec.	Rosa e branca	14	47	Coralóide	Verde-amarelada	703	2,01	14,02
x1		Sec. e Prim.	Preta e rosa	34	40	Coralóide	Verde	420	1,88	8,02
x10, x11, x13		0	0	0	0	0	Amarela	27	2,00	0,49
Ag1, Ag2	<i>M. invisa</i>	Sec. e Prim.	Rosa	15	26	Coralóide	Verde	309	1,66	5,21
M1, M4		Secundária	Rosa e branca	18	16	Cor. e esférica	Verde-amarelada	226	1,81	4,17
18-7		Secundária	Rosa e branca	21	26	Cor. e esférica	Verde-amarelada	220	1,71	4,03
x1		Primária	Preta	4	3	Coralóide	Am.-esverdeada	62	1,62	1,13
x10, x11, x13		Prim. e Sec.	Rosa e tijolo	17	22	"	Verde	310	1,18	5,26
Ag1, Ag2	Sensitiva	Sec. e Prim.	Rosa e tijolo	4	10	"	Verde	167	1,63	3,90
M1, M4		Prim. e Sec.	Tijolo	7	9	"	Verde-amarelada	392	2,25	9,30
18-7		Prim. e Sec.	Rosa e tijolo	21	33	"	Verde-amarelada	625	1,68	12,62
x1		Secundária	Preta	12	16	Coralóide	Verde	165	2,03	3,33
x10, x11, x13		"	"	2	1	Esférica	Amarela	103	1,26	1,29
Ag1, Ag2	Maricá	Prim. e Sec.	Rosa e tijolo	4	8	Coralóide	Verde	130	2,37	2,98
M1, M4		Secundária	Rosa e branca	3	2	Cor. e esférica	Am.-esverdeada	110	1,43	1,55
18-7		"	Rosa e branca	29	13	"	Verde-amarelada	143	1,21	1,74
x1		Secundária	Branca	1	1	Esférica	Am.-esverdeada	122	1,18	1,39
x10, x11, x13		0	0	0	0	0	Amarela	106	1,28	1,31
Ag1, Ag2	Sesbânia	0	0	0	0	0	Am.-esverdeada	126	1,31	1,52
M1, M4		0	0	0	0	0	Am.-esverdeada	90	1,40	1,13
18-7		Secundária	Branca	3	4	Cor. e esférica	Am.-esverdeada	141	1,19	1,67
x1		Secundária	Branca	1	3	Esférica	Am.-esverdeada	285	1,05	2,99
x10, x11, x13		"	Preta (interna e externamente)	7	7	Cor. e esférica	Verde-amarelada	277	1,04	2,90
Ag1, Ag2	Leucena	0	0	0	0	0	Am.-esverdeada	267	1,00	2,67
M1, M4		0	0	0	0	0	Am.-esverdeada	296	1,02	3,03
18-7		Sec. e Prim.	Rosa e branca	6	21	Coralóide	Verde-amarelada	286	1,02	2,95

<sup>a</sup> Estirpe de sabiá. <sup>b</sup> Estirpe de sabiá. <sup>c</sup> Estirpe de angico. <sup>d</sup> Estirpe de sensitiva. <sup>e</sup> Estirpe de *M. invisa*.

Ag1, Ag2 fixou um pouco. Com as restantes, foi ineficiente.

A leucena, que nodulou com estirpes de sabiá e de *M. incisa*, de acôrdo com observações de Ishizawa (1955) forma, segundo Galli (1958), um grupo de inoculação ao qual não pertence nenhuma das plantas por êle usadas, tôdas Faboideae, e só nodula com *Rhizobium* da própria espécie.

No entanto, Wilson (1939) conseguiu nodulação da leucena com *Rhizobium* de algumas espécies usadas por Galli (1958) e ainda com o de uma Mimosoideae, a *Albizzia julibrissin* (Durazzini) Biolv. Ishizawa (1955) ainda observou que a leucena inoculada com *Rhizobium* de *Dalea alopecuroides* Willd. nodulava eficientemente no verão e ineficientemente no outono. Talvez, a eficiência dessa estirpe fôsse influenciada pelas condições ambientais.

Não se conseguindo estirpes de sesbânia, nada pôde ser constatado com relação às observações de Wilson (1939), que conseguiu nodulação da *M. incisa*, da sensitiva e da leucena com *Rhizobium* de sesbânia. Também Ishizawa (1955) referiu-se a grupos de inoculação *Sesbania* e *Mimosa*. Nesse experimento, quando a sesbânia apresentou nódulos (com as estirpes x1 e 18-7), eram ineficientes.

Com exceção da sensitiva, que só apresentou nódulos coralóides, tôdas as outras espécies apresentaram duas formas de nódulos: coralóides, que são os nódulos típicos da sabiá, e esféricos.

A estirpe x1 produziu nódulos pretos em tôdas as espécies do gênero *Mimosa*, confirmando resultados anteriores (Campêlo & Döbereiner 1968, Stamford et al. 1968), quando inoculada em feijão e sabiá. Em sesbânia e em leucena, a estirpe produziu nódulos brancos (ineficientes).

A mistura de estirpes de *Rhizobium* do angico produziu nodulação apenas nas espécies do gênero *Mimosa*. Apesar de não pertencer a êsse gênero, o angico é uma Mimosoideae florestal que, em experimentos anteriores (Campêlo & Döbereiner 1968), mostrou afinidade com a sabiá em inoculação cruzada.

As estirpes isoladas de sensitiva, cujas características culturais são iguais às do sabiá, entraram em simbiose apenas com as espécies do gênero *Mimosa*. Sobre o assunto, Norris (1967) fêz, em relação à posição taxionômica e ao habitat preferido pela planta hospedeira, uma divisão de *Rhizobium*, de grande significação básica, de acôrdo com o hábito de produzir ácido ou álcali. A adaptação da planta a um solo alcalino resultava no desenvolvimento de *Rhizobium* produtor de ácido, associado a crescimento rápido, fenômeno que se tem manifestado repetidamente. Entre os gêneros da subfamília Mimosoideae,

citou apenas os gêneros *Neptunia* e *Leucaena* como adaptados a solos alcalinos. O mesmo autor chegou à conclusão de que o tipo "cowpea" de *Rhizobium* (promíscuo), de crescimento lento, a cujo grupo pertence a maioria das leguminosas tropicais, representa um sobrevivente do ancestral e que todos os outros tipos de *Rhizobium* de crescimento rápido tenham se especializado mais tarde.

A leucena, provavelmente, constitui um grupo de inoculação à parte, e como nesse trabalho entrou em simbiose com *Rhizobium* das espécies do gênero *Mimosa*, talvez a sabiá faça parte do grupo dessa espécie.

Um dos meios para se avaliar a quantidade de nitrogênio fixada, e ainda a eficiência nodular, é calcular a regressão do N total da planta sobre o peso dos nódulos, uma vez que essa quantidade depende do peso dos nódulos.

Calculadas as regressões, foram achados os valores  $Y = 3,32 + 0,27x$  e  $Y = 2,20 + 0,10x$  para as linhas 1 e 2 respectivamente.

Na Fig. 1 pode ser observada essa regressão, calculada com valores individuais, mas representadas as médias de 3 repetições.

A linha de regressão 1 refere-se à sabiá, quando inoculada com as estirpes 18-7 (*M. incisa* Mart.), M1, M4, (sensitiva), onde foi maior a fixação, e ainda à sensitiva, inoculada com as estirpes 18-7 e M1, M4, ambas com eficiência nodular superior às demais.

A linha 2, formando uma outra regressão, refere-se à sabiá inoculada com x1; x10, x11, x13; Ag1, Ag2; à *M. incisa* Mart. com x1; Ag1, Ag2; M1, M4; 18-7; à leucena, com 18-7 e, ainda, à sensitiva com x10, x11, x13 e com Ag1, Ag2.

Os valores restantes não entraram nos cálculos da regressão, ou porque as estirpes não produziram nódulos (sesbânia, leucena e *M. incisa* Mart.) ou porque a nodulação foi ineficiente (como na maricá).

## CONCLUSÕES

O sabiá nodulou com estirpes de *Rhizobium* isoladas do angico, sensitiva e *M. incisa* Mart. (além das da própria espécie), tôdas pertencentes à subfamília Mimosoideae.

Essa florestal que tem *Rhizobium* de crescimento rápido, mas produtor de álcali, igualmente à sensitiva, não pertence ao grupo "Cowpea" de inoculação cruzada, como a maioria das leguminosas tropicais.

O *Rhizobium* do angico produz álcali, mas é de crescimento moderado.

Pela literatura consultada e os resultados obtidos, concluiu-se que as Mimosoideae constituem um grupo de inoculação à parte, provavelmente o mesmo da leucena estabelecido por Trinick (1963).

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à colega Dra. Johanna Döbereiner pelo estímulo e valiosa orientação, e ao CNPq., pela subvenção.

## REFERÊNCIAS

- Allen, O.N. & Allen, E.K. 1947. A survey of nodulation among leguminous plants. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 12: 203-208.
- Burkart, A. 1952. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. Acme Agency, Buenos Aires.
- Burton, J.C. 1965. The *Rhizobium* legume Association, p. 107-129. In Gilmour, C.M. & Allen, O.N. (ed.), Microbiology and fertility. Oregon State Univ. Press.
- Campêlo, A.B. & Döbereiner, J. 1968. Estudo sobre a inoculação cruzada de algumas leguminosas florestais. IV Reun. lat-amer. Inocul. Leg., out. 1968, Porto Alegre.
- Döbereiner, J. 1966. Inoculação de sementes de sabiá (*M. caesalpiniaefolia*) com *Rhizobium*. I Congr. pan-amer. Conserv. Solos, abr. 1966, S. Paulo.
- Döbereiner, J. 1967. Efeito da inoculação de sementes de sabiá *M. caesalpiniaefolia* no estabelecimento e desenvolvimento das mudas no campo. *Pesq. agropec. bras.* 2:301-305.
- Fred, E.B. & Waksman, S.A. 1928. Laboratory manual of general microbiology. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Galli, F. 1958. Inoculações cruzadas com bactérias dos nódulos de leguminosas tropicais. *Revta Agric.* 33:139-150.
- Ishizawa, S. 1955. Studies on the root-nodule bacteria of leguminous plants. *J. Soil Sci. Manure, Japan*, 26:31-32.
- Jensen, H.L. 1967. Mutual host plant relationships in two groups of legume root-nodule bacteria (*Rhizobium* sp.) *Arch. f. Mikrobiol.* 59:174-179.
- Masefield, G.B. 1958. Some factors affecting nodulation in the tropics, p. 201-215. In: Hallsworth, E.G. (ed.), Nutrition of legumes. Academic Press, New York.
- Norris, D.O. 1964. Techniques used in work with *Rhizobium*, p. 186-198. In Some concepts and methods in subtropical pasture research. 47. Commonw. Bur. Past. Field Crops.
- Norris, D.O. 1965. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. *Plant and Soil* 22:143-166.
- Norris, D.O. 1967. The intelligent use of inoculants and lime pelleting for tropical legumes. *Tropical Grasslands* 1: 107-119.
- Stamford, N.P., Campêlo, A.B. & Döbereiner, J. 1968. Nódulos prontos eficientes e ineficientes e sua inoculação cruzada em várias leguminosas. IV Reun. lat-amer. Inocul. Leguminosas, out. 1968, Porto Alegre.
- Trinick, M.J. 1963. Specificity in the *Rhizobium* symbiosis of *Leucaena glauca*. *Rhizobium Newsletter* 8:135-136.
- Tutin, T.C. 1958. Classification of the legumes, p.3-14. In Hallsworth, E.G. (ed.), Nutrition of the legumes. Academic Press, New York.
- Wilson, J.K. 1939. Leguminous plants and their associated organisms. Cornell Univ., Ithaca, New York.

## EFFICIENCY OF CROSS INOCULATION BETWEEN SPECIES OF THE SUBFAMILY MIMOSOIDEAE

## Abstract

A greenhouse experiment was carried out in Leonard jars, to test cross inoculation between six legumes. The test represents the continuation of a series of experiments to confirm the specificity of *Rhizobium* from sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) and other forest legumes.

Five species of the subfamily Mimosoideae were used: sabiá (*M. caesalpiniaefolia* Benth.), sensitiva (*M. pudica* L.), maricá (*M. bimucronata* (DC) O. K.), *M. invisa* Mart., leucena (*Leucaena glauca* Benth.) and a Faboideae, sesbânia (*Sesbania* sp.) which was included only to confirm results found in the literature.

The *Rhizobium* strains were isolated from nodules of sabiá, angico, sensitiva and *M. invisa* Mart.

Sabiá nodulated with all used strains, appearing to be specific for *Rhizobium* of the subfamily Mimosoideae.

Black nodules appeared on the species of the genus *Mimosa* when inoculated with one of the strains from sabiá and on leucena when inoculated with a mixture of strains of sabiá.

Nodules produced by strains M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> and 18-7, on sabiá and sensitiva showed good efficiency, while the fixation of the remainder was very weak.