

Seleção de estirpes de rizóbio (*Shinorhizobium* spp.) para *Medicago arabica* (L.) Hudson, espécie forrageira e medicinal

Aleksander Westphal Muniz¹, Fernanda Grimaldi², Edemar Brose³, Murilo Dalla Costa⁴ e Carmem Lídia Wolff⁵

Resumo – O objetivo deste trabalho foi selecionar estirpes de rizóbios eficientes na promoção do crescimento e na fixação biológica de nitrogênio em trevo-manchado (*Medicago arabica*), leguminosa forrageira com potencial medicinal devido ao alto teor de metabólitos secundários. Foram avaliadas 23 estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de plantas coletadas no campo em Urupema, SC. Plântulas de trevo-manchado, cultivadas em hidroponia em casa de vegetação, foram inoculadas com suspensão bacteriana dessas estirpes. Após 90 dias de crescimento, as plantas foram avaliadas em relação à produção de massa seca da parte aérea, número de nódulos e massa seca de nódulos. Essas três variáveis foram maiores nos isolados EEL 904B, EEL 1004, EEL 904, EEL 2404 e EEL 1604. Conclui-se que tais estirpes são as mais eficientes na promoção de crescimento de trevo-manchado em casa de vegetação e deverão ser testadas em experimentos em campo para comprovar a efetividade na fixação biológica de nitrogênio e a promoção do crescimento de trevo-manchado.

Termos para indexação: trevo-manchado, bactérias diazotróficas, nodulação, crescimento vegetal, fixação biológica de nitrogênio.

Selection of rhizobium strains (*Shinorhizobium* spp.) for *Medicago arabica* (L.) Hudson, fodder and medicinal plant

Abstract – The objective of this study was to select efficient strains of rhizobium in growth promoting and nitrogen fixation in spotted medick (*Medicago arabica*), forage legume with medicinal potential due to high content of secondary metabolites. Twenty-three rhizobium strains isolated from plant nodules collected in Urupema, SC, Brazil, were evaluated. Spotted medick seedlings grown in hydroponics in a greenhouse were inoculated with bacterial suspensions of these strains. After 90 days of growth, shoot dry weight, nodule number and nodule dry mass of the plants were assessed. These three variables were higher in strains EEL 904B, EEL 1004, EEL 904, EEL 2404 and EEL 1604. It is concluded that these strains are most effective in growth promoting of spotted clover in greenhouse and should be tested in field experiments to prove effectiveness in nitrogen fixation and in growth promoting of spotted medick.

Index terms: spotted medick, diazotrophic bacteria, nodulation, plant growth, biological nitrogen fixation.

O trevo-manchado (*Medicago arabica*) é uma leguminosa anual originária da Europa e cultivada como forragem em outros países, como Austrália e Estados Unidos (Heyn,

1963; Lesins & Lesins, 1963). Além de seu potencial forrageiro, essa espécie apresenta alto teor de metabólitos secundários, do tipo saponinas, que podem ser utilizados como anti-

-inflamatórios, antimicrobianos e nematicidas (Argentieri et al., 2008; Bialy et al., 2004). Em função de sua dupla finalidade, como planta forrageira e bioativa, torna-se ▶

Aceito para publicação em 29/9/10.

¹ Eng.-agr., M.Sc., Epagri/Estação Experimental de Lages, C.P. 181, 88502-970 Lages, SC, fone: (49) 3224-4400, e-mail: aleks@epagri.sc.gov.br.

² Bióloga, M.Sc., Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), Av. Luís de Camões, 2090, 88520-000 Lages, SC.

³ Eng.-agr., Ph.D., Epagri/Estação Experimental de Lages (aposentado), e-mail: edemarbrose@gmail.com.

⁴ Eng.-agr., Dr., Epagri/Estação Experimental de Lages, e-mail: murilodc@gmail.com.

⁵ Eng.-agr., Udesc, Lages, SC.

importante recurso genético vegetal a ser conservado, divulgado e utilizado para pesquisa. Atualmente, faz parte do banco ativo de germoplasma (BAG) da Epagri/Estação Experimental de Lages, que o disponibiliza para melhoramento das pastagens nativas do Planalto Serrano de Santa Catarina e como bioativa. Os estudos de sua utilização como planta medicinal encontram-se em sua fase inicial e não se pode recomendar seu uso como chá ou qualquer tipo de infusão.

O trevo-manchado (Figura 1) apresenta simbiose com bactérias diazotróficas, as quais proporcionam a fixação biológica de nitrogênio (FBN), reduzindo o aporte de adubos nitrogenados na agricultura (Hovieson et al., 2000). Entretanto, nem todas as estirpes de bactérias nativas encontradas no solo apresentam a mesma capacidade de FBN. Em função da potencialidade da espécie no uso como forragem e como bioativa, faz-se necessário selecionar estirpes com maior capacidade de FBN. O objetivo deste trabalho, portanto, consistiu na seleção de estirpes de rizóbio eficazes para simbiose com trevo-manchado.

O trabalho inicial foi realizado pelo isolamento de 29 estirpes de rizóbio efetivas para nodulação com trevo-manchado através do Laboratório de Biotecnologia da Epagri/Estação Experimental de Lages. O isolamento da bactéria foi realizado a partir de nódulos coletados em áreas naturalizadas da espécie no município de Urupema, SC, no ano de 2004. No laboratório, os nódulos obtidos foram lavados em água corrente, desinfestados por um minuto em álcool 70% e imersos por cinco minutos em hipoclorito de sódio a 2%. Em seguida, os nódulos foram lavados cinco vezes com água destilada estéril e macerados. Uma gota desse macerado foi adicionada em placa de Petri, contendo meio sólido de ágar-manitol-extrato de levedura (AML) com vermelho congo (Vincent, 1975). Os isolados foram testados nas plantas hospedeiras de trevo-manchado cultivadas em vasos com areia e vermiculita estéril (2:1 v/v) e solução nutritiva de Hoagland (Teiz & Zeiger, 2004). A composição da solução nutritiva foi modificada nos tratamentos inoculados pela redução de nitrogênio. No início do experimento, cada vaso foi regado

com 200ml dessa solução nutritiva e após quatro semanas foram adicionados 100ml dessa mesma solução por vaso. Para a inoculação das plantas, as bactérias foram desenvolvidas no mesmo meio AML, sem vermelho congo, em tubos a uma temperatura de 28°C. Depois do crescimento, cada cultura foi suspensa em água estéril. Dessa suspensão foi inoculado 1ml por vaso contendo três plantas já germinadas com aproximadamente 10cm de altura. Os 29 isolados obtidos foram depositados na coleção de bactérias diazotróficas do Laboratório de Biotecnologia da Epagri de Lages. Desses, 23 foram testados com relação à eficiência na produção de massa seca da parte aérea, número de nódulos e massa seca de nódulos. O experimento foi conduzido com delineamento completamente casualizado, com cinco repetições e avaliado após 90 dias de sua implantação. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente com o auxílio do programa Assistat v. 7.5. Para análise de variância e separação de médias os dados foram transformados através da macro Box-Cox.

Os resultados demonstraram que as estirpes avaliadas podem ser divididas em quatro grupos, conforme a produção de massa seca da parte aérea. O grupo I (EEL 904B, EEL 1004, EEL 904, EEL 2404, EEL 2204 e EEL 1104) apresentou matéria seca entre 395 e 593mg/vaso, sendo a produção maior que as obtidas nos demais grupos. O grupo II (EEL 1204, EEL 2604, EEL 2204, EEL 2104, EEL 2004, EEL 604, EEL 1404 e EEL 1304) apresentou massa seca entre 229 e 337mg/vaso, sendo maior que a produção dos grupos III e IV. O grupo III (EEL 1504, EEL 404, EEL 2704, EEL 1704, EEL 1804, EEL 104, EEL 504 e testemunha com nitrogênio) apresentou massa seca entre 75 e 186mg/vaso, sendo maior que a do grupo IV (testemunha sem nitrogênio). As estirpes dentro do mesmo grupo não apresentaram diferenças entre si (Tabela 1).

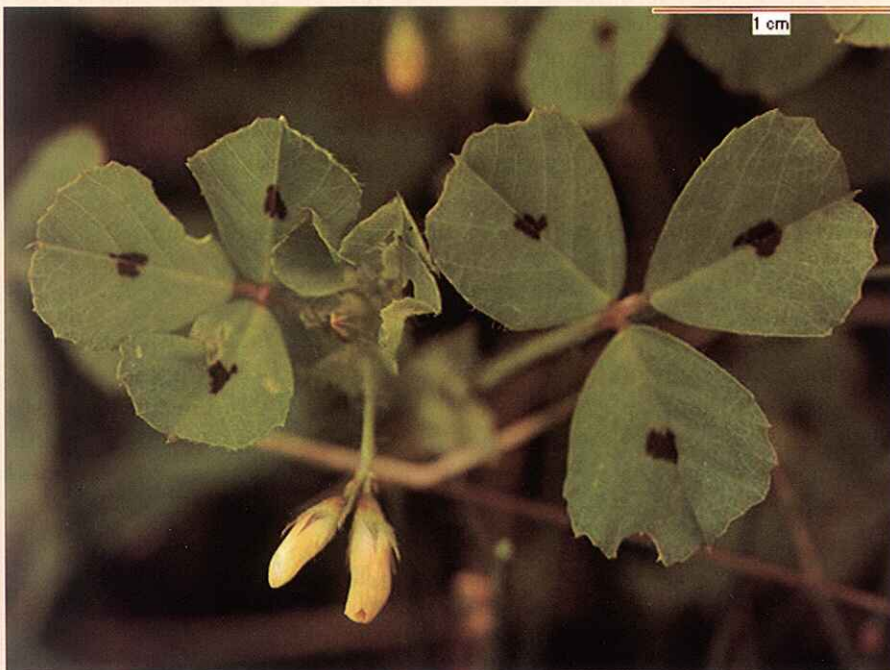


Figura 1. Planta de *Medicago arabica* (L.) Hudson
Fonte: Crellin (2008).

Tabela 1. Produção de biomassa e nodulação de *Medicago arabica* (L.) Hudson inoculada com estirpes de rizóbio em condições hidropônicas (médias de cinco repetições)

Estirpe	Massa seca da parte aérea (mg/vaso)	Nodulação (nódulos/vaso)	Massa Seca de nódulos (mg/vaso)
EEL 904B	592,80 a	43,00 a	37,60 a
EEL 1004	511,00 a	36,80 a	26,80 a
EEL 904	501,80 a	34,80 a	27,60 a
EEL 2404	470,40 a	32,40 a	26,80 a
EEL 1604	432,80 a	30,20 a	25,20 a
EEL 1104	395,40 a	38,20 a	20,40 b
EEL 1204	337,60 b	22,00 b	10,20 c
EEL 2604	308,00 b	36,80 a	21,80 b
EEL 2204	289,40 b	35,40 a	16,00 b
EEL 2104	284,00 b	37,60 a	16,00 b
EEL 2004	281,20 b	33,00 a	21,00 b
EEL 604	277,60 b	37,60 a	16,40 b
EEL 1404	276,80 b	29,40 a	18,20 b
EEL 1304	228,80 b	22,60 b	15,00 b
EEL 1504	186,40 c	25,60 b	8,00 c
EEL 404	170,00 c	27,00 a	9,60 c
EEL 2704	145,20 c	17,80 b	9,00 c
EEL 1704	103,40 c	11,80 b	4,80 c
EEL 1804	99,00 c	17,40 b	5,20 c
EEL 104	88,00 c	18,00 b	7,80 c
TEST+N	87,22 c	0,00 c	0,00 d
EEL 504	74,80 c	28,20 a	6,00 c
TEST-N	7,00 d	0,00 c	0,00 d

Nota: Para o cálculo da variância os dados foram transformados pela ferramenta Box-cox. As médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Quanto à nodulação obtida nesse trabalho, as estirpes estudadas podem ser classificadas em três grupos. O grupo I (EEL 904B, EEL 1004, EEL 904, EEL 2404, EEL 2204, EEL 1104, EEL 2604, EEL 2204, EEL 2104, EEL 2004, EEL 604, EEL 1404 e EEL 504) apresentou maior nodulação, com 27 a 43 nódulos/vaso, do que os grupos II (EEL 1204, EEL 1304, EEL 1504, EEL 2704, EEL 1704, EEL 1804 e EEL 104), com nodulação entre 18 e 22 nódulos/vaso, e III (testemunha com e sem nitrogênio) sem nodulação, respectivamente (Tabela 1). Com relação à produção de massa seca de nódulos, as estirpes podem ser divididas em quatro grupos. O grupo I (EEL 904B, EEL 1004, EEL 904, EEL 2404 e EEL 2204) com maior produção de massa

de nódulos (25 a 38mg/vaso) do que os demais grupos. O grupo II (EEL 1104, EEL 2604, EEL 2204, EEL 2104, EEL 2004, EEL 604, EEL 1404 e EEL 1304) apresentou maior produção de massa de nódulos (15 a 22mg/vaso) que os grupos III e IV. O grupo III (EEL 1504, EEL 404, EEL 2704, EEL 1704, EEL 1804, EEL 104 e EEL 504) apresentou maior produção de massa de nódulos que o grupo IV (testemunha com e sem nitrogênio).

Os resultados obtidos apresentaram correlação significativa entre si ($p < 0,01$). A massa seca da parte aérea apresentou correlação positiva tanto com a nodulação (0,63) quanto com a massa seca de nódulos (0,79). A nodulação, por sua vez, apresentou correlação positiva com a massa seca de nódulos (0,64).

Conclui-se que as estirpes EEL 904B, EEL 1004, EEL 904, EEL 2404 e EEL 1604 são as mais eficientes em casa de vegetação. Elas devem ser utilizadas em ensaios em campo para comprovar sua efetividade.

Literatura citada

1. ARGENTIERI, M.P.; D'ADDBBO, T.; TAVA, A. et al. Evaluation of nematicidal properties of saponins from *Medicago* spp. *European Journal of Plant Pathology*, n.120, p.189-197, 2008.
2. BIALY, Z.; JURZYSTA, M.; MELLA, M. et al. Triterpene saponins from aerial parts of *Medicago arabica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.52, p.1095-1099, 2004.
3. CHORTON, K.H.; THOMAS, I.D.; BOWEN, D.W. et al. A forage grass and legume plant collecting expedition in Portugal. *Genetic Resources and Crop Evolution*, n.47, p.157-162, 2000.
4. GARAU, G.; REEVE, W.G.; BRAU, L. et al. The symbiotic requirements of different *Medicago* spp. suggest the evolution of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* with hosts differentially adapted to soil pH. *Plant and Soil*, n.176, p.263-277, 2005.
5. PEDERSON; G.A.; QUESENBERRY, K.H.; SMITH, G.R. et al. Collection of *Trifolium* sp. and other forage legumes in Bulgaria. *Genetic Resources and Crop Evolution*, n.46, p.325-330, 1999.
6. TAIZ, L.; ZEIGER, E. Assimilação de nutrientes minerais. In: FISILOGIA VEGETAL, 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.285-308.
7. VINCENT, J.M. *Manual práctico de rizobiología*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1975. 200p. ■