

RESUMO

Verificou-se a ocorrência de nodulação em mudas e/ou indivíduos adultos de 54 espécies da família Leguminosae em áreas de floresta intacta e áreas perturbadas, no Estado de Rondônia. Das espécies observadas: *Acacia polyphylla* A. DC., *Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith, *Babieria pinnata* (Pers.) Baill., *Bauhinia acreana* Harms., *Bauhinia longicuspis* Spr. ex Benth., *Cassia fastuosa* Willd., *Dalbergia inundata* Benth., *Derris amazonica* Killip, *Hymenaea reticulata* Ducke, *Machaerium inundatum* (Mart. ex Benth.) Ducke, *Mimosa rufescens* Benth., *Mimosa spruceana* Benth., *Parkia decussata* Ducke, *Schizolobium amazonicum* Hub. ex Ducke, *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd.) Hochr., não tinham referências anteriores na literatura quanto a sua capacidade de nodular. Em *Amburana acreana* (cerejeira), *Schizolobium amazonicum* (bandarra) e *Dinizia excelsa* (angelim-pedra), espécies madeireiras economicamente importantes para a região, não foram encontrados nódulos. Nódulos de 29 espécies foram coletados e na maioria deles as atividades de nitrificação foi detectada pelo método de redução do acetileno. Características de estirpes de *Rhizobium* isoladas desses nódulos são apresentadas.

INTRODUÇÃO

Dentre as fanerógamas, a família Leguminosae destaca-se por possuir muitas espécies de interesse econômico. Além disso, várias delas têm a capacidade de se associar simbioticamente a bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* formando estruturas nodulares nas suas raízes ou excepcionalmente no caule. A fixação biológica de nitrogênio é um processo econômico e ecologicamente compensador que pode substituir total ou parcialmente os onerosos adubos nitrogenados. O melhor exemplo de manejo e aproveitamento deste processo pode ser visto na cultura da soja. Graças ao resultado de uma técnica de melhoramento da cultura integrada ao processo biológico de fixação de N_2 , hoje, todo o nitrogênio de que a cultura necessita provém da fixação biológica de N_2 , o que

(*) Projeto financiado com recursos do POLONOROESTE.

(**) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, C. P. 478, 69011 - Manaus-AM

representa uma economia de milhões de dólares que seriam gastos na compra de adubos nitrogenados.

Grande parte das 900 espécies, aproximadamente, da família Leguminosae na Amazônia carece ainda de informações a respeito da capacidade de nodular. As observações realizadas até agora sobre a ocorrência de nódulos nestas leguminosas, além de abrangerem um número muito pequeno de espécies da região, restringiram-se a áreas próximas à Manaus (Norris, 1969; Sylvester-Bradley et al., 1980; Magalhães et al., 1982; Souza et al. 1984; Magalhães & Fernandes, 1984; Magalhães, 1984b, 1985) e Belém (Norris, 1969). Uma das características da região é a heterogeneidade de espécies nem sempre bem distribuídas por toda a região. Várias delas são endêmicas de determinadas áreas.

Considerando estes aspectos encontra-se em andamento um projeto de levantamento sobre a capacidade de nodulação e/ou fixação de N_2 de espécies florestais em diversas áreas da região amazônica.

Uma destas áreas é o Estado de Rondônia, cuja colonização acelerada nos últimos anos ocasionou altos índices de desmatamento em relação ao resto da Amazônia.

Trabalhos de levantamento microbiológico realizados nesta área são importantes sobre os aspectos de identificação, coleta e preservação de recursos genéticos que poderão ser utilizados em futuros projetos que visem à obtenção de sistemas agrícolas economicamente viáveis e adaptados às condições climáticas e edáficas da Amazônia.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizaram-se duas excursões para coleta de nódulos e material botânico: uma em outubro/1983 e outra em maio/1984, cada uma com duração de 10 dias. As coletas foram feitas em áreas de floresta intacta ou em áreas perturbadas próximas às cidades de Porto Velho e Ouro Preto D'Oeste. De modo a facilitar a identificação do material botânico ao nível de espécie, a prioridade de coleta era de indivíduos em fase de floração ou frutificação, porém, devido à baixa frequência deles, vários indivíduos jovens ou adultos em fase vegetativa também foram coletados.

Para análise da presença de nódulos no sistema radicular de plantas de pequeno porte, o indivíduo era retirado quase que integralmente do solo com auxílio de um enxadeco. Nas espécies arbóreas ou arbustivas de grande porte, raízes eram acompanhadas desde a base do tronco até suas ramificações mais finas que é onde geralmente se encontram nódulos.

De cada indivíduo foram coletados, quando possível, pelo menos 20 nódulos. No momento da coleta, a atividade da nitrogenase enzima responsável pela fixação de N_2 foi medida em 3 desses nódulos, separadamente, através do método de redução do acetileno. Uma hora após a injeção do acetileno, amostras gasosas foram retiradas e colocadas em "vacutainers" e os nódulos foram guardados em vidros hermeticamente fechados contendo sílica-gel. No laboratório, em Manaus, procedeu-se à análise das amostras por cromatografia gasosa e ao isolamento de *Rhizobium* dos nódulos com atividade de nitrogenase em meio

manitol ácido (Souza et al., 1984). Também foram coletadas sementes de uma espécie encontrada sem nódulos - *Mimosa pigra*. Em Manaus, a capacidade de nodular desta espécie foi testada em viveiro com inóculo de cerca de 100 estirpes de *Rhizobium*. A autenticidade de estirpes isoladas com características morfológicas e culturais típicas de *Rhizobium* spp. foi confirmada, verificando-se sua capacidade de induzir nodulação em *Macroptilium atropurpureum* (siratro) cultivado em tubos de Fahreus com meio de Jensen (Vincent, 1970).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinquenta e quatro espécies distribuídas em 24 gêneros foram coletadas (Tabela 1). Destas, 35 são arbóreas, 5 arbustivas, 4 cipós e 5 herbáceas. Em outras 5 espécies, não foi possível definir o hábito de crescimento porque se encontravam em estágio de muda (Tabela 1).

Foram identificadas 29 espécies. O material botânico restante foi identificado só a nível de gênero uma vez que se encontrava em estágio vegetativo e portanto sem os caracteres necessários para identificação a nível de espécie.

Os trabalhos abrangendo a presença de nodulação em espécies florestais em condições naturais, realizadas na Amazônia até o momento, mostraram que em florestas de terra firme a nodulação ocorre com maior frequência em solos de textura arenosa, podendo ser negligível nos solos de textura argilosa (Norris, 1969; Sylvester-Bradley et al., 1980; Magalhães et al., 1982). Este fato, já discutido anteriormente, também foi observado nas áreas do Estado de Rondônia abrangidos por este levantamento (Tabela 2) e pode explicar a ausência de nodulação encontrada em espécies de gêneros reconhecidamente nodulíferos como *Acácia*, *Mimosa* e *Stryphnodendron* uma vez que estas foram analisadas somente em solos argilosos. Fatores edáficos ou climáticos podem limitar o estabelecimento e o desenvolvimento da simbiose *Rhizobium* - leguminosas. Portanto, se uma espécie não está nodulada em determinada condição ambiental não se deve considerá-la como incapaz de nodular até que a ausência de nodulação seja confirmada em condições propícias para que ela ocorra. *Mimosa pigra*, por exemplo, foi encontrada sem nódulos nas condições naturais observadas em Rondônia, mas, nodulou quando propagada em viveiro a partir de sementes coletadas. Recentemente *Acácia polyphylla* foi encontrada nodulando no Sul do país (Franco et al., 1985). Devido à diversidade ambiental, e principalmente a diversidade edáfica existente no Estado de Rondônia, essas espécies, provavelmente, poderão ser encontradas nodulando nesta região em condições ambientais diferentes daquelas em que foram observadas neste trabalho.

Entre as espécies encontradas sem nodulação, atenção especial foi dedicada à cerejeira (*Amburana acreana*), a bandarria (*Schizolobium amazonicum*) e ao angelim-pedra (*Dinizia excelsa*), por se encontrarem na lista das 8 espécies madeireiras mais exploradas da região (IBDF). *Dinizia excelsa* havia sido analisada anteriormente em floresta de terra firme e em viveiro na região de Manaus, (Magalhães et al., 1982; Magalhães, 1984b), e em Associações *Rhizobium* ...

Tucuruí (Souza, comunicação pessoal). No entanto, não havia informações na literatura a respeito da capacidade de nodular das outras duas espécies. A cerejeira foi pesquisada em solos arenosos e argilosos e em viveiros da Secretaria de Agricultura em Ouro Preto D'Oeste, RO. Vários indivíduos de *Schizolobium amazonicum* puderam ser pesquisados pois esta espécie é bastante freqüente na região, principalmente, como colonizadora de áreas desmatadas disseminando-se através de regeneração natural. Como a nodulação nestas espécies não foi encontrada, mesmo em condições propícias é pouco provável que elas sejam espécies capazes de nodular.

Ausência de nodulação em alguns gêneros abrangidos por este levantamento também foram observados por outros autores, assim como a capacidade de nodular verificada em alguns gêneros foi confirmada em outros trabalhos (Tabela 3).

O maior número de espécies coletadas foi do gênero *Inga*, que, segundo Ducke (1949) compreende 89 espécies na Amazônia. Com relação à associação com *Rhizobium*, não só neste levantamento mas também freqüentemente em diversas condições (Magalhães, inédito) espécies desse gênero se apresentam com nodulação eficiente, isto é, com atividade de nitrogenase (ARA) alta. Além disso, espécies do gênero *Inga* podem ser úteis como flora apícola (NAS, 1979), forrageiras (Benevides, 1983), produtoras de lenha e frutos, além de apresentarem boa rusticidade (Arkcool, 1984) e, geralmente, ter rápido crescimento. Múltiplo uso, capacidade de se associar com bactérias fixadoras de N₂ e adaptação às condições climáticas e edáficas da região são características importantes, indicando que o potencial de utilização destas espécies em sistemas agrícolas na região deveria ser mais explorado.

As espécies abrangidas neste levantamento sem referências anteriores na literatura sobre sua capacidade de nodular foram: *Acacia polyphylla* A. DC.; *Mimosa spruceana* Benth.; *Mimosa rufescens* Benth.; *Parkia decussata* Ducke; *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd) Hochr.; *Bauhinia acreana* Harms.; *Bauhinia longicuspis* Spr. ex Benth.; *Cassia fastuosa* Willd. *Hymenaea reticulata* Ducke; *Schizolobium amazonicum* Hub. ex Ducke; *Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith; *Barbieria pinnata* (Pers.) Baill.; *Daibergia inundata* Benth.; *Machaerium inundatum* Ducke; e *Derris amazonica* Killip, sendo que a capacidade de nodulação das 4 últimas espécies foi observada no campo (Magalhães, 1984a, 1985).

Excetuando-se *Desmodium barbatum* e *D. leiocarpum*, todas as espécies noduladas apresentaram nódulos com atividade de nitrogenase.

Foram isoladas de nódulos ativos várias estirpes com características culturais típicas de *Rhizobium*. Na Tabela 1, encontram-se estirpes cuja autenticidade foi comprovada por sua capacidade de induzir nodulação em Siratro. De acordo com o tipo de crescimento em meio de cultura com pH 5.0 essas estirpes podem ser divididas em 2 grupos:

1. Estirpes que alcalinizam o meio de cultura, com colônias de até 1 mm de diâmetro após 1 semana de crescimento mas, que após 15 dias já produziram goma suficiente para poderem em alguns casos cobrir a placa;

2. Estirpes que alcalinizam o meio de cultura mas, não têm produção abundante de goma mesmo após 15 dias de crescimento quando as colônias têm até 1 mm de diâmetro.

A maioria das estirpes que induziram nodulação em Siratro são do grupo 2. Todas

Fátima M. M. Magalhães et al.

estirpes estão sendo mantidas em culturas e estoque na coleção de bactérias fixadoras de N_2 do Setor de Microbiologia de Solo do INPA e já estão sendo utilizadas em vários experimentos conduzidos pelo Setor. Também encontram-se disponíveis para outras Instituições e pesquisadores que atuem nesta área.

Tabela 1. Ocorrência de nodulação, atividade da nitrogenase ⁽¹⁾ e estirpes de *Rhizobium* isoladas de leguminosas florestais de terra firme no Estado de Rondônia.

Espécie / Gênero {nº de registro no herbário} ou (nº de coleta)	Porte dos indivíduos analisados (2)	Tipo de Solo	Nodulação	Atividade da nitrogenase (1) nos nódulos	Estirpes de <i>Rhizobium</i> - nº de coleção
MIMOSOIDEAE					
<i>Acacia polyphylla</i> A.DC. {133576} (4)	A, m	argiloso	-		
<i>Acacia</i> sp. {135009}	C	argiloso	-		
<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg. (R 36, R 42)	A	argiloso	+	+	INPA 01-26 INPA 01-185
<i>Dinizia excelsa</i> Ducke (R 8)	A, m	argiloso	+		
<i>Enterolobium shomburgkii</i> Benth. (R 23)	A	argiloso	+	+	
<i>Inga edulis</i> Mart. (R 16, R 68, R 95)	A, m	argiloso, arenoso	+	+	INPA 01-23 INPA 01-21
<i>Inga</i> sp. 2 (R 59)	m	arenoso	+	+	INPA 01-87
<i>Inga</i> sp. 3 (R 56)	m	arenoso	+	+	
<i>Inga</i> sp. 4 (R 51, R 53, R 50)	A, m	arenoso	+	+	INPA 01-93
<i>Inga</i> sp. 5 (R 52)	m	arenoso	+	+	-
<i>Inga</i> sp. 6 (R 45, R 30)	A, m	arenoso, argiloso	+	+	INPA 01-34 INPA 01-03
<i>Inga</i> sp. 7 (R 31)	m	arenoso	+	+	INPA 01-15
<i>Inga</i> sp. 8 (R 89)	m	arenoso	+	+	INPA 01-02
<i>Inga</i> sp. 9 (R 10)	A	argiloso	+	+	INPA 01-65
<i>Inga</i> sp. 10 (R 6)	m	argiloso	+	+	-
<i>Inga</i> sp. 11 (R 5)	m	argiloso	-		
<i>Inga</i> sp. 12 (R 33)	m	argiloso	+	+	-
<i>Mimosa pigra</i> L. {133594} (3), (4)	a er	argiloso	-		

continuação (Tabela 1.)

Espécie / Gênero (nº de registro no herbário) ou (nº de coleta)	Porte dos indiví- duos analisados (2)	Tipo de Solo	Nodulação	Atividade da nitro- genase (1) nos nódulos	Estirpes de Rhizo- bium - nº de cole- ta
Cassia sp. (R 21)	m	argiloso	+	ND	-
Hymenaea reticulata Ducke (R 69)	m	argiloso	-		
Peltogyne sp. (R 7)	m	argiloso	-		
Schizolobium amazonicum Huber ex Ducke {133587} (4)	A, m, rv	argiloso	-		
Swartzia sp. 1 (R 67, R 66)	m	argiloso	+	-	INPA 01-150
Swartzia sp. 2 (R 4)	m	argiloso	+	+	INPA 01-18
PAPILIONOIDEAE					
Amburana acreana (Ducke) A.C. Smith {135005} (4)	A, m	argiloso, arenoso	-		
Barbieria pinnata (Pers.) Baill. (R34) (4)	m	arenoso	-		
Dalbergia inundata Benth. (R46, R60, R61)	A, m	argiloso	+		INPA 01-60
Desmodium barbatum Benth. (R 20)	he	argiloso	+	-	
Desmodium leiocarpum G. Don {133583}	he	argiloso	+	-	
Derris cf. amazonica Killip (R 18, R 19) (4)	C	argiloso	+	+	INPA 01-37
Derris sp. (R 57, R 58)	m	arenoso	+	+	INPA 01-09
Indigofera suffruticosa Miller {133589}	a	argiloso	+	+	
Machaerium cf. inundatum Ducke (R28, R29) (4)	A, m	arenoso	+	+	
Machaerium sp. (R 65)	m	argiloso	+	ND	
Mucuna pruriens DC. {135,003}	he	argiloso	+	+	INPA 03-07
Pueraria sp. {135000}	he	argiloso	+	+	INPA 03-01

(1) Avaliada pelo método de redução do acetileno; (2) A - árvore, a - arbusto, aer - arbusto ereto, aes - arbusto escandente, asb - arbusto subescandente, c - cipó, he - erva, rv - regeneração vegetativa, m - mudas, indivíduos de até 1 m de altura; (3) Em condições de viveiro esta espécie nodulou; (4) Espécies cuja capacidade de nodular foi observada pela primeira vez através deste trabalho.

Espécie / Gênero {nº de registro no herbário} ou {nº de coleta}	Porte dos indivi- duos analisados (2)	Tipo de Solo	Nodulação	Atividade da nitro- genase (1) nos nōdu- los	Estirpes de <i>Rhizo-</i> <i>bium</i> - nº de cole- ta
<i>Mimosa spruceana</i> Benth. (R 80) ⁽⁴⁾	A, m	argiloso	-		
<i>Mimosa rufescens</i> Benth. (R 75)	C	argiloso	-		
<i>Parkia decussata</i> Ducke {133595}	A	argiloso	-		
<i>Parkia multijuga</i> Benth. {133584}	A	argiloso	-		
<i>Pithecellobium</i> cf. <i>saman</i> (Jacq.) Benth. {134008}	A	argiloso	+	+	INPA 01-30 INPA 01-10
<i>Pithecellobium</i> sp. 2 (R 35)	m	arenoso			
<i>Pithecellobium</i> sp. 3 (R 97)	A	argiloso	+	+	
<i>Pithecellobium</i> sp. 1 (R 38)	A	argiloso	-	+	
<i>Styphnodendron pulcherrimum</i> (Willd) Hochr. {133577} {133586} ⁽⁴⁾	A	argiloso	-		
CAESALPINIOIDEAE					
<i>Bauhinia acreana</i> Harms. (R 64) ⁽⁴⁾	C	argiloso	-		
<i>Bauhinia longicuspis</i> Spr. ex Benth. {133578} {133590} ⁽⁴⁾	a	argiloso	-		
<i>Bauhinia</i> sp. 1 (R 32)	m	arenoso	-		
<i>Bauhinia</i> sp. 2 (R 54)	m	argiloso	-		
<i>Cassia fastuosa</i> Willd. {133593}	A	argiloso	-		
<i>Cassia grandis</i> L. (R 86) ⁽⁴⁾	A	argiloso	-		
<i>Cassia latifolia</i> G. F. W. Meyer {133592} ⁽⁴⁾	asb	argiloso	-		
<i>Cassia multijuga</i> Rich. {133591} {133580} {133588}	A	argiloso	-		
<i>Cassia nictidans</i> var. <i>disadena</i> Irwin & Baneby (R 98)	he	argiloso	+	+	

Tabela 2. Percentagem de espécies florestais noduladas em solos de diferentes texturas.

Tipo de solo	Nº total de espécies coletadas	Nº de espécies noduladas	Percentagem de espécies noduladas (%)
Arenoso	14	10	71
Argiloso	43	21	49

Tabela 3. Observações agora realizadas e confirmadas por outros trabalhos.

Referência Bibliográfica	Gêneros Nodulíferos												Gêneros não Nodulíferos						
	Anadenanthera	Enterolobium	Inga	Pithecellobium	Swartzia	Desmodium	Derris	Indigofera	Machaerium	Pueraria	Stylobium	Dalbergia	Parkia	Bauhinia	Cassia (Subgêneros Senna e Fistula)	Hymenaea	Peltogyne	Schizolobium	Amburana
Norris, 1969			X	X	X				X			X	X	X			X		
Sylvester Bradley et al., 1980			X									X					X		
Allen & Allen, 1981	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Magalhães, et al., 1982			X	X	X											X	X		
Faria et al., 1984		X	X	X	X		X		X			X	X	X	X	X	X	X	X
Souza et al., 1984			X	X	X		X						X						
Magalhães, 1984 b		X	X	X	X				X			X	X	X	X	X			
Franco et al., 1985	X	X	X	X	X		X		X			X	X	X	X			X	X

Referências bibliográficas

- Allen, O. N. & Allen, E. K. - 1981. **The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation.** University of Wisconsin Press, Wisconsin. 812 p.
- Arkcool, D. B. - 1984. A comparison of some fast growing species suitable for woodlots in the wet tropics. **Pesq. Agropec. Bras.**, 19: 61-68.
- Benavides, J. E. - 1983. **Investigación en arboles forrageros.** Trabalho apresentado no Curso sobre técnicas agroflorestais. Catie, Turrialba.
- Ducke, A. - 1949. Notas sobre a Flora neotropical II. As leguminosas da Amazônia Brasileira. **Bol. Téc. Inst. Agr. Nor.** 249 p.
- Faria, S. M.; Franco, A. A.; Jesus, R. M.; Menandro, M. S.; Baitelo, J. B.; Mucci, E. S. F.; Döbereiner, J.; Sprent, J. I. - 1984. New nodulating legume trees from South - East Brazil. **New Phytologist**, 98: 317.
- Franco, A. A.; Faria, S. M.; Silva, G. G. - 1985. Fixação de nitrogênio em leguminosas arbóreas. **Anais do Congresso sobre Biotecnologia nas Américas.** São José da Costa Rica. 14-17.
- Magalhães, F. M. M. - 1984a. Levantamento da capacidade de nodulação e/ou fixação de nitrogênio em espécies florestais da região Amazônica. I Associações **Rhizobium** - leguminosas no Estado de Rondônia. XII Reunião Latino Americana sobre **Rhizobium**. Campinas.
- - 1984b. Associação **Rhizobium** leguminosas florestais nativas e exóticas da Amazônia em dois tipos de solo, representativas da região sob condição de viveiro. In: XII Reunião Latino Americana sobre **Rhizobium**. Campinas.
- Magalhães, F. M. M. - 1985. O estado atual de conhecimento sobre fixação biológica de N_2 na Amazônia. **Anais do 19º Simpósio do Trópico Úmido.** Segmento Solo. (no prelo).
- Magalhães, L. M. S. & Fernando, N. P. - 1984. Experimental Stands of leguminous forests in the Manaus region. **Pesq. Agropec. Bras.**, 19: 75-79. National Academy of Sciences. **Tropical legumes: Resources for the future.** N.A.S. Washington, D.C. USA, 1979, 331p.
- Norris, D. O. - 1969. Observations on the nodulation Status of rain forest leguminous species in Amazonia and Guyana. **Trop. Agric.**, 46: 145-151.
- Souza, L. A. G.; Magalhães, F. M. M.; Oliveira, L. A. - 1984. Avaliação do crescimento de **Rhizobium** de leguminosas florestais tropicais em diferentes meios de cultura. **Pesq. Agropec. Bras.**, 19: 165-168.
- Sylvester-Bradley, R.; Oliveira, L. A.; de Podestá Filho, J. A. - 1980. Nodulation of legumes, nitrogenase activity of roots and occurrence of nitrogen-fixing **Azospirillum** spp. in representative soils of central Amazonia. **Agro-Ecosystems**, 6: 244-266.
- Vincent, J. M. - 1970. **A manual for the practical study of the root nodule Bacteria.** Blackwell scientific publications, Oxford.

(Aceito para publicação em 18.11.1987)