

Seleção de estirpes de rizóbios para formação de mudas de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) em Argissolo Vermelho Amarelo

Selection of Rhizobia strains for development seedlings of leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) in Red-Yellow Ultisol

RAMOS, Danielle Braule Pinto¹; SOUZA, Luiz Augusto Gomes de²

¹Engenheira Ambiental, Centro Universitário Luterano de Manaus/ULBRA, Manaus/AM - Brasil,
considerrr@hotmail.com; ² Coordenação de Sociedade Ambiente e Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da
Amazônia CSAS-INPA, Manaus/AM - Brasil, souzalag@inpa.gov.br

RESUMO: O estudo objetivou avaliar a resposta à inoculação e selecionar estirpes eficientes na fixação simbiótica de N₂ em mudas de leucena em Argissolo Vermelho Amarelo, sob enviveiramento. Foi avaliada a inoculação individual de 12 estirpes de rizóbios homólogos da coleção do INPA, um tratamento controle e um que recebeu N-mineral (ureia, 80 kg ha⁻¹). O delineamento foi inteiramente casualizado, com oito repetições. Aos 74 dias, as melhores estirpes foram INPA 935 e 936 que favoreceram o desenvolvimento da biomassa das mudas e a estirpe INPA 897 que apresentou alta capacidade infectiva, avaliada pelo número de nódulos formados. Duas outras estirpes também apresentam potencial para novos testes como inoculante, as estirpes INPA 899 e 937. As plantas inoculadas com INPA 935 produziram biomassa seca da parte aérea 30,8 e 45,0 % maior, que os tratamentos testemunha e com nitrogênio. A taxa de nodulação das mudas foi de 98,6 % (n=112). As taxas de nitrogênio foliar foram elevadas, com média de 43,6 g kg⁻¹, com concentração média de N nas folhas de 4,4 %.

PALAVRAS-CHAVE: Fixação de nitrogênio, leguminosas arbóreas, microbiologia do solo..

ABSTRACT: The study aimed at to evaluate the answer to the inoculation and to select efficient strains in the symbiotic fixation of N₂ in leucaena seedlings in Yellow Red Ultisol, under nursery. The individual inoculation of 12 strains of rhizobia homologous of the collection of INPA, a treatment was evaluated it controls and one that received N-mineral (urea, 80 kg ha⁻¹). The design was random entirely, with 8 repetitions. After 74 days in nursery, the best strains were INPA 935 and 936 that favored the development of the biomass of the seedlings and the strain INPA 897 with high capacity infective showed for high nodule number formed. Two other strains also present potential for new tests as inoculant: INPA 899 and 937. The plants inoculated with INPA 935 produced dry biomass of the aerial biomass 30,8 and 45,0 % larger, than the treatments witness and with N. The rate of nodulation of the seedlings was of 98,6 % (n=112). The rates of foliar nitrogen they were high, with average of 43,6 g kg⁻¹, with medium concentration of N in the leaves of 4,4 %.

KEY WORDS: Nitrogen fixation, legume tree, soil microbiology.

Introdução

Em comparação às famílias botânicas da região Amazônica, estudos revelam que a família Fabaceae (Leguminosae) é uma das mais numerosas em espécies. Nos inventários florísticos já realizados, estas se classificam entre as cinco famílias com maior número de indivíduos (MOREIRA et al., 1992). Uma das características de destaque desta família, além do produto econômico que fornecem diretamente, é a capacidade de inúmeras espécies formarem nódulos e realizar simbiose com bactérias diazotróficas do grupo dos rizóbios (JESUS et al., 2005), o que lhes conferem propriedades de alto interesse agroecológico.

Em razão das leguminosas arbóreas apresentarem crescimento rápido, tolerância a condições adversas e por contribuírem de formas efetivas para melhoria qualitativa dos estoques de matéria orgânica do solo, várias espécies vêm sendo indicadas para a recuperação de áreas degradadas ou para consorciamento em sistemas de produção agrícola (FRANCO et al., 1992). De acordo com Blair et al. (1988), é necessário o estabelecimento de uma simbiose eficiente e ativa para um crescimento adequado das leguminosas arbóreas, pois a inoculação de estirpe adequada de rizóbio ajuda a planta a desenvolver em solos deficientes em N. A presença de rizóbios nativos no solo, que nodulam leguminosas e fixam N₂ atmosférico, favorecem a simbiose e contribuem para a eficiência da fixação biológica do nitrogênio em áreas degradadas.

A leucena é uma importante leguminosa arbórea de múltiplo uso da subfamília Mimosoideae, indicada para o cultivo na região tropical, e apresenta morfotipos de hábitos de crescimento, encontrados como árvore ou arbusto que alcançam até 20 m de altura (REBRAF, 1991). Como planta forrageira, a leucena é palatável e de grande valor nutritivo (HAUAD et al., 1996). Esta espécie também pode se associar com bactérias do grupo dos rizóbios e fixar entre 200-300 kg ha⁻¹ de

nitrogênio (SANGINGA et al., 1990). Em decorrência disso, a leucena apresenta características fundamentais que a torna uma planta empregada para adubação verde e na recuperação de solos, pois melhora sua fertilidade, minimizando a saturação de alumínio em solos ácidos e elevando a saturação de bases (AIHOU et al., 1998). Estudos revelaram que a leucena cultivada em alamedas de solos em Sergipe contribuiu para elevar os nutrientes do solo e as suas propriedades físicas dentre elas a macroporosidade (BARRETO & FERNANDES, 2001).

A seleção de estirpes eficazes de rizóbios para mudas florestais permite a introdução de mudas bem noduladas nos plantios, favorecendo sua adaptação após o cultivo, com a retomada de seu crescimento e maior tolerância às condições do solo (FARIA et al., 1984).

Sabe-se que as áreas de terra firme da Amazônia possuem superfície recoberta por solos ácidos e de baixa fertilidade, especialmente representadas pela classe dos Latossolos e dos Argissolos, o que leva a necessidade de selecionar espécies adaptadas a estas condições físico-químicas (NICHOLAIDES et al., 1983) capazes de manter ou elevar os níveis de matéria orgânica. Na seleção das espécies de leguminosas arbóreas com maior potencial para recuperação do solo e aproveitamento nos agroecossistemas, há necessidade de também selecionar germoplasma microbiano eficiente na fixação de nitrogênio e plenamente adaptado a estas condições de solo.

Este estudo foi conduzido com o objetivo de selecionar estirpes de rizóbios eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio para a inoculação de mudas de leucena em Argissolo Vermelho Amarelo; e para avaliar as características de crescimento e desenvolvimento de leucena na fase de viveiro, durante a etapa de formação de mudas para o plantio definitivo.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido nas instalações da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – CPCA/INPA, no Campus do V-8, em Manaus, AM, entre os meses de dezembro de 2008 e maio de 2009. Os estudos foram efetuados no Setor de Solos, no Laboratório de Microbiologia do Solo e nas áreas de sementeira e viveiro de produção de mudas existentes nesse Campus.

Obtenção de propágulos e germinação das sementes

As sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. Fabaceae, Mimosoideae, Eumimoseae) foram coletadas no ano de 2007 e preservadas após o beneficiamento em geladeira ($\pm 10^{\circ}\text{C}$), em recipiente de vidro, vedado. Antes da semeadura, as sementes de leucena foram submetidas a um tratamento de quebra de dormência, empregando-se a técnica de choque térmico que consiste no tratamento das sementes com água a 100°C seguido do resfriamento em temperatura ambiente por 24 h antes da semeadura (MECKDECE & BARROS, 1984).

As sementeiras foram constituídas por caixas de plástico de $80 \times 50 \times 15$ cm, devidamente drenadas e preenchidas com areia, empregando-se casca de arroz como cobertura de semeio. O acompanhamento da germinação e manutenção da umidade do substrato foi feito diariamente, por 61 dias, quando estas foram transplantadas para os sacos.

Coleta, preparo e análise do solo

Foi coletado solo Argissolo Vermelho Amarelo, em área cultivada com sistemas agroflorestais na Estação Experimental de Olericultura do INPA, localizada na rodovia AM 010, Km 14 com as coordenadas geográficas: S $02^{\circ}59'71,5''$ e W $60^{\circ}01'38,2''$. As coletas foram feitas até 10 cm de profundidade. O solo coletado foi espalhado à

sombra, e posteriormente peneirado em peneira de malha de 5 cm, e em seguida distribuído em recipientes plásticos para mudas, com capacidade para 2 quilos de solo. Uma amostra do solo foi analisada quanto a suas propriedades químicas, bem como classe textural.

O solo coletado apresentou pH de 4,31, e valores de Ca, Mg, K e Al, respectivamente de 1,86; 0,37; 0,11 e 0,65 $\text{cmol}_\text{c} \text{ kg}^{-1}$, e valores de P, Fe, Mn e Zn de 8,47; 192,0; 2,9 e 5,7 mg kg^{-1} , respectivamente. Estas análises foram efetuadas no Laboratório Temático de Solos e Plantas – LTSP - do INPA, em Manaus, AM, de acordo com o método da EMBRAPA (1997). O pH do solo foi determinado em H₂O na proporção solo:solução de 1:2,5. Cálcio, magnésio e alumínio foram extraídos com KCl 1N e o P, K, Fe, Zn e Mn foram extraídos com duplo ácido. Os cátions Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ e os micronutrientes (Fe, Zn e Mn) foram determinados por um espectrofotômetro de absorção atômica. O P foi determinado por espectrofotometria utilizando o molibdato de amônio. A determinação textural foi efetuada pelo método de Bouyoucos e revelou a presença de 52,71 % de areia, 13,79 % de silte e 33,50 % de argila, com classe textural franco-argilosa (VIEIRA, 1975).

O solo foi adubado com superfosfato triplo (200 kg ha^{-1}), cloreto de potássio (100 kg ha^{-1}), calcário dolomítico (500 kg ha^{-1}), e solução líquida de micronutrientes (1 mL kg^{-1} de solo), conforme Halliday (1984). Para os cálculos de adubação, foi considerado o peso médio dos sacos para mudas preenchidos com os solos, obedecendo-se a concentração dos nutrientes apresentada no produto (para superfosfato triplo 42,0% de P₂O₅; para o cloreto de potássio 58,0% de K₂O e calcário dolomítico, produto puro). A correção mineral dos solos foi feita 7 dias antes do transplantio.

Delineamento Experimental e Tratamentos

O delineamento experimental adotado foi o Inteiramente Casualizado, constituído de 14

Seleção de estirpes de rizóbios

tratamentos e 8 repetições para as medidas de crescimento das mudas, totalizando 112 unidades experimentais. Para os dados obtidos por ocasião da colheita, o delineamento empregado foi inteiramente casualizado, com 14 tratamentos e 5 repetições, totalizando 70 unidades experimentais. Cada saco constituiu uma parcela.

Durante a condução do experimento, foram avaliadas 12 estirpes de rizóbios homólogos, da coleção do INPA, isolados de solos com diferentes coberturas vegetais, procedentes de área da Mata Atlântica do litoral de Pernambuco (SOUZA et al., 2007).

Foram empregados 14 tratamentos, conforme discriminado a seguir:

- T1: Testemunha (plantas não inoculadas e não adubadas com N mineral).
- T2: Plantas adubadas com nitrogênio mineral.
- T3: Inoculação individual com a estirpe INPA 879.
- T4: Inoculação individual com a estirpe INPA 897.
- T5: Inoculação individual com a estirpe INPA 898.
- T6: Inoculação individual com a estirpe INPA 899.
- T7: Inoculação individual com a estirpe INPA 900.
- T8: Inoculação individual com a estirpe INPA 926.
- T9: Inoculação individual com a estirpe INPA 927.
- T10: Inoculação individual com a estirpe INPA 930.
- T11: Inoculação individual com a estirpe INPA 933.
- T12: Inoculação individual com a estirpe INPA 935.
- T13: Inoculação individual com a estirpe INPA 936.
- T14: Inoculação individual com a estirpe INPA 937.

A inoculação das plantas foi conduzida após o pegamento, seis dias depois do transplantio. Para o preparo do inoculante, as estirpes foram incubadas em meio líquido padrão para rizório YMA sem agar (VINCENT, 1970) distribuído em erlenmeyers de 125 mL por 10 dias e mantidas em agitador mecânico horizontal, sob agitação permanente. A inoculação foi feita individualmente em duas épocas, aplicando-se o inoculante líquido na base do colo das mudas transplantadas, com o auxílio de

uma pipeta. Em cada aplicação, feita aos 6 e 11 dias após o transplantio, foram empregados 3 mL de inoculante líquido por planta. A adubação com nitrogênio mineral na testemunha com nitrogênio foi praticada com ureia ($80 \text{ kg de N ha}^{-1}$), parcelada em duas vezes, aos 13 e aos 43 dias do transplantio, incorporando-se o adubo no solo com o auxílio de um bastão de vidro.

Condução do experimento

O experimento foi conduzido em um viveiro coberto por tela de sombrite (50% de luz incidente). Durante o experimento, as plantas foram irrigadas diariamente nos dias não chuvosos, e foram efetuadas limpezas manuais regulares para a retirada de plantas espontâneas. O acompanhamento do crescimento das plantas foi feito aos 12, 42 e 74 dias após o transplantio, determinando-se o comprimento do caule e o diâmetro do colo das plantas, com o auxílio de uma régua milimetrada e de um paquímetro digital. O comprimento do caule foi medido considerando a distância entre o colo da planta e o ponto extremo do meristema apical (BENINCASA, 1988). O crescimento foi calculado através da taxa de incremento mensal das plantas na fase de viveiro empregando-se a fórmula $(h_2 - h_1 / t_2 - t_1 \times 30)$, onde h_2 e h_1 correspondem ao comprimento do caule no t_2 e t_1 , respectivamente, aqui definido como aos 12 e aos 74 dias após o transplantio. Do mesmo modo, foram coletadas as medidas diamétricas.

Avaliações/determinações

Decorridos 74 dias do transplantio, as plantas foram colhidas e avaliadas, seccionando-se as mudas na altura do colo com o auxílio de uma tesoura de poda e pesando-se a parte aérea fresca em balança de precisão. Os nódulos presentes no sistema radicular foram destacados e contados, registrando-se aspectos da forma e coloração. A planta inteira foi extraída destorrendo-se o solo

contido nos recipiente. A parte aérea, raízes e nódulos foram secos em estufa a 65°C por 72 horas, para determinação da biomassa seca. Após a pesagem da parte aérea seca, também foi determinado o peso do caule seco, obtendo-se assim medidas da biomassa seca do caule e das folhas da planta. Com os dados obtidos, foi estimada a relação raiz/parte aérea das plantas.

Três amostras de cada tratamento das folhas secas de leucena foram moídas e preparadas para determinações da concentração de nitrogênio foliar pelo método da digestão sulfúrica (KJELDAHL modificado) conforme recomenda EMBRAPA (1999). Com os dados da concentração de nitrogênio foliar, foi calculado o conteúdo em nitrogênio total das folhas da planta.

Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, adotando-se o programa estatístico Estat (UNESP, 2000), e para comparações entre tratamentos foi empregado o modelo de Tukey a 1 ou 5% de significância. Para efeito de análise, os dados da contagem dos nódulos, biomassa seca e peso específico dos nódulos foram transformados em $(x+0,01)^{1/2}$, conforme recomenda Centeno (1990).

Para avaliar a eficiência da inoculação das plantas, os dados da nodulação foram correlacionados com o conteúdo de nitrogênio foliar e total das mudas, bem como com o peso fresco das plantas, estabelecendo-se o seu grau de significância, e a equação de regressão correspondente.

Resultados e Discussão

Durante o período experimental, as mudas de leucena desenvolvidas sob enviveiramento apresentaram alta taxa de sobrevivência, sem registros de mortalidade, e aos 74 dias já apresentavam desenvolvimento satisfatório para o plantio definitivo. As informações referentes ao

crescimento em comprimento do caule das mudas de leucena durante o experimento estão apresentadas na Tabela 1.

Aos 12 dias após o transplantio, as mudas de leucena apresentavam uniformidade, com média de comprimento do caule de 12,7 cm, sem contrastes significativos entre os tratamentos aplicados. Nesta fase, o comprimento do caule das plantas variou entre 11,2 e 14,5 cm. Aos 42 dias após a repicagem, as mudas apresentavam em média 16,8 cm, e, também nesta avaliação, não foram identificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Por outro lado, aos 74 dias do transplantio, quando as mudas tinham em média 28,3 cm de comprimento do caule, foram verificadas diferenças estatísticas entre tratamentos de inoculação ($P<0,01$). As plantas inoculadas com a estirpe INPA 935 apresentaram, em média, maior altura que as inoculadas com as estirpes INPA 900, INPA 927 e INPA 933. Entretanto, a melhor resposta à inoculação não diferiu significativamente dos tratamentos testemunha e adubação nitrogenada. Nota-se que as plantas inoculadas com a estirpe INPA 935, aos 74 dias, apresentavam 33,6 cm de comprimento do caule, evidenciando um rápido crescimento da leucena sob enviveiramento.

Para o diâmetro do colo, as plântulas apresentaram homogeneidade aos 12 dias após o transplantio, com média de diâmetro de 1,0 mm (variando entre 0,7-1,1 mm). Esses resultados concordam com os registrados para o comprimento do caule. Aos 42 dias, as mudas de leucena também não apresentaram respostas aos tratamentos empregados, com média diamétrica geral de 1,5 mm. Entretanto, foi verificado aos 74 dias do transplantio, que as mudas adubadas com nitrogênio mineral apresentaram a maior média de diâmetro em relação, apenas, a estirpe INPA 900. Aos 74 dias, a média de diâmetro das plantas foi de 2,4 mm.

As plantas inoculadas com as estirpes INPA

Seleção de estirpes de rizóbios

Tabela 1: Medidas do comprimento do caule e diâmetro do colo de mudas de leucena (*Leucaena leucocephala*), e de suas taxas de incremento mensal de crescimento em resposta à inoculação com rizóbios em Argissolo Vermelho Amarelo, aos 12, 42 e 74 dias após o transplantio.^{*1}

Tratamentos ^{*2}	Dias após o transplantio							
	Comprimento do caule (cm)			IMCC ^{*3}	Diâmetro do colo (mm)			IMDC ^{*3}
	12	42	74		12	42	74	
Testemunha	12,7	17,8	29,9 ab	9,2 abc	0,9	1,6	2,6 ab	0,9 ab
Adubação-N	12,8	18,4	31,9 ab	9,8 a	0,8	1,6	2,9 a	1,4 a
INPA 879	13,9	18,1	27,3 ab	7,0 abc	0,9	1,7	2,6 ab	0,9 ab
INPA 897	12,4	17,8	31,9 ab	9,7 ab	0,9	1,6	2,7 ab	0,9 ab
INPA 898	12,2	16,5	25,5 ab	6,4 abc	0,9	1,6	2,2 ab	0,6 b
INPA 899	11,2	15,8	30,0 ab	10,4 a	0,7	1,4	2,5 ab	1,0 ab
INPA 900	12,4	14,9	21,3 b	6,6 abc	0,8	1,3	1,9 b	0,7 ab
INPA 926	12,4	17,0	31,1 ab	9,1 abc	0,9	1,6	2,6 ab	0,8 ab
INPA 927	13,1	14,6	20,7 b	4,5 bc	1,1	1,3	2,0 ab	0,5 b
INPA 930	12,9	17,1	29,1 ab	9,1 abc	0,8	1,5	2,5 ab	0,9 ab
INPA 933	11,8	14,7	21,1 b	4,3 c	0,9	1,4	2,0 ab	0,5 b
INPA 935	14,5	18,7	33,6 a	11,0 a	1,0	1,6	2,7 ab	0,8 ab
INPA 936	12,4	16,7	30,1 ab	11,6 a	0,8	1,4	2,4 ab	1,0 ab
INPA 937	13,1	17,3	32,3 ab	10,5 a	0,9	1,6	2,6 ab	0,8 ab
Teste F	0,80**	1,34**	3,28**	4,75 **	0,64**	0,78**	2,48**	2,33 *

^{*1} Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si no nível de 1 % de probabilidade, pelo teste de Tukey; ns - não significativo

^{*2} – Testemunha: plantas sem inoculação e sem N-mineral; Adubação N – Plantas que receberam uréia na dosagem de 80 kg ha⁻¹

^{*3} - IMCC – Incremento mensal em comprimento do caule (cm mês⁻¹); IMDC – Incremento mensal em diâmetro do colo (mm mês⁻¹).

936, 935, 937 e 899, e as que receberam N-mineral apresentaram taxas de crescimento mensal em comprimento do caule superior a das mudas inoculadas com as estirpes INPA 927 e 933 (Tabela 1). Mesmo sem diferenças estatísticas com a testemunha, as plantas inoculadas com a estirpe INPA 936 apresentaram velocidade de crescimento em comprimento do caule 20,7 % maior que as plantas da testemunha e 15,5 % maior que as do tratamento com N-mineral. Em condições de enviveiramento, a velocidade média de crescimento em comprimento do caule da leucena foi calculada em 11,6 cm ao mês.

Em relação ao incremento mensal em diâmetro, foi verificado que as plantas da testemunha com nitrogênio superaram significativamente as taxas de crescimento mensal em diâmetro daquelas inoculadas com as estirpes INPA 898, 933 e 927,

confirmando a influência do N-mineral no desenvolvimento em diâmetro das mudas. A taxa média de crescimento mensal em diâmetro da leucena foi de 0,8 mm e a maior parte das plantas cresceu 0,8-0,9 mm ao mês, em contraste com as mudas adubadas com uréia, cuja taxa foi de 1,4 mm ao mês (Tabela 1).

Foi observado que as maiores médias da parte aérea e das folhas secas das plantas de leucena foram obtidas no tratamento de inoculação com a estirpe INPA 935, que superaram significativamente ($P<0,05$) as respostas obtidas com a inoculação com a estirpe INPA 933, sem, entretanto, diferirem dos demais tratamentos (Tabela 2). Para os parâmetros raízes e caule secos e relação raiz/parte aérea, não foram identificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos aplicados. É possível que pela

Tabela 2: Médias da biomassa seca da parte aérea, raízes, caule, folhas e relação raiz/parte aérea de mudas de leucena (*Leucaena leucocephala*) em resposta à inoculação com rizóbios em Argissolo Vermelho Amarelo, aos 74 dias após o transplantio.^{*1}

Tratamentos ^{*2}	Parte aérea seca	Raízes secas	Caule seco	Folhas secas	Relação raiz/parte aérea
	g				
Testemunha	0,83 ab	0,33	0,39	0,64 ab	0,30
Adubação-N	0,66 ab	0,27	0,43	0,63 ab	0,26
INPA 879	0,86 ab	0,31	0,33	0,53 ab	0,36
INPA 897	0,95 ab	0,36	0,41	0,54 ab	0,38
INPA 898	0,57 ab	0,23	0,24	0,34 ab	0,37
INPA 899	0,97 ab	0,39	0,38	0,59 ab	0,38
INPA 900	0,52 ab	0,25	0,30	0,43 ab	0,39
INPA 926	0,93 ab	0,28	0,37	0,57 ab	0,31
INPA 927	0,59 ab	0,26	0,25	0,35 ab	0,46
INPA 930	0,84 ab	0,29	0,37	0,47 ab	0,34
INPA 933	0,36 b	0,16	0,18	0,18 b	0,45
INPA 935	1,20 a	0,37	0,49	0,71 a	0,31
INPA 936	1,06 ab	0,32	0,45	0,61 ab	0,31
INPA 937	0,93 ab	0,37	0,45	0,48 ab	0,41
Teste F	1,96*	0,93**	1,79**	2,22*	1,75*

*1 Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si no nível de 5 ou 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey; ns - não significativo

*2 - Testemunha: plantas sem inoculação e sem N-mineral; Adubação N - Plantas que receberam ureia na dosagem de 80 kg ha⁻¹

exigência de um tempo maior de permanência no viveiro como, usualmente, ocorrem com espécies florestais (STURION, 2000), as respostas aos tratamentos fossem mais evidentes.

Embora a inoculação com a estirpe INPA 935 não diferisse significativamente da testemunha e do tratamento com nitrogênio mineral, as plantas inoculadas com esta estirpe produziram biomassa seca da parte aérea 30,8 e 45,0 % maior em relação a testemunha não inoculada e as que receberam N-mineral, respectivamente, e comparativamente para o peso de folhas secas 9,9 e 11,3 % a mais que plantas do tratamento testemunha não inoculado e que receberam N-mineral, respectivamente. A biomassa seca das raízes e do caule não diferiu entre os tratamentos e as plantas apresentaram em média 0,30 g e 0,40g

de peso das raízes secas e do caule, respectivamente. Foi observado que, a relação raiz/parte aérea também não diferiu entre os tratamentos, e variou entre 0,26 e 0,46. A relação raiz/parte aérea é algumas vezes empregada em viveiros florestais para avaliar a qualidade das mudas produzidas, e, usualmente, se considera que os valores ideais para o plantio definitivo situam-se entre as faixas de 0,30 e 0,40 (ARCO-VERDE & MOREIRA, 1998). Em decorrência desse critério, somente em quatro tratamentos as mudas não se enquadram nesta faixa, situando-se, entretanto, em valores próximos, o que evidencia que estas tinham boa qualidade para o plantio definitivo.

Em relação às variáveis da nodulação, a presença de estirpes fornecidas pelo inoculante

Seleção de estirpes de rizóbios

junto com a população nativa de rizóbios do solo contribuiu para o estabelecimento dos nódulos e, em somente uma planta do tratamento que recebeu N-mineral, não foram constatados nódulos e para as 112 mudas que constituíram este estudo experimental a taxa de nodulação da leucena foi de 98,6 %. Foi verificado que o número de nódulos formados pela estirpe INPA 897 superou significativamente os nódulos formados no tratamento com N-mineral e os inoculados com as estirpes INPA 927, 930 e 933 (Tabela 3).

O maior número de nódulos formados com a inoculação com a estirpe INPA 897, comparado ao tratamento com N-mineral ($P<0,01$), concorda com outras pesquisas feitas com espécies florestais, onde a aplicação de nitrogênio mineral inibe o estabelecimento dos nódulos. GOI et al. (1992) demonstraram esse efeito em estudos de

inoculação efetuados com *Acacia auriculiformis*. Entretanto, para usufruto dos benefícios da fixação simbiótica de N, o plantio definitivo de leguminosas arbóreas deve ser praticado com mudas que apresentem nódulos estabelecidos o que não acontece se a adubação com N-mineral é praticada na fase viveiro. Os resultados experimentais aqui apresentados evidenciam uma alta capacidade infectiva da estirpe INPA 897. Ressalta-se a boa capacidade infectiva das estirpes INPA 879 e 935, com médias de 21 e 20 nódulos por planta respectivamente, comparada as plantas da testemunha onde somente 8 nódulos em média foram formados. Isso significa que, embora a leucena forme naturalmente nódulos com estirpes nativas, o processo de nodulação pode ser incrementado com o emprego de estirpes selecionadas.

Tabela 3: Número, peso seco e peso específico dos nódulos, nitrogênio foliar e total de mudas de leucena (*Leucaena leucocephala*) em resposta à inoculação com rizóbios em Argissolo Vermelho Amarelo, aos 74 dias após o transplantio.^{*1}

Tratamentos ^{*2}	Número de nódulos	Peso seco dos nódulos (mg)	Peso específico dos nódulos (mg nódulo ⁻¹)	N-foliar (g kg ⁻¹)	N-total (mg planta ⁻¹)
Testemunha	8 ab	25,4	3,3	48,44 a	28,40
Adubação-N ^{*2}	7 b	12,4	1,7	43,32 ab	28,88
INPA 879	21 ab	17,4	0,7	43,73 ab	21,08
INPA 897	28 a	34,2	1,4	33,23 c	20,20
INPA 898	15 ab	24,4	1,7	39,55 bc	10,43
INPA 899	13 ab	23,2	1,8	44,01 ab	32,60
INPA 900	13 ab	28,4	2,2	48,52 a	28,03
INPA 926	9 ab	27,4	2,9	46,12 ab	25,28
INPA 927	7 b	16,0	2,7	43,52 ab	23,18
INPA 930	7 b	18,2	7,1	42,06 ab	25,03
INPA 933	5 b	13,6	3,4	41,72 ab	12,38
INPA 935	20 ab	53,0	3,0	45,32 ab	29,63
INPA 936	10 ab	31,8	3,4	47,94 a	25,88
INPA 937	17 ab	39,0	3,6	45,03 ab	25,78
Teste F	3,40**	1,56 ^{ns}	0,98 ^{ns}	6,18**	1,77 ^{ns}

^{*1} Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si no nível de 1 % de probabilidade, pelo teste de Tukey; ns não significativo.

^{*2} – Testemunha: plantas sem inoculação e sem N-mineral; Adubação N – Plantas que receberam ureia na dosagem de 80 kg ha⁻¹

Na Tabela 3, são apresentados os valores para o peso dos nódulos secos, peso específico de nódulos, teor de N-foliar e N-total acumulado na biomassa foliar da leucena, aos 74 dias de enviveiramento. Como pode ser observado, dentre estas variáveis, somente para o N-foliar foram demonstradas respostas significativas aos tratamentos empregados. Embora as estirpes nativas tenham desenvolvido um número menor de nódulos na testemunha, estas propiciaram uma boa absorção de N pela leucena, reforçando as informações sobre a adaptabilidade e rusticidade que se conhece dessa espécie. Os maiores valores de N-foliar foram identificados na testemunha, e nos tratamentos com a inoculação das estirpes INPA 900 e INPA 936. É importante salientar que as taxas de nitrogênio foliar da leucena, neste estudo experimental, foram elevadas, com média de 43,6 g kg⁻¹, o que significa que a concentração média de N nas folhas foi de 4,40 %, um valor tipicamente encontrado em leguminosas que tem autossuficiência em seu suprimento de N. Ao apresentar o teor de nitrogênio foliar em folhas de leguminosas arbóreas fixadoras de N₂, Moreira (1994) relacionou plantas com teores de N-foliar variando entre 3,18 e 5,60 % de N, e, dentre as espécies apresentadas, estava a leucena com 3,94 % nas folhas. Nos solos de Pernambuco, onde as estirpes utilizadas como inoculante neste estudo foram isoladas, a média de absorção de N pela leucena, quando nodulada por estirpes nativas, foi de somente 2,10 % (SOUZA et al., 2007).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para a biomassa seca e peso específico dos nódulos, entretanto a maior média de biomassa nodular foi constatada com a estirpe INPA 935, que apresentou valor de 53 mg, quando a média geral do peso seco dos nódulos foi de 25,9 mg. Para esta variável, a menor média para o peso de nódulos foi observada na testemunha com nitrogênio, que foi de 12,4 mg, mais uma vez evidenciando uma inibição do desenvolvimento

nodular pelo uso de adubo químico nitrogenado. Para o peso específico dos nódulos, as médias variaram entre 7,1 mg por nódulo obtido no tratamento de inoculação com a estirpe INPA 930 e o menor foi de 0,7, quando as plantas inoculadas com a estirpe INPA 879.

Para o nitrogênio total acumulado nas folhas da planta, mesmo sem diferenças estatísticas, foi verificado que a inoculação com a estirpe INPA 899 resultou na maior média de nitrogênio acumulado nas folhas da planta. É conhecido que a formação de mudas de leguminosas arbóreas bem noduladas na fase de viveiro permite que a planta apresente boa adaptação após o plantio definitivo, com maiores taxas de sobrevivência no campo, como foi demonstrado para a timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) por Ribeiro Júnior et al. (1986). As plantas cultivadas com nodulação estabelecida retomam imediatamente o seu crescimento após o plantio, ao contrário daquelas que são plantadas sem nódulos, que retardam seu crescimento, já que na fase inicial após o cultivo, ainda precisam ser noduladas por rizóbios nativos presentes na biomassa microbiana dos solos onde são cultivadas.

Na Figura 1 está apresentada a relação entre a biomassa dos nódulos secos e a matéria seca total da planta, que pode ser útil para identificar as melhores estirpes testadas como inoculante da leucena.

Como pode ser observado, houve poucas diferenças entre as testemunhas com e sem nitrogênio, identificados por linhas paralelas muito próximas na Figura 1. Considera-se que todas as estirpes abaixo destas linhas possuem menor eficiência que o tratamento que recebeu nitrogênio mineral. Entretanto, somente uma estirpe está posicionada acima da linha: a INPA 935, que, como a Figura demonstra, para contribuir no desenvolvimento da matéria seca total das plantas desenvolveu biomassa nodular acima da média (M). Um grupo de estirpes posicionou-se muito

Seleção de estirpes de rizóbios

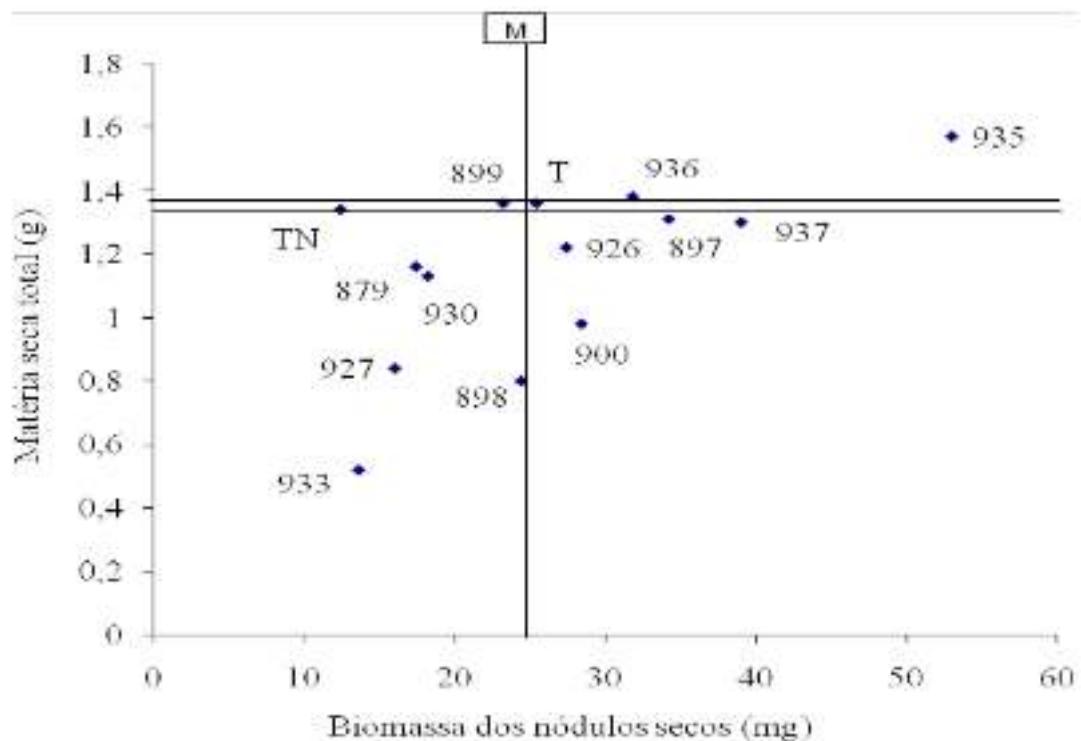


Figura 1. Relação entre biomassa seca dos nódulos e matéria seca total de mudas de leucena (*Leucaena leucocephala*), aos 74 dias do transplantio em Argissolo Vermelho Amarelo, conduzidas sob enviveiramento.

M – Média da biomassa dos nódulos secos; T - plantas sem inoculação e sem N-mineral; TN – plantas que receberam ureia na dosagem de 80 kg ha^{-1} .

próximo da linha das testemunhas, as estirpes INPA 897, 936 e 899, esta última evidenciando um bom potencial fixador de N_2 , já que apresentou biomassa de nódulos abaixo da média e produziu matéria seca da planta equivalente às testemunhas.

Deve-se considerar, que a leucena, no Argissolo Vermelho Amarelo, nodulou com estirpes nativas de rizóbios, e que o total de nitrogênio acumulado na biomassa da planta foi resultado da soma do efeito das estirpes nativas, da estirpe usada como inoculante. Nestas condições, inocular a leucena com estirpes de alta eficiência pode contribuir para aperfeiçoar os benefícios oriundos da fixação

biológica de nitrogênio.

Conclusões

Em Argissolo Vermelho Amarelo 98,6 % das mudas de leucena apresentaram nódulos. Nestas condições, a inoculação das mudas com as estirpes INPA 935 e 936 favoreceu o desenvolvimento das mudas de leucena, e a estirpe INPA 897 apresentou alta capacidade infectiva – avaliada pelo número de nódulos formados, sendo identificadas, dentre o grupo de estirpes avaliadas, como as de maior potencial de uso como inoculante na formação de mudas desta espécie.

Referências Bibliográficas

- AIHOU, K.; SANGINGA, N.; VANLAUWE, B.; LYASSE, O.; DIELS, J. & MERCKX, R. 1998. Alley cropping in the moist savanna of West-Africa: I. Restoration and maintenance of soil fertility on "terre de barre" soils in Bénin Republic. **Agroforestry Systems**, v. 42, n.3, p. 213-227, 1998.
- ARCO-VERDE, M.; MOREIRA, M.A.B. **Viveiros Florestais. Construção, custos, cuidados e atividades desenvolvidas para a produção de mudas.** Boa Vista: EMBRAPA-CPAF, Documentos 3, 1998. 32p.
- BARRETO, A.C.; FERNANDES, M.F. Cultivo de *Gliricidia sepium* e *Leucaena Leucocephala* em alamedas visando à melhoria dos solos dos tabuleiros costeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n.10, p. 1287-1293, 2001.
- BENINCASA, M.M.P. **Análises de crescimento de plantas: Noções básicas.** Jaboticabal: FUNEP. 1988. 42p.
- BLAIR, G.I. et al. . The effects of pH and calcium on the growth of *Leucaena leucocephala* in an oxisol and ultisol soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 106, p.209-214, 1988.
- CENTENO, A.J. **Curso de estatística aplicada à biologia.** UFG, Goiânia: Centro Editorial, Coleção didática 3, 1990. p. 182-185.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 1997. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de Métodos de Análise de Solo**, 2 ed, 1997, 212p.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Brasília, DF). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** SILVA, F. C. da. (Org.). Brasília: EMBRAPA Solos/EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999, 370 p.
- FARIA, S.M. de. et al.. A Seleção de estirpe de *Rhizobium* para espécies leguminosas florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 175-179, 1984.
- FRANCO, A.A. et al.. **Revegetação de solos degradados.** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1992. 8 p. (EMBRAPA-CNPAB. Comunicado Técnico, 9).
- GOI, S. R. et al.. Influence of nitrogen form on the nitrogen fixation of *Acacia auriculiformis. Symbiosis*, v. 82, p. 505-512, 1992.
- HALLIDAY, J. Integrated aproach to nitrogen fixing tree germoplasm development. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 91-117, 1984.
- HAUAD, L.A. et al.. Nutrients and volatile fatty acids in *Leucaena leucocephala*. **Forest, Farm and Community Tree Research Reports**, v. 1, p. 86-89, 1996.
- JESUS, E. da C. et al.. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-775, 2005.
- MECKDECE, F.S.; BARROS, P.L.C. Métodos para quebra da dormência de sementes de *Leucaena leucocephala*. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém. **Resumos**, Belém: EMBRAPA/CPATU, 1984. p. 141-142.
- MOREIRA, F.M.S. et al.. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist**, v.121, p. 563-570, 1992.
- MOREIRA, F.M.S. Fixação Biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. In: ARAUJO, R.S. & HUNGRIA, M. (Ed.) **Microrganismos de Importância Agrícola.** EMBRAPA-CNPAF, Goiânia, Documentos 44, 1994, p.121-149.
- NICHOLAIDES, J.J. et al.. Crop production systems in the amazon basin. In: MORAN, E.F. et. al. (Ed.). **The dilemma of amazon development.** Colorado: Westview Press-Boulder, 1983. p.101-154.
- REBRAF. Resumos monográficos. *Leucena (Leucaena leucocephala)*. **Informativo Agroflorestal**. Rio de Janeiro : REBRAF, v. 3, n.3-4, p. 2-3, 1991.
- RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. et al.. Eficiência e competitividade de estirpes de *Bradyrhizobium* spp para *Enterolobium contortisiliquum* em latossolo ácido. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Campinas, v. 10, p. 219-225, 1986.
- SANGINGA, N. et all.. Effect of successive cuttings on uptake and partitioning of N among plant parts of *Leucaena leucocephala*. **Biol. Fertil. Soils**, v. 9, p. 37-42, 1990.
- SOUZA, L.A.G. de et al.. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 207-217, 2007.
- STURION, J.A.; ANTUNES, J.B.M. Produção de mudas de espécies florestais. In: GALVÃO, A.P.M. (Org.). **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e**

Seleção de estirpes de rizóbios

- ambientais. Um guia para ações municipais e regionais.** Colombo: EMBRAPA Florestas, 2000. p. 125-150.
- VIEIRA, L.S. **Manual de Ciência do Solo.** São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1975. p. 262-265.
- VINCENT, J. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria.** IBP Handbook nº. 15. Oxford : Blackwell Scientific Publications. 1970.