

Eficiência da associação simbiótica de *bradyrhizobium* para o crescimento de crotalária (*crotalaria juncea*)

(Efficiency of symbiotic association of *bradyrhizobium* for sunn hemp (*crotalaria juncea*) growth)

Lenice Ribeiro da Silva¹; Cristiano Mantovani Belini¹; Anaira Denise Caramelo ^{1,2}; Renato Fernandes Galdiano Jr²; Wellington Marcelo Queixas Moreira ^{1,2}

¹Centro Universitário UNIFAFIBE – Bebedouro, SP, Brasil.
lenice_map@hotmail.com; cristianobelini@yahoo.com.br;

²UNESP – Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, SP, Brasil.
anairacaramelo@yahoo.com.br; renatofgaldianojr@yahoo.com.br;
moreira_wellington@yahoo.com.br

Abstract. *Crotalaria juncea* is a legumenous widely used in green manure and the production of fibers. To better understand the processes of development of sunn hemp, this study aimed to analyze the influence and efficiency of *Bradyrhizobium* strains for growth and development of *Crotalaria juncea*. For that we conducted an experimental design of randomized blocks of nine treatments and ten replicates, where the inoculation via seed and substrate with *Bradyrhizobium* strains occurred. At 60 days after planting, it was observed that the *Bradyrhizobium* strain. SEMIA 6145 via substrate was more efficient compared with the other strains.

Keywords. sunn hemp; *Bradyrhizobium*; biological nitrogen fixation; green manuring.

Resumo. A *Crotalaria juncea* é uma leguminosa muito utilizada na adubação verde e na produção de fibras. Para melhor compreender os processos de desenvolvimento da Crotalária, este estudo objetivou analisar a influencia e eficiêncie de estirpes de *Bradyrhizobium* para crescimento e desenvolvimento de *Crotalaria juncea*. Para tanto se realizou um delineamento experimental de blocos inteiramente casualizados de nove tratamentos e dez repetições, onde ocorreu a inoculação via semente e via substrato com estirpes de bactérias *Bradyrhizobium*. Após 60 dias de plantio, observou-se que a estirpe

Bradyrhizobium sp. SEMIA 6145 via substrato se mostrou mais eficiente em comparação com as demais estirpes.

Palavras-chave. crotalária; *Bradyrhizobium*; fixação biológica de nitrogênio; adubação verde.

Introdução

A Crotalária é uma leguminosa tropical da família *Fabacea*, que comprehende mais de 500 espécies, destacando-se entre estas a *Crotalaria juncea* e a *Crotalaria spectabilis*. Estas leguminosas são originárias da Ásia, sendo exploradas na indústria têxtil. Foi introduzida no Brasil por volta do séc. XIX para serem empregadas na produção de fibras de papel, demonstrando altíssima qualidade, principalmente na produção de papéis de cigarros, contudo, a crotalária recebeu grande destaque no final do mesmo século, quando passou a ser utilizada na rotação de cultura, como adubo verde (CALEGARI, 1995) e nos últimos anos estuda-se seu potencial no combate a dengue (DENÓFRIO, 2011). A crotalária é uma leguminosa, com muitas características importantes, dentre elas a rápida germinação, crescimento e desenvolvimento e sua alta tolerância à escassez de água.

A adubação verde é um processo no qual são utilizadas certas culturas vegetais para proporcionar melhorias químicas, físicas e biológicas no solo (DIAS; SOUTO, 2005). Dentre várias culturas destacam-se as leguminosas, pois estas estabelecem associação simbiótica com bactérias denominadas rizóbios que são responsáveis pelo processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) no solo (SEAB, 2011). Esta associação simbiótica com bactérias do tipo *Bradyrhizobium*, proporciona um acúmulo maior de nitrogênio na biomassa vegetal, que por sua vez se liberado no solo, substitui a adubação nitrogenada, que além de apresentar alto custo financeiro, causa agressões ao meio ambiente, dentre estas a eutrofização de corpos d'água (CALEGARI, 1995). A crotalária possui elevada produção de biomassa de fácil degradação, ciclo de cultivo curto e capacidade de controlar nematóides, assim, sendo bastante difundida como adubação verde (MASCARENHAS et al., 1994).

Quanto à importância junto à saúde publica, a crotalária tem sido plantada em terrenos baldios, fundo de quintal, jardins, praças e áreas recreativas (DENÓFRIO, 2011), visto que supostamente atrairia libélulas para a predação de larvas do mosquito *Aedes aegypti*, já que são consideradas inimigas naturais do mosquito, sendo assim, esse método denomina-se controle biológico (PARRA, et al, 2002).

Devido à grande utilização e importância desta cultura, o presente trabalho teve como objetivo analisar a influência e eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* para crescimento e desenvolvimento de *Crotalaria juncea* em casa de vegetação

Materiais e Métodos

As sementes de *Crotalaria juncea* utilizadas no decorrer do presente estudo foram doadas pela Usina Guarani S/A. O experimento foi conduzido nos laboratórios de Ciências Biológicas do Centro Universitário UNIFAFIBE, bem como na casa de vegetação do Horto Florestal de Bebedouro, SP.

As estirpes de bradirrizóbios foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da UNESP, Jaboticabal, SP. As bactérias foram cultivadas em meio de cultura YML (VINCENT, 1970) e mantidos em incubadora TECNAL (modelo TE-420) por aproximadamente 30°C e 220 R.P.M. Após 48 horas, o meio foi retirado da incubadora e logo em seguida utilizado no processo de inoculação das sementes ou substratos. As estirpes utilizadas e os tratamentos realizados estão ilustrados na tabela 1.

Tabela 1 – Metodologia experimental de inoculação dos tratamentos.

Tratamento	Estirpe	Via de Inoculação
T1	Controle (H_2O destilada)	Semente
T2	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5079	Semente
T3	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 587	Semente
T4	<i>Bradyrhizobium</i> sp SEMIA 6156	Semente
T5	<i>Bradyrhizobium</i> sp SEMIA 6145	Semente

T6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5079	Solo
T7	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 587	Solo
T8	<i>Bradyrhizobium</i> sp SEMIA 6156	Solo
T9	<i>Bradyrhizobium</i> sp SEMIA 6145	Solo

As estirpes de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6145 e SEMIA 6156 são recomendadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para inoculação de *Crotalaria juncea*.

O processo de semeadura ocorreu no laboratório de Botânica do Centro Universitário UNIFAFIBE, local no qual o experimento permaneceu por cinco dias e posteriormente foi transferido para a casa de vegetação do Horto Florestal, Instituto de Florestas do Estado de São Paulo, cuja estrutura é constituída por uma cobertura com tela de nylon para retenção de 50% da luminosidade e irrigação diária por meio de aspersores.

As sementes foram submetidas à desinfestação com hipoclorito 1% por 10 minutos, sendo posteriormente lavadas com água destilada e semeadas em número de 3 em cada vaso, preenchido com vermiculita autoclavada de granulometria média.

O experimento consistiu nos tratamentos descritos na Tabela 1. As sementes foram inoculadas com a dose de 200 ml de inoculantes para 50 kg de sementes (MOREIRA, 2009). Para os tratamentos que receberam inoculação no substrato, estas foram realizadas 30 dias após a semeadura, sendo realizada próxima ao colo das plantas com o auxílio de uma pipeta automática, mantendo a proporção padrão de 1 ml de inoculante por planta. Aproximadamente 45 dias após a semeadura, 12 ml de solução nutritiva Gibson (1987) com ausência de nitrogênio foi introduzida.

O teor de nitrogênio total foi obtido através do método de Kjeldahl e foi procedido no Departamento de Microbiologia da FCAV/UNESP.

Após 60 dias do plantio determinou-se massa fresca e comprimento da parte aérea e da parte radicular (MFPA, MFPR, CPA e CPR), número e comprimento da maior folha (NF, CMF), diâmetro do caule (DC) e número de nódulos (NN) por planta de crotalária, assim como a massa seca da parte aérea e da parte radicular (MSPA, MSPR).

Os dados das massas (fresca e seca) foram obtidos em balança analítica (modelo AG200, Gehaka®), onde a massa seca somente foi analisada após secagem das plantas em estufa a 60°C durante 72 horas até aquisição de peso constante. Os valores foram submetidos à análise de variância (Anava) e as médias separadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade pelo programa estatístico Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

Resultados e Discussão

Ao final do período experimental, foram analisados os parâmetros biométricos de CPA, CPR, DC, NF e CMF (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios de comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da parte radicular (CPR), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF) e comprimento da maior folha (CMF) para *Crotalaria juncea* inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e vias de inoculação.

Tratamento	CPA	CPR	DC	NF	CMF
	----- cm -----		----- número planta -----		
T1	3,55 d	2,80 c	1,07 c	2,97 e	2,08 e
T2	4,83 bc	4,74 a	1,09 bc	3,64 bc	2,21 cde
T3	4,15 cd	3,95 b	1,10 ab	3,18 de	2,09 de
T4	4,72 bc	4,32 ab	1,08 cd	3,34 cde	2,16 cde
T5	5,02 b	4,41 ab	1,09 bc	3,35 cde	2,31 abcd
T6	5,07 b	4,52 ab	1,09 bc	3,65 bc	2,33 abc
T7	5,10 b	4,32 ab	1,09 bc	3,54 bcd	2,31 abcd
T8	5,34 b	4,62 a	1,09 abc	3,92 b	2,40 ab
T9	6,03 a	4,91 a	1,11 a	4,53 a	2,49 a
CV (%)	9,77	9,62	1,06	8,61	6,95

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em T2 e T3 (*Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, respectivamente) não foram observadas diferenças estatísticas significativas, podendo até mesmo serem comparadas com T4 e T5 (*Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6156 *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6145) que são as estirpes recomendadas pelo MAPA. Nos tratamentos T6, T7 e T8 (*Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079; *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587; *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6156 – inoculados no substrato após a germinação), o crescimento deu-se de forma acentuada comparando aos tratamentos inoculados via semente. Em T9 (*Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6145), notou-se a grande diferença em comparativo com os outros tratamentos, no qual parâmetros como CPA e CPR atingiram valores de até 70 e 75% maiores que T1 (Controle). O número de folhas (NF) foi 65% maior quando comparado a T1 e 35% em T5.

Os resultados obtidos são relevantes, principalmente quando trata-se da utilização de crotalária como fonte de adubação, onde busca-se melhorias no solo em um curto espaço de tempo, porém, alguns fatores também devem ser considerados relevantes para o sucesso da associação simbiótica leguminosa-bactéria, tais como a completa interação entre a planta e microrganismos (KRASOVA-WADE *et al.*, 2003; SCHULZE, 2004; LIMA *et al.*, 2005; JEMO *et al.*, 2006;), a interferência de fatores bióticos e abióticos, como ocorre devido às mudanças climáticas, condições e mudanças no perfil do solo, competição de estirpes exóticas com estirpes indígenas, dentre outros. FERNANDES *et al.* (2003), considera também que a FBN é responsável pelo teor de nitrogênio acumulado pelas plantas inoculadas com estirpes eficientes, enquanto que plantas sem inoculação exibem valores demasiado inferiores, sendo assim, o inoculante também pode interferir no fracasso da associação, visto que é imprescindível levar em consideração a densidade de células no inoculante, bem como condições de sobrevivência de cada estirpe (DEPRET *et al.*, 2004).

No que se refere aos parâmetros biométricos avaliados, tais como MFPA, MFPR, MSPA, MSPR (Tabela 3), vale ressaltar que são variáveis relevantes a serem investigadas, principalmente quando o objetivo é a utilização da planta na adubação verde ou nas rotações de cultura, levando-se em consideração a produção de biomassa (COSTA *et al.* 2011).

Tabela 3 – Valores médios de massa fresca da parte aérea (MFPA) massa fresca da parte radicular (MFPR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da parte radicular (MSPR) para *Crotalaria juncea* inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e vias de inoculação.

Tratamento	MFPA	MFPR	MSPA	MSPR
	----- mg planta -----			
T1	1,08 b	1,01 e	1,02 e	1,00 e
T2	1,29 ab	1,23 bcd	1,07 bcd	1,04 bc
T3	1,21 b	1,11 de	1,04 de	1,01 de
T4	1,26 ab	1,14 cde	1,04 cde	1,02 cde
T5	1,29 ab	1,17 cde	1,05 bcd	1,03 bcd
T6	1,60 a	1,28 bc	1,07 bc	1,04 bc
T7	1,35 ab	1,28 bc	1,06 bcd	1,04 bc
T8	1,41 ab	1,36 ab	1,08 b	1,04 b
T9	1,58 a	1,51 a	1,11 a	1,07 a
CV (%)	19,00	8,92	2,02	1,34

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar do T9 ter apresentado a variável MFPA superior, os valores obtidos são praticamente constantes, não diferindo significativamente dos demais, porém, quanto avaliou-se a MSPA, o mesmo tratamento apresentou-se superior, sendo significativo ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Resultado semelhante ao encontrado por VIEIRA *et al.* 2003, onde a SEMIA 6145 apresentou os melhores valores na análise de matéria seca da parte aérea em variedades do feijão massacar, atingindo cerca de 15% a mais em comparação com a estirpe SEMIA 6462 recomendada pelo MAPA para inoculação de feijão Caupi.

Quando se busca maior produção de biomassa, seja para adubação verde, rotação, consorciação ou sucessão de culturas, a estirpe de *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6145 via solo se apresenta de forma eficiente em relação as demais estirpes, apresentando valores superiores.

Em estudo realizado por RIBAS *et al.* (2003), utilizou-se a mesma espécie de crotalária para a adubação verde consorciada com o quiabeiro, o que foi possível aumentar em cerca de 20% a produtividade de frutos desta hortaliça. Em PERIN, *et al.* (2004), foram encontrados valores superiores em consórcio com o milho.

Em trabalho realizado por SCHUER e TOMASI (2011), onde se utilizou *Crotalaria juncea* e *Crotalaria spectabilis* na adubação intercalar e reforma do cultivo da cana de açúcar, ambas as espécies apresentaram eficiência na recuperação do solo e na adubação verde, colaborando com a produção de biomassa e adição de macro e micro nutrientes, bem como a correção do pH no solo, porém, a *Crotalaria juncea* se sobressaiu em relação a outra espécie, acentuando o aumento na produtividade de cana-de-açúcar intercalar. Ainda em SCHUER e TOMASI (2011), foi concluído que esta leguminosa ocasiona melhorias na fertilidade do solo, dispensando o uso de corretivos e fertilizantes industrializados.

Em RIBAS *et al.* (2003), também concluiram que a leguminosa empregada na adubação verde é muito importante na manutenção de unidades de produção orgânica, visto que trata-se de uma fonte renovável e natural, ainda que, dentro destes centros de produção, é vedado o uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Instrução Normativa nº 07, de 17 de maio de 1999, do Ministério da Agricultura), assim, é necessário uma ampla produção de biomassa para que uma espécie seja considerada eficiente e possa ser utilizada nestes locais, porém, resultados encontrados para o cultivo de *Crotalaria juncea* apresentam-se significativos. O nitrogênio incorporado no solo através da utilização de leguminosas, segundo RIBAS *et al.* (2003), pode ser considerado como um elemento auto-suficiente, visto que a bactéria em simbiose com a planta fornece este elemento vital, e no ato do corte, desde que realizado adequadamente, a leguminosa o devolve para o solo.

O NN (Tabela 4) é um parâmetro que faz parte do protocolo de avaliação do MAPA para verificação da existência de associação simbiótica entre as bactérias e a leguminosa (COSTA *et al.*, 2011), ou seja, a existência de fornecimento de nitrogênio

para a planta através simbiose com bactérias nodulíferas. Observa-se novamente o tratamento T9 como o mais eficiente. Os nódulos podem ser observados na Figura 1.

Tabela 4 – Valores médios de número de nódulos (NN) para *Crotalaria juncea* inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e vias de inoculação.

Tratamento	NN
	-- número/planta --
T1	1,00 d
T2	1,00 d
T3	1,00 d
T4	1,96 c
T5	3,10 b
T6	3,37 b
T7	1,50 cd
T8	3,61 b
T9	6,33 a
CV (%)	14,05

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 1- Comparação do sistema radicular com nódulos entre os tratamentos T1 (ausente) e T9.

Por meio das análises realizadas no decorrer da pesquisa, é possível observar que o número de nódulos e a produção de biomassa estão intrinsecamente relacionados, visto que os tratamentos que apresentaram maior número de nódulos, também apresentaram maior produção de biomassa.

O nitrogênio total acumulado em plantas de *Crotalaria juncea* inoculadas por diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e diferentes vias de inoculação, através da metodologia semimicro de Kjedahl, apresentou valores distintos, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores Nitrogênio Total (NT) para *Crotalaria juncea* inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* e vias de inoculação.

Tratamento	NT
	-- mg tratamento --
T1	893,2
T2	938
T3	1195,6
T4	1377,6
T5	1526
T6	1400
T7	1402,8
T8	1472,8
T9	1604,4

A análise de crescimento e desenvolvimento das plantas submetidas a diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* apresentou resultados significativos no que se refere à estirpe e à via de inoculação utilizada (Figura 2).



Figura 2 – Visão geral de plantas de *Crotalaria juncea* nos tratamentos submetidos à inoculação de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*.

Considerações Finais

Após a análise de todos os parâmetros biométricos descritos, o tratamento inoculado com estirpe de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6145 via substrato (T9) se mostrou mais eficiente para os parâmetros analisados em comparação com as demais estirpes e tratamentos que receberam inoculação via semente.

Concluiu-se também, que os tratamentos que apresentaram maior teor de nitrogênio também resultaram na maior produção de biomassa, área foliar e ausência de sinais de inabilidade (folhas amarelas, tombamento, abscisão foliar, dentre outros).

Assim, a técnica de fixação biológica de nitrogênio apresenta-se como uma alternativa viável tanto economicamente, quanto ecologicamente, visto que aumenta a produção de biomassa e consequentemente de nitrogênio disponível no solo para o plantio posterior de novas culturas.

Referencias

- CALEGARI, A. **Leguminosa para adubação verde de verão no Paraná**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná- IAPAR, Circular Técnica nº 80.1995.
- COSTA, E. M.; NOBREGA, R. S. A.; MARTINS, L. V.; *et al.* Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbios em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, Piauí, 2011.
- DENÓFRIO, E. **Planta pode auxiliar no combate ao mosquito da dengue**. Disponível em: <<http://www.omovimento.com.br/modules/news/article.php?storyid= 2307>>. Acesso em 24 de jun. 2011.
- DEPRET, G. *et al.* Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 01, 2004.

DIAS, P. F.; SOUTO, S. M. Consórcio com potencial de uso como adubo verde no município de Paty do Alferes- RJ. **Revista Agronomia**, v.39, nº 1\2 p.65-70, 2005.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.7, 2003.

.FEREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p.36-41, 2008.

JEMO, M.; ABAIDOO, R. C.; NOLTE, C.; HORST, W. J. Genotypic variation for phosphorus uptake and dinitrogen fixation in cowpea on low-phosphorus soils of southern Cameroon. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.169, n.6, 2006.

KRASOVA-WADE, T.; *et al.* Diversity of indigenous bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa). **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.1, 2003.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. D. Phenotypic diversity and symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium* spp. strains from Amazonian soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, 2005.

MASCARENHAS, H.A.A.; TANAKA, R.T.; COSTA, A.B.; ROSA, F.V.; COSTA, V.F. **Efeito residual de leguminosas sobre o rendimento físico e econômico da cana-planta.** Boletim Científico nº 32. Campinas: IAC.1994.

MOREIRA, W. M. Q. **Metabolismo respiratório de bradirrizóbios durante processos in vitro e simbiótico analisado por PCR quantitativo em tempo real.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Jaboticabal, 2009.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA - FERREIRA, B. S.; e BENTO, J. M. S. **Controle Biológico no Brasil.** 3º. Edição, Barueri: Manole, 2002.

PERIN, A. *et al.* Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, 2004.

RIBAS, R. G. T. *et al.* **Manejo da adubação verde de Crotalária no consórcio com quiabeiro sob manejo orgânico.** Comunicado técnico n. 59. Embrapa, 2003.

SCHEUER, J. M. TOMASI, D. B. A Crotalária na adubação intercalar e reforma do cultivo de cana de açúcar. **Vivências: Revista Eletrônica de extensão do URI**, v. 7, n. 12, 2011.

SCHULZE, J. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.167, n.2, 2004.

SEAB. Anexo: Relação dos microrganismos autorizados para produção de inoculantes no Brasil. Disponível em: http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/in_10_06_anexo.pdf. Acesso em: 24 de jun. 2011.

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. ICB HandBook, 15, Oxford: Blackwell Scientific, 1970.

Recebido em 04/06/2014

Aprovado em 30/10/2014