

Eficiência de diferentes estirpes de *Rhizobium* em feijoeiro-comum cv. Pérola⁽¹⁾.

Aline Assis Cardoso⁽²⁾; Michel de Paula Andraus⁽²⁾; Enderson Petrônio de Brito Ferreira⁽³⁾; Rafael Lopes Esteves⁽⁴⁾; Gustavo Hernane Costa Oliveira⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Embrapa Arroz e Feijão e Capes.

⁽²⁾ Estudante de Pós-Graduação; Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás; Goiânia, Goiás; aline.assiscardoso@gmail.com; ⁽³⁾ Pesquisador; Embrapa Arroz e Feijão; ⁽⁴⁾ Estudante de Graduação; Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás.

RESUMO: Oriunda da região Centro-americana a espécie *Phaseolus vulgaris* L. (feijoeiro-comum) é de grande importância econômica e social para as diversas nações das regiões tropicais e subtropicais. Nestas regiões os grãos de feijão compõem a dieta básica de um segmento populacional expressivo, constituindo-se muitas das vezes, na principal fonte básica de proteína e de carboidrato. No cenário agrícola internacional o Brasil destaca-se como o maior produtor de feijão seguido por Mianmar, Índia, China, Estados Unidos e México. O feijoeiro desenvolve associação simbiótica nas raízes com a bactéria *Rhizobium tropici*. Quando esta bactéria está presente no solo, naturalmente ou via inoculação, ela reconhece e infecta as raízes da planta hospedeira, provocando a formação de nódulo onde ocorre a fixação do Nitrogênio (N₂). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial nodulífero de diferentes estirpes de *Rhizobium* quando comparadas a estirpe padrão SEMIA 4080. Foi realizado um experimento em casa de vegetação na Embrapa Arroz e feijão em blocos casualizados com três repetições testando diferentes estirpes de *Rhizobium* comparadas com a estirpe padrão SEMIA 4080. A estirpe PCG7A8 apresentou superior desempenho relacionado a estirpe padrão, podendo assim contribuir na nodulação do feijão do cultivar Pérola.

Termos de indexação: inoculante; nitrogênio; nódulos.

INTRODUÇÃO

Oriunda da região Centro-americana a espécie *Phaseolus vulgaris* L. (feijoeiro-comum) é de grande importância econômica e social para as diversas nações das regiões tropicais e subtropicais. Nestas regiões os grãos de feijão compõem a dieta básica de um segmento populacional expressivo, constituindo-se muitas das vezes, na principal fonte básica de proteína e de carboidrato. No cenário agrícola internacional o Brasil destaca-se como o maior produtor de feijão seguido por Mianmar, Índia, China, Estados Unidos e México (FAO, 2011). No

contexto brasileiro, a cultura do feijão encontra-se inserida principalmente no sistema produtivo da agricultura familiar (65%), possuindo, portanto, importante apelo social e econômico.

A pesquisa sobre a simbiose do feijoeiro teve bastante progresso nos últimos anos, especialmente no conhecimento do microsimbionte e no estudo de novas abordagens buscando maior variabilidade no macrosimbionte para maior eficiência na fixação biológica de nitrogênio (Andriolo et al., 1994; Franco, 1998; Nodari et al., 1993). Os estudos da diversidade e taxonomia bacteriana, especialmente aplicados aos simbiontes do feijoeiro apresentou uma grande evolução nos últimos anos devido às novas metodologias moleculares de avaliação e caracterização.

A fixação biológica de N₂ (FBN) é um processo essencial para transformar o N₂, uma molécula estável e abundante na atmosfera, que não pode ser utilizada pela maioria dos microrganismos e pelas plantas, na forma inorgânica combinada NH₃, e, a partir daí, em formas reativas orgânicas e inorgânicas vitais em sistemas biológicos. A reação de redução do N₂ a NH₃ é realizada por microrganismos que contêm a enzima nitrogenase e são conhecidos como fixadores de N₂ ou diazotróficos (Novais et al., 2007).

Em relação à classificação taxonômica do rizóbio do feijoeiro, até 1984, estava definida uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli (Jordan, 1984). Desde então, com o avanço nas técnicas de biologia molecular, foi possível constatar uma grande diversidade genética entre os microssimbiontes, permitindo, assim, a definição de novas espécies: *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. gallicum*, *R. giardinii* (Amarger et al., 1997), existindo, ainda, diversas estirpes sem posição taxonômica definida, que podem representar novas espécies (Eardly et al., 1995).

A inoculação do feijoeiro a nível de campo no Brasil foi durante muito tempo feita com inoculante produzido utilizando-se estirpes de *R. leguminosarum* bv. phaseoli e *R. etli*, sendo que muitas delas obtidas do exterior e testadas pelas

instituições de pesquisa no Brasil. Com a evolução dos estudos taxonômicos, revelando os diferentes agrupamentos de isolados com características simbióticas e adaptação ecológica distinta, inclusive envolvendo isolados obtidos nas regiões de clima tropical, revelou-se a inequação das estirpes tradicionalmente recomendadas para as condições de cultivo brasileiras. Atualmente sabe-se, conforme detalhado acima, que as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* estão sujeitas a um elevado grau de instabilidade genética (Soberón-Chaves et al., 1986; Flores et al., 1988), o que pode explicar, pelo menos parcialmente, a grande variabilidade na eficiência simbiótica verificada nestes experimentos.

Para a cultura do feijoeiro, são recomendadas, atualmente, duas estirpes, a SEMIA 4077 (= CIAT 899) e a SEMIA 4080 (= PRF 81), esta última isolada de um solo do Paraná e recomendada desde 1998, tendo comprovado alta capacidade de fixação de N₂ e competitividade contra rizóbios nativos em diversos ensaios realizados no Brasil (Hungria et al., 2000).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial nodulífero de diferentes estirpes de *Rhizobium* quando comparadas a estirpe padrão SEMIA 4080.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação da Embrapa Arroz e Feijão no município de Santo Antônio de Goiás. Para o plantio foi utilizado 800g de areia estéril (autoclavada). Essa areia foi colocada em recipientes com capacidade para 1000 ml (vaso tipo Leonard). O recipiente juntamente com a areia foram autoclavados e então colocados sobre uma mesa cuja superfície foi desinfestada com álcool (70%) e mantidos dentro de casa-de-vegetação com delineamento de blocos casualizados com três repetições. Antes do plantio, a superfície do substrato foi irrigada com 20ml de água estéril por vaso. Após essa etapa, com o auxílio de um bastão de vidro, foram feitas duas covas que receberam as sementes da cultivar pérola com uma pinça e foram cobertas. O desbaste foi realizado após 5 dias após a emergência.

A inoculação com 7 bactérias provenientes dos estados de GO, MG, PR, e a estirpe padrão SEMIA 4088. A inoculação foi feita por pipetas, sendo aplicado 2 ml de inoculante em cada vaso, 8 dias após a emergência. A irrigação foi feita com água estéril sempre que necessário, colocando a água ou solução sempre na parte inferior do vaso, evitando

assim possíveis contaminações. Uma vez por semana acrescentou-se solução de micronutrientes isenta de nitrogênio. Solução nutritiva (Franco & Dobereiner, 1967). Verificou-se o aparecimento dos nódulos nas raízes com auxílio de uma espátula flambada. A coleta foi realizada aos 35 dias após a emergência da planta. Lavou-se o sistema radicular em água corrente, secou-se em papel absorvente e coletou-se os nódulos que foram contados para determinação de número de nódulos (NN). Depois esses foram guardados e levados para estufa de secagem a 60°C por 48 horas, e pesados em balança analítica para determinação da massa seca de nódulos (MSN). A parte aérea foi separada em sacos identificados e levados para estufa de secagem nas mesmas condições usadas para os nódulos, para determinação da massa seca de parte aérea (MSPA). Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo software SISVAR (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da nodulação (número de nódulos) foram encontradas diferenças significativas para as diferentes estirpes, sendo que a PCG7A8 apresentou 147 nódulos sendo superior ao da SEMIA 4080 com 96 nódulos e o menor resultado de três nódulos foi observado para a estirpe ALSG2A9 (**Tabela 1**).

A capacidade de nodulação e a de fixar N atmosférico em leguminosas são eventos distintos e complexos visto que a eficiência não é determinada exclusivamente pela variedade da planta nem apenas pela estirpe de rizóbio, mas pela interação entre os simbiontes (Hungria & Ruschel, 1987).

Para massa seca de nódulos a estirpe PCG7A8 apresentou 220 mg e a SEMIA 4080 apresentou 150 mg, se destacando no número de nódulos e massa de nódulos em relação às demais.

Número de nódulos superior a 15 e massa de nódulos superior a 100 mg por planta têm sido considerados como suficientes para garantir o desenvolvimento adequado de plantas de soja, feijão-comum e mesmo feijão-caupi (Hungria et al., 2007; Cardoso et al., 2009; Melo & Zilli, 2009).

Quanto a matéria seca da parte aérea podemos observar que plantas com boa nodulação apresentaram valores mais altos como o da estirpe PCG7A8 que apresentou 1,96 g de MSPA e o da SEMIA 4080 que apresentou 1,21 g.

A estirpe PCG7A8 apresentou resultados melhores que as demais bactérias, superando a estirpe padrão SEMIA 4080. Mas é necessário que



se faça mais estudos com essa bactéria para avaliar seu potencial nodulífero com maior precisão.

CONCLUSÕES

Existem bactérias com potencial nodulífero capazes de estabelecer simbiose eficiente.

As bactérias são afetadas por diversos fatores ambientais no momento da simbiose com feijoeiro-comum.

REFERÊNCIAS

- AMARGER, N.; MACHERET, V. & LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Intr. J. Syst. Bacteriol.*, 47:996-1006, 1997.
- ANDRIOLO, J.; PEREIRA, P.A.A.; HENSON, R.A. Variabilidade entre linhas de formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* quanto à características relacionadas com a fixação biológica de N₂. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.29, p.831-837, 1994.
- CARDOSO, J.D.; GOMES, D.F.; GOES, K.C.G.P.; FONSECA JUNIOR, N. da S.; DORIGO JUNIOR, O.F.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S. Relationship between total nodulation and nodulation at the root crown of peanut, soybean and common bean plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v.41, p.1760-1763, 2009.
- FAO – Organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura. Feijão. Disponível em: <<http://www.fao.org.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, v.6, p.36-41, 2008.
- FLORES, M.; GONZÁLES, V.; PARDO, M.A.; LEIJA, A.; MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PIÑERO, D.; DAVILA, G.; PALACIOS, R. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.170, p.1191-1196, 1988.
- FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Especificidade de hospedeiro na simbiose com *Rhizobio* - Feijão e influência de diferentes nutrientes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.2, p.467-474, 1967.
- FRANCO, M.C. Análise da divergência genética em cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): resistência a bacterioses, nodulação e capacidade combinatória. Viçosa: UFV, 1998. 91p. Tese de Doutorado.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, p. 1515-1528, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 80p. 2007.
- JORDAN, D.C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore/London, Williams & Wilkins, p.235-244. 1984.
- MELO, S.R. de; ZILLI, J.É. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, p.1177-1183, 2009.
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling hostbacteria interactions. *Genetics*, Maryland, v.134, p.341-350, 1993.
- NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F. de; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. Fertilidade do Solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1017 p. 2007.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 43:374-377, 1993.
- SOBERÓN-CHAVES, G.; NAJERA, R.; OLIVEIRA, H.; SEGOVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 167, p. 487-491, 1986.

Tabela 1. Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e massa seca de parte aérea (MSPA) de plantas de feijoeiro-comum inoculadas com diferentes estirpes de *Rhizobium*.

| Bactérias | NN | MSN (mg planta ⁻¹) | MSPA (g planta ⁻¹) |
|------------|---------|--------------------------------|--------------------------------|
| PCG4A2 | 96,00ab | 0,29a | 0,77a |
| PCG7A8 | 147,33a | 0,22ab | 1,96a |
| ALSG2A9 | 3,33b | 0,01b | 0,49a |
| ALSG6A1 | 92,66ab | 0,32a | 1,23a |
| PCG1A2 | 75,00ab | 0,19ab | 0,83a |
| PCG2A6 | 52,33ab | 0,11ab | 0,45a |
| ALSG5A1 | 85,66ab | 0,13ab | 0,55a |
| ALSG5A6 | 27,33b | 0,08ab | 0,65a |
| SEMIA 4080 | 96,00ab | 0,15ab | 1,21a |
| C.V. (%) | 47,82 | 54,88 | 62,57 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).