

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS DE SOLOS DE MATO GROSSO DO SUL PARA INOCULAÇÃO EM FEIJOEIRO COMUM

Juliana Cristina Touro Cavalheiro⁽¹⁾, Ilda Miyuki Nakase Otsubo^(1,2), Rodrigo de Pelegrin^(1,2), Vladimir Andrei Tarasiuk⁽¹⁾, Aroldo da Silva Júnior⁽¹⁾, Fábio Martins Mercante⁽¹⁾

⁽¹⁾Embrapa Agropecuária Oeste, Cx. Postal 661, 79804-970, Dourados, MS, mercante@cpao.embrapa.br;

⁽²⁾Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (Uniderp), Dourados, MS.

Palavras-chave: *Rhizobium*, *Phaseolus vulgaris*, eficiência simbiótica, nodulação, leucena.

Introdução

A importância social e econômica da cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil é evidenciada pelo contingente de pequenos produtores, que a cultivam com baixo aporte de insumos, com crescente relevância para o agronegócio no país. A cultura ocupou, na safra 2004/2005, 3.812.800 ha, com uma produção de 3.044.400 toneladas, resultando num baixo rendimento médio nacional, de apenas 798 kg ha⁻¹ (Agrianual, 2005). O baixo nível de tecnologia empregado e o cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em N, contribuem fortemente para esse cenário. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N pela simbiose com bactérias diazotróficas, de modo eficaz, representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais a um baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e de diminuir a emissão de gases com efeito estufa. Entretanto, diversos relatos têm mencionado a baixa nodulação e ausência de resposta à inoculação em ensaios a campo, levantando dúvidas sobre os benefícios que a inoculação com estirpes superiores pode oferecer (Graham, 1981; Pereira et al., 1984; Ramos & Boddey, 1987; Hardarson, 1993). Explicações para a falta de resposta à inoculação em alguns ensaios podem residir na população numerosa, mas ineficiente, de rizóbios na maioria dos solos (Graham, 1981; Thies et al., 1991). Além disso, a baixa frequência de resposta à inoculação do feijoeiro em condições de campo tem sido atribuída à susceptibilidade de ambos parceiros simbióticos a diversos fatores ambientais, tais como temperaturas elevadas (Mercante, 1993; Hungria & Vargas, 2000), e à instabilidade genética das estirpes que haviam sido selecionadas anteriormente para o feijoeiro e que pertenciam à espécie *Rhizobium leguminosarum* (Hungria & Araujo, 1995). Por outro lado, diversos estudos têm mostrado que estirpes de *R. tropici* apresentam maior estabilidade genética e maior tolerância a temperaturas elevadas do que estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Martínez-Romero et al., 1991; Amaral, 1998; Pinto et al., 1998; Raposeiras et al., 2002).

Os objetivos do presente estudo foram obter um banco de isolados de rizóbio provenientes de diferentes solos de Mato Grosso do Sul e avaliar a sua eficiência simbiótica em feijoeiro, sob condições controladas. Este estudo compreende a etapa inicial de um programa de seleção de estirpes,

que visa a obtenção de rizóbios mais eficientes, competitivos e estáveis geneticamente, para inoculação em feijoeiro.

Material e Métodos

Os isolados de rizóbio foram obtidos de nódulos de plantas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de Wit., var. K-72, e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), cv. Carioca, crescidas em vasos de "Leonard" (Vincent, 1970). Cada vaso, contendo uma mistura de areia e vermiculita (1:1, v:v) foi esterilizado e, posteriormente, inoculado com 100 g de solo coletado em diversas regiões tradicionalmente produtoras de feijão em Mato Grosso do Sul. Inicialmente, plantas de feijoeiro foram cultivadas nos vasos de "Leonard" e, após 35-40 dias da germinação, as plantas foram colhidas, os substratos devolvidos aos respectivos vasos e os nódulos separados para o isolamento. Em seguida, plantas de *Leucaena* foram cultivadas nos mesmos vasos de "Leonard" até 65 dias após a semeadura, selecionando-se cerca de 20 nódulos em cada vaso, dos quais foram realizados os isolamentos de rizóbio. Para o isolamento das estirpes de rizóbio, os nódulos foram esterilizados superficialmente com uma solução de hipoclorito de sódio (10%) e os isolados obtidos, purificados em meio "yeast mannitol agar"- YMA (Vincent, 1970).

A eficiência simbiótica dos isolados de rizóbio foi avaliada em condições controladas de casa de vegetação, utilizando-se vasos de "Leonard" esterilizados, conforme descrito anteriormente. Nessa avaliação, culturas puras de rizóbio foram crescidas em meio YM (Vincent, 1970) a 30°C, por três dias, com agitação. Cada semente foi inoculada com 0,5 mL de suspensão, contendo cerca de 10^8 células de rizóbio mL⁻¹. Em todos os ensaios, foram incluídos tratamentos sem inoculação e outro recebendo apenas N-NH₄NO₃, que serviram de controle para comparação. Além disso, a eficiência dos isolados obtidos foi comparada com a eficiência das estirpes CIAT 899 e PRF 81, recomendadas para produção do inoculante comercial para o feijoeiro no Brasil. Durante o período de crescimento, as plantas foram supridas com solução nutritiva sem nitrogênio. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com três repetições. No início do florescimento, as plantas foram colhidas, sendo analisados parâmetros relacionados à nodulação e parte aérea das plantas. Características morfológicas, como o crescimento dos isolados em meio LB ("Luria-Bertani") e crescimento "in vitro" a 40°C em meio de cultura YMA, também foram avaliadas.

Resultados e Discussão

Leucaena leucocephala, var. K-72, e feijoeiro, cv. Carioca, foram utilizados para recuperar estirpes de rizóbio de solos de 34 municípios produtores de feijão do Estado de Mato Grosso do Sul e 01 município de Mato Grosso, abrangendo 87 locais diferentes. Conforme estudos anteriores, a recuperação de rizóbio do solo utilizando *Leucaena leucocephala* como “planta-isca” mostrou-se eficiente na obtenção de isolados mais estáveis geneticamente e com elevada capacidade simbiótica quando inoculada em feijoeiro (Mercante, 1993; Mercante et al., 1998). Foram obtidos 1.526 isolados de rizóbio, sendo 65% oriundos de nódulos de leucena e 35% de nódulos de feijoeiro.

Avaliaram-se 351 isolados de rizóbio obtidos de nódulos de leucena e 147 isolados de feijoeiro quanto ao crescimento em meio LB ("Luria-Bertani") e crescimento "in vitro" a 40°C. Do total dos isolados de nódulos de leucena, 60% cresceram em meio LB, dos quais cerca de 82% também cresceram a 40°C. Por outro lado, dos isolados que não cresceram no meio LB (40%), apenas 32% apresentaram crescimento a 40°C. Quanto aos isolados de nódulos de feijoeiro, 54% cresceram em meio LB, dos quais 90% também cresceram a 40°C. Dos isolados que não cresceram em meio LB, cerca de 75% dos isolados também não cresceram a 40°C. Tais resultados indicam uma elevada correlação entre o crescimento em meio LB e sua tolerância a temperatura de 40°C.

A eficiência simbiótica de 380 isolados de rizóbio obtidos de leucena e 147 isolados obtidos de feijoeiro foi avaliada sob condições controladas de casa de vegetação, em doze experimentos. Dos isolados de nódulos de leucena, cerca de 51, 74 e 72% foram mais eficientes do que a estirpe CIAT 899, quanto ao número de nódulos, peso de nódulos secos e produção de matéria seca da parte aérea das plantas, respectivamente. Do mesmo modo, a grande maioria destes isolados de rizóbio mostraram-se mais eficientes que a estirpe PRF 81, quando inoculados em sementes de feijoeiro. Entre os isolados de rizóbio obtidos de nódulos de feijoeiro, a maioria mostrou-se menos eficiente do que a estirpe CIAT 899. Nesse caso, a estirpe CIAT 899 mostrou-se mais eficiente do que 65, 54 e 61 % dos isolados de feijoeiro, quanto ao número de nódulos, matéria seca de nódulos e de parte aérea, respectivamente.

Conclusões

1. Um grande número de isolados de rizóbios nativos de solos de diversas regiões de Mato Grosso do Sul e obtidos de nódulos de leucena e feijoeiro demonstraram um grande potencial simbiótico para inoculação em feijoeiro, abrindo perspectivas para a obtenção de inoculantes mais eficazes para esta cultura.

2. A recuperação de rizóbio do solo utilizando a leucena como planta-isca mostrou-se mais eficiente na recuperação de isolados com maior eficiência simbiótica com o feijoeiro, do que quando os isolados foram obtidos diretamente de nódulos de feijoeiro.

Referências Bibliográficas

AGRIANUAL 2006: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Instituto FNP, p. 308, 2005.

AMARAL, E. S. **Papel de plasmídeos em estirpes de *Rhizobium* que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): estabilidade, efetividade simbiótica e tolerância a estresses ambientais.** 1998. 122 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

GRAHAM, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 4, p. 93-112, 1981.

HARDARSON, G. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, 1-17, 1993.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Relato da VI Reunião de laboratórios para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S. (Ed.). **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI.** Londrina: IAPAR: EMBRAPA-CNPSO, 1995. p. 476-489.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors impacting N₂ fixation in legumes grown in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P. H.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, p. 417-426, 1991.

MERCANTE, F. M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro.** 1993. 149 f. Tese (Mestrado em Ciência do Solo) – Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO JÚNIOR, W.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian "Cerrado" region. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 49-58, 1998.

PEREIRA, P. A. A.; ARAUJO, R. S.; ROCHA, R. E. M.; STEINMETZ, S. Capacidade dos genótipos de feijoeiro de fixar N₂ atmosférico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 19, p. 811-815, 1984.

PINTO, P. P.; RAPOSEIRAS, R.; MACEDO, A. M.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; SÁ, N. M. H. Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating *Rhizobium* strains. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 295-300, 1998.

RAMOS, M. L. G.; BODDEY, R. M. Yield and nodulation of *Phaseolus vulgaris* and the competitiveness of an introduced *Rhizobium* strain: effects of lime, mulch and repeated cropping. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 171-177, 1987.

RAPOSEIRAS, R.; PINTO, P. R.; PASSOS, R. V. M.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; SCOTTI, M. R.; SÁ, N. M. H. Variability of isolated colonies in bean nodulating *Rhizobium* strains before and after exposure to high temperature. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33; p. 149-154, 2002.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 19-28, 1991.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria.** London: International Biological Programme, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).