



# XXXIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

Solos nos biomas brasileiros: sustentabilidade e mudanças climáticas  
31 de julho à 05 de agosto - Center Convention - Uberlândia/Minas Gerais

## BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO ISOLADAS DA RIZOSFERA DO FEIJOEIRO

**Rosana Faria Vieira<sup>(1)</sup>; Adriana Parada da Silveira<sup>(2)</sup>; Vera Ferracini<sup>(1)</sup>; Harissa Alves Duarte<sup>(3)</sup>** <sup>(1)</sup>Embrapa Meio Ambiente, CP 69 CEP 13620-000, Jaguariúna, SP, Brasil. Email: rosana@cnpma.embrapa.br; <sup>(2)</sup>Instituto Agronômico, Centro de Solos e Recursos Ambientais, CP 28, CEP 13020-902, Campinas, SP, Brasil. Email: apdsil@iac.sp.gov.br; <sup>(1)</sup>Embrapa Meio Ambiente, CP 69 CEP 13620-000, Jaguariúna, SP, Brasil. Email: veraf@cnpma.embrapa.br; <sup>(3)</sup>Bolsista da Embrapa Meio Ambiente

**Resumo** – Várias condições ambientais limitam a fixação simbiótica do N<sub>2</sub> pelo feijoeiro. Por ser uma cultura muito utilizada por pequenos agricultores, as adubações nitrogenada e fosfatada não são feitas de forma adequadas, resultando na maioria das vezes em queda da produtividade. A utilização de rizobactérias promotoras do crescimento de planta (RPCP) tem surgido como técnica promissora para aumentar a produtividade do feijoeiro. Este trabalho teve como objetivo isolar RPCPs com capacidade para solubilizar fosfato e também como antagonistas a determinadas doenças do feijoeiro. Das 172 bactérias isoladas apenas 23 mostraram-se capazes de solubilizar fosfato em meio de cultura. No teste de antagonismo, somente o isolado T62 mostrou potencial para controle da antracnose (*C.lindemuthianum*) e da murcha do fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*).

**Palavras-Chave:** solubilização de fosfato, antagonismo, *Phaseolus vulgaris* L.

### INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, o uso de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) tem aumentado significativamente em várias partes do mundo, resultando em aumento expressivo no crescimento e rendimento de culturas importantes agronomicamente (Chen et al., 1994; Amara e Dahdoh, 1997; Asghar et al., 2002; Silva et al., 2006). Estudos têm também demonstrado que a habilidade de algumas bactérias para promover o crescimento é altamente específica para certas espécies, cultivares e genótipos de plantas (Bashan, 1998). A co-inoculação de RPCP e estirpes de rizóbios tem também demonstrado que rizobactérias podem influenciar de forma positiva na fixação biológica do nitrogênio em algumas leguminosas (Figueiredo et al., 2008; Dardanelli et al., 2008). A fixação do N<sub>2</sub> em leguminosas é um processo que requer fósforo. Nódulos de plantas adequadamente supridas com P têm maior concentração deste elemento do que a parte aérea e raiz, podendo conter até 1,5% do P total da planta (Schulze et al., 2006). No caso do feijoeiro, vários estudos têm sido realizados no sentido de identificar estirpes eficientes e competitivas de rizóbio capazes de suprir os requerimentos nutricionais da planta. No campo, porém, a fixação biológica do N<sub>2</sub> tem demonstrado certa instabilidade (Mostasso et al., 2002; Hafeez et al., 2005). Embora nos últimos 20 anos

tem-se verificado maior interesse por parte de grandes produtores, na cultura do feijão, ela é normalmente cultivada por pequenos produtores, que muitas vezes não utilizam as tecnologias disponíveis para obtenção de altos rendimentos, principalmente irrigação, adubação nitrogenada e fosfatada.

Este trabalho tem como objetivo isolar RPCPs da rizosfera do feijoeiro e selecioná-las de acordo com algumas características como capacidade para solubilizar fosfato e antagonismo a alguns fungos causadores de doenças. A obtenção destes microrganismos visa a seleção de bactérias que possam, ao ser inoculadas no feijoeiro, na presença ou não de estirpes eficientes de rizóbio, aumentar a produtividade dessa cultura.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### *Isolamento de bactérias da rizosfera do feijoeiro*

*Phaseolus vulgaris* L. cv. Alvorada foi cultivado em sete solos com diferentes características químicas e físicas. Em três vasos de cada tipo de solo foi semeado com feijão. Trinta e quatro dias após a emergência, duas plantas foram arrancadas e amostras de solo rizosférico foram coletadas. No período de florescimento, o solo da rizosfera da terceira repetição foi coletado. Para isolar as bactérias do solo rizosférico, as raízes foram imersas em 90 mL de uma solução de MgSO<sub>4</sub> e diluído até 10<sup>-6</sup>. Foram feitas três repetições para cada diluição, utilizando-se três meios de cultura: Meio de King (g L<sup>-1</sup>: peptone, 5; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0.75; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.75; agar 7.0; glicerina 5 ml), meio tripcase soya agar (TSA, 15g L<sup>-1</sup>) e meio ágar nutriente (NA, 8g L<sup>-1</sup>). Os isolados obtidos foram verificados quanto à pureza pelo método das estrias. As bactérias isoladas foram armazenadas a 5°C, em óleo mineral.

#### *Atividade de solubilização de fosfato e capacidade antagonista a determinados patógenos*

A seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato foi inicialmente feita como descrito por Sylvester-Bradley et al (1982), com algumas modificações. O meio de cultura utilizado foi o que se segue (g L<sup>-1</sup>): glicose - 10; extrato de levedura - 2; MgSO<sub>4</sub> - 0,25; KCl - 0,2; NaCl - 0,1; agar - 20. O meio foi suplementado com duas soluções: a solução A - feita adicionando-se 5g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 50 mL de água e a solução B - adicionando-se 10g de CaCl<sub>2</sub> a 100 mL de água. O pH final foi ajustado para 6,5-7,0. Bactérias solubilizadoras de fosfato foram identificadas pela formação de um halo claro em torno das colônias, após sete dias de incubação a 30°C. O teste de antagonismo foi feito pelo método quadriculado, ou seja, o fungo foi

colocado no centro da placa contendo o meio BDA (batata-dextrose-ágar) e a bactéria a ser testada foi colocada em quatro pontos formando uma cruz. Foram utilizados neste teste os isolados que formaram halo no teste de solubilização de fosfato. Dois patógenos foram testados: *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) Lams. – Scrib - causador da antracnose e o *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder -causador da murcha de fusário. As bactérias que não permitiram o crescimento dos fungos foram consideradas microrganismos com potencial para utilização no controle dessas doenças.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 102 bactérias no meio TSA, 77 no meio de King e 35 no meio ágar nutriente, num total de 172 isolados. Todas essas bactérias foram testadas para solubilização de fosfato em meio de cultura sólido. As bactérias que formaram halo foram selecionadas para testes posteriores. Esses isolados constam na tabela 1. A capacidade antagonica aos patógenos *C. lindemuthianum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* variou bastante entre os 22 isolados com potencial para solubilizar fosfato (Tabela 2). Somente o isolado T62 teve um efeito negativo sobre o crescimento dos dois fungos patogênicos (Figura 1). Carvalho et al. (2011) demonstrou que seis isolados de *T. harzianum* possuíam potencial como antagonistas contra *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*. A produção de metabólitos voláteis seria o mecanismo de ação comum a todos esses isolados. A antracnose [*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) Lams. – Scrib] é considerada uma das mais graves doenças que atingem o feijoeiro no Brasil, principalmente em localidades com baixa temperatura e alta umidade relativa do ar (Maringoni e Barros, 2002). Segundo Corrêa et al. (2008), o isolado DFs912 apresenta características que também possibilitam o seu uso em programas de controle biológico de *C. lindemuthianum*.

O fato de as estirpes apresentarem diferentes capacidades para solubilizar fosfato e antagonismo aos fungos *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *C. lindemuthianum* pode ter importantes implicações na formulação de inoculantes, uma vez que várias características de promoção de crescimento da planta podem estar associadas a um único isolado.

Todos os isolados que demonstraram capacidade para solubilizar fosfato serão submetidos a outros testes como a produção da deaminase do ACC, produção de sideróforos, produção de hormônios e quantificação da produção de fosfato em meio de cultura líquido. Aqueles que apresentarem o maior número de características relacionadas à promoção de crescimento da planta serão utilizados em experimentos com planta do feijão, na presença não de rizóbios considerados eficientes para essa cultura.

### CONCLUSÕES

1. O isolado T62 mostrou-se promissor para ser utilizado em programas de inoculação do feijoeiro, objetivando melhor rendimento da cultura e, portanto, está sendo submetido a outros testes.

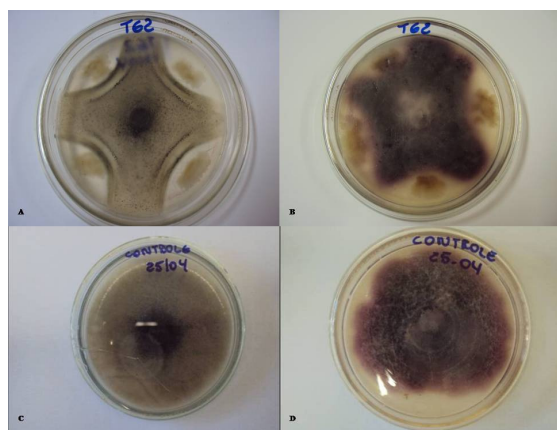
**Tabela 1.** Isolados bacterianos que apresentaram potencial para solubilizar fosfato

Isolados bacterianos com potencial para solubilizar fosfato		
Meio TSA	Meio King	Meio AN
T8	K24	AN2
T20	K35	AN7
T25	K55	AN20
T28	K65	AN24
T49	K71	AN25
T69		AN30
T62		AN32
T79		
T89		
T102		

**Tabela 2.** Isolados bacterianos com potencial antagonico contra as doenças antracnose e murcha de fusarium

Isolados bacterianos	Doenças	
	Antracnose ( <i>C.lindemuthianum</i> )	Murcha do fusário ( <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> )
AN2	-	-
AN7	-	-
AN20	+	-
AN24	+	-
AN25	-	-
AN30	-	-
AN32	-	-
K24	-	+
K35	-	-
K55	-	-
K65	-	-
K71	-	-
T8	-	-
T20	-	-
T25	-	-
T28	-	-
T49	-	-
T62	+	+
T69	-	-
T79	-	-
T89	-	-
T102	-	-

+, efeito positivo sobre a doença; - efeito negativo sobre a doença. As bactérias isoladas no meio ágar nutriente, meio de King e meio TSA receberam as denominações AS, K e T, respectivamente.



**Figura 1.** Efeito do isolado T62 sobre o fungo causador da antracnose *Colletotrichum lindemuthianum* (A), tratamento controle do fungo *C. lindemuthianum* (C), murcha de fusario *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e o isolado T62 (B) e tratamento controle do fungo *F.oxysporum* f.sp. *phaseoli* (D).

## REFERÊNCIAS

- AMARA, M.A.T. e DAHDOH, M.S.A. effect of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and uptake of nutrients by wheat grown on sandy soil. *Egypt J. Soil*, 37:467-484, 1997.
- ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIG, A. Plant growth regulating substance in the rhizosphere; microbial production and functions. *Adv. Agron.*, 62:146-151, 2002.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.*, 16:729-770, 1998.
- CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; JUNIOR, M.L.; SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum* *Trop. plant pathol.*, 36:28-34, 2011
- CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZ-KABAÑA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol. Control*, 5:83-91, 1994.
- CORRÊA, B.O.; MOURA, A.B.; DENARDIN, N. D'ÁVILA; SOARES, V.N.; SCHÄFER, J.T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.) *Rev. Bras. Sementes*, 30:156-163, 2008
- DARDANELLI, M.S.; CORDOBA, F.J.F.; ESPUNY, M.R.; CARVAJAL, M.A.R.; DÍAZ, M.E.S.; SERRANO, A.M.G.; OKON, Y.; MEGÍAS, M. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biol. Biochem.*, 40:2713-2721, 2008.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; MARTINEZ, C.R.; BURITY, H.A.; CHANWAY, C.P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotech.*, 24:1187-1193, 2008.
- HAFEEZ, F.Y.; NAEEM, F.I.; NAEEM, R.; ZAIDI, A.H.; MALIK, K.A. Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* isolated from agriculture soils in Faisalabad. *Environ. Exp. Bot.*, 54:142-147, 2005.
- MARINGONI, A. C; BARROS, E. M. de. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. *Summa Phytopathol.*, 28:197-200, 2002.
- MOSTASSO, L.; Mostasso, F.L.; Dias, B.G.; Vargas, M.A.T.; Hungria, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Resear.*, 73:121-132, 2002.
- SCHULZE, J.; TEMPLE, G.; TEMPLE, S.J.; BESCHOW, H.; VANCE, C.P. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. *Ann. Bot.*, 98:731-740, 2006.
- SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; FIGUEIREDO, M.V.B. Atuação de rizóbios com rizobactérias promotoras de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Acta Sci. Agron.*, 28:407-412, 2006.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A. & PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazon.*, 12:15-22, 1982.