

# XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

## “Seleção de estirpes de *Rhizobium* com eficiência simbiótica em feijoeiro com base na análise multivariada”

DIVA S ANDRADE<sup>1</sup>; JUSCÉLIO DONIZETE CARDOSO<sup>2</sup>; MARIANGELA HUNGRIA<sup>3</sup>; MARIA ELIZABETH DA COSTA VASCONCELLOS<sup>4</sup>; MARIA APARECIDA DE MATOS<sup>5</sup> & ORAZILIA FRANÇA DORIGO<sup>6</sup>

**RESUMO** - O objetivo foi utilizar a análise multivariada para selecionar estirpes de rizóbios com eficácia na simbiose com o feijoeiro. Foram utilizadas 45 estirpes elite de rizóbios de feijoeiro (IPR Pv-) e as estirpes de *Rhizobium tropici* tipo B SEMIAs -4077, -4080 e -4088 (CIAT899, PRF81, H12) e o tratamentos controle sem inoculação, sem e com N-mineral. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. A associação, entre análise multivariada, técnicas de componentes principais (ACP) e análise de agrupamento permitiu separar um grupo menor de estirpes com alto potencial para estudos de campo. A análise multivariada baseada em seis variáveis relacionada à FBN, reduziu de um grupo de 45 estirpes elites permitindo a seleção de seis estirpes eficazes na FBN para teste em campo.

**Palavras-Chave:** (*Phaseolus vulgaris*; fixação biológica de nitrogênio; N-ureído)

### Introdução

Determinadas espécies de *Rhizobium*, quando em simbiose com o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L), apresentam a capacidade de formar nódulos efetivos e com isso fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico (FBN), e reduzir no o de fertilizantes nitrogenados [1]. No Brasil, programas de pesquisa para seleção de estirpes de rizóbios têm buscado a eficácia e estabilidade das características da FBN [2]. Porém, antes de uma avaliação da eficácia dessas bactérias em experimentos de campo, uma análise em solo, em casa de vegetação, para avaliar variáveis relacionadas à FBN, com um número grande e diverso é essencial para se ter material pré selecionado.

A análise de componente principal é uma técnica que, aplicada na presença de mais de quatro variáveis, e permite a visualização gráfica das componentes principais, conhecendo-se assim o padrão de dispersão dos indivíduos. O uso de técnicas multivariadas permite sintetizar o estudo e interpretação de um conjunto de dados com um grande número de variáveis, principalmente, quando os dados são quantitativos. Isto se deve ao fato da redução e dimensionamento de dados sem perder informação.

Neste sentido, o estudo foi conduzido com o objetivo de realizar a seleção de estirpes elite com base

na análise multivariada de componentes da fixação biológica do nitrogênio.

### Material e Métodos

O experimento foi conduzido em solo com população estabelecida de rizóbio, em casa de vegetação. Foram utilizadas 45 estirpes elite (pré selecionadas) de rizóbios microsymbiontes de feijoeiro, provenientes da Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio do Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico do Paraná (IPR Pv-), e três estirpes de *Rhizobium tropici* tipo B SEMIAs -4077, -4080 e -4088 (CIAT899, PRF81, H12) autorizadas pelo MAPA para a produção de inoculantes para a cultura do feijoeiro, no Brasil. Dois tratamentos controle sem inoculação, sem e com N-mineral foram incluídos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições.

No início do florescimento do feijoeiro, estágio fenológico R6. Aos 42 dias após a emergência (DAE), as plantas foram coletadas para avaliar os seguintes parâmetros: massa da parte aérea seca (folhas, caule e pecíolos), massa das raízes secas; nodulação (número e massa de nódulos secos), N-total da parte aérea; na seiva do xilema, N-ureído (alantoína e ácido alantóico), N-nitrato e N-total.

Os dados originais de componentes de planta e da fixação biológica de N<sub>2</sub> foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando o F foi significativo, foi aplicado o teste de médias Scott Knott com 5% de probabilidade. Para obter as componentes principais, os dados foram submetidos à análise utilizando o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System) utilizando o procedimento "PRINCOMP" (SAS, 1999).

Pela análise multivariada as três componentes escolhidas (Y1, Y2 e Y3) resumiram as seis variáveis originais (massa e N total na parte aérea (g kg<sup>-1</sup>), N seiva e N-ureído (nmol) e massa e número de nódulos (mg pl<sup>-1</sup>). A partir dos dados gerados da análise de componentes principais (ACP) usou-se o "PROC CLUSTER" e o método "COMPLETE" como técnica para gerar o dendrograma por meio do procedimento "PROC TREE" do SAS. Ao final desta análise, obtém-se um gráfico de fácil interpretação, chamado dendrograma a partir da matriz D2, ou seja, a matriz de distância euclidiana.

<sup>1,4,5,6</sup> Instituto Agronômico do Paraná, cx Postal 481, Londrina, PR, Brasil. E-mail: [diva@iapar.br](mailto:diva@iapar.br)

<sup>2</sup> Doutorando microbiologia, UEL, Londrina, PR, Brasil.

<sup>3</sup> Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil.

## Resultados

As plantas não inoculadas (controle) apresentaram nodulação, antes do plantio o solo apresentou uma de população estabelecida de rizóbio nodulante do feijoeiro, em média de  $10^6$  células viáveis (g de solo seco)<sup>-1</sup>. A aplicação do N mineral não inibiu a nodulação com 202 mg massa seca de nódulos. A variável, massa seca da parte aérea do feijoeiro, mostrou que na inoculação com estirpes elites (eficientes), o feijoeiro responde em termos de crescimento. Os valores médios de massa seca do feijoeiro inoculado variaram de 4,26 a 7,52 g planta<sup>-1</sup> nos tratamentos com as inoculações com as estirpes IPR Pv-195 e IPR Pv -445, respectivamente (Dados não apresentados). Com base na massa seca da parte aérea da planta foi observado que, o tratamento com N mineral separou-se dos demais com 11,23 g planta<sup>-1</sup> e as estirpes testadas formaram dois grupos, sendo o maior grupo composto por 35 estirpes sem diferenças significativas da testemunha sem N e sem inocular ( $p < 0,05$ , teste Scott Knot). Entretanto, 14 estirpes de rizóbio testadas se agruparam com as estirpes SEMIAS -4077, -4080 e -4088, e os valores médios de massa seca foram na faixa de 6,57 a 7,52 g planta<sup>-1</sup>. O N total na parte aérea, também, foi significativamente diferente entre as estirpes testadas, com médias de 89 a 198 mg planta<sup>-1</sup>. Baseando-se nesta variável foi observado dois grupos, um composto de 11 estirpes eficientes com valores variando de 140 a 198 mg N planta<sup>-1</sup> e sem diferença significativa do tratamento com N mineral. Apenas seis variáveis dos componentes de planta relacionadas com a fixação biológica do nitrogênio (FBN) foram utilizadas na análise multivariada. A associação, entre análise multivariada, técnicas de componentes principais (ACP) e análise de agrupamento, foi utilizada para facilitar o trabalho de seleção das estirpes eficiente, essa metodologia é recomendada quando existe um número maior do que quatro variáveis.

Pela análise de agrupamento foi formado dois grandes grupos (GI e GII), sendo que o GI foi composto pela SEMIA 4077 e 4088, controle, N mineral e 14 estirpes IPR Pv. O GI foi dividido em dois subgrupos, sendo que, no IA agrupou algumas estirpes IPR Pv-, a SEMIA-4077 e 4088 e o tratamento com N mineral, enquanto, no subgrupo IB o controle, a três estirpes IPR Pv (Figura 1).

No segundo grupo (GII) agrupou-se a maioria das estirpes IPR Pv e foram divididas em dois subgrupos. No subgrupo IIA foi constituída pela SEMIA 4080 e 28 estirpes IPR Pv. No subgrupo IIB foram agrupadas apenas as estirpes IPR Pv-, 446, 591 e 611 (Figura 1).

## Discussão

A análise de agrupamentos (Cluster Analysis) tem como objetivo dividir as observações da amostra em grupos de forma que os elementos pertencentes a um mesmo grupo sejam similares entre si em relação as variáveis que neles foram medidas. O método usado neste trabalho foi o da ligação completa, ou seja,

aquele que leva em consideração a maior distância entre os tratamentos. Pelo gráfico de dispersão dos tratamentos analisados, em função do terceiro e segundo componente ( $Y_3$ =nodulação e  $Y_2$ =crescimento de planta), foi observado que a estirpe IPR Pv -367 se destacou das demais, enquanto, as estirpes IPR Pv-652, -593 e -580 ficaram em uma posição intermediária. A estirpe IPR Pv -2606 ficou isolada com valores baixos para nodulação e crescimento de planta (Dados não apresentados).

Foi observado que, ao aplicar a análise de componentes principais em dados relacionados com a FBN, esta técnica foi eficiente em reduzir o número de medidas (variáveis) necessárias para a avaliação da eficiência da simbiose fixação biológica  $N_2$  em feijoeiro. Por exemplo, uma conclusão de interesse para quem trabalha com feijoeiro, o número de nódulos não é uma variável essencial para classificar estirpes eficientes.

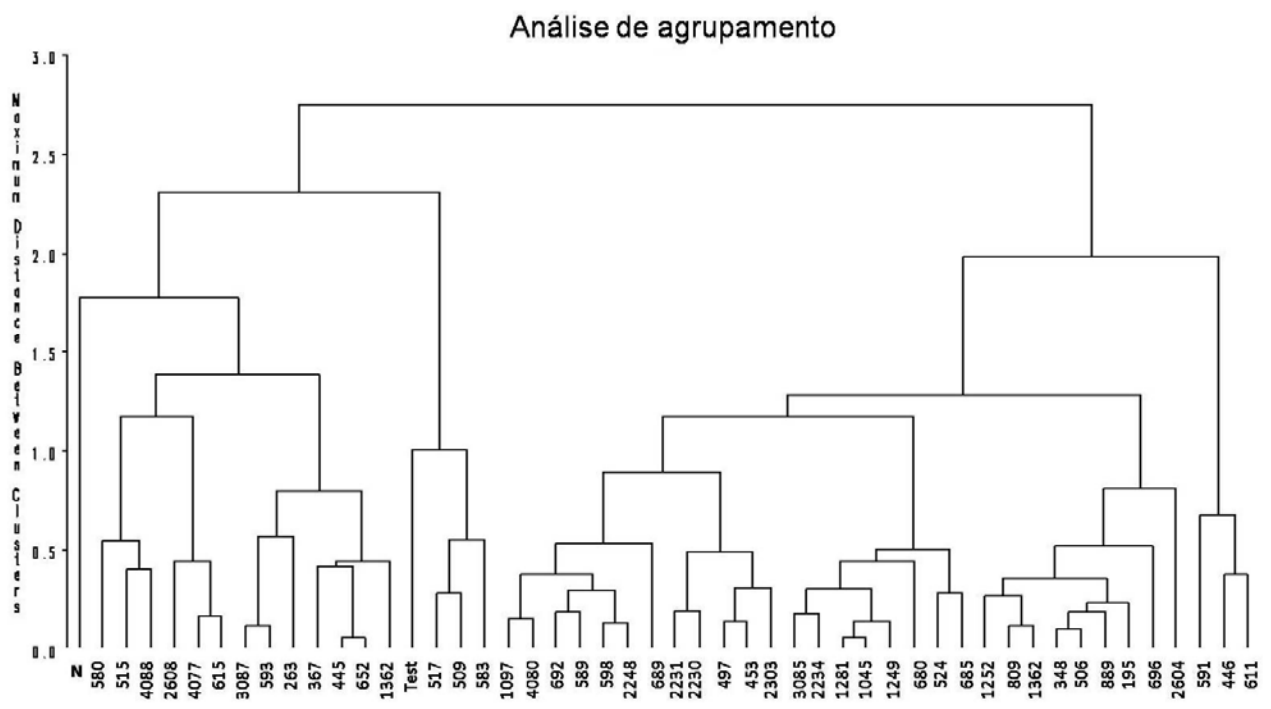
Neste estudo, as diferenças entre as estirpes de rizóbios elite e os tratamentos utilizados (com e sem N) foram observadas pela visualização gráfica das componentes principais, conhecendo-se assim o padrão de dispersão dos indivíduos (Figura 1).

## Conclusões

A análise multivariada baseada em seis variáveis relacionada à FBN, reduziu de um grupo de 45 estirpes elites permitindo a seleção de seis estirpes eficazes na FBN para teste em campo.

## Referências

- [1] ARAÚJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M., eds. Microorganismos de Importância Agrícola. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p. 91-120.
- [2] HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobio from Brazil. Soil Biology & Biochemistry, v. 32, p. 1515-1528, 2000.



**Figura 1.** Agrupamento das estirpes elite de rizóbio-*Phaseolus* e dos tratamentos (com e sem N mineral) com base na análise de componente principal pelo método completo.