



CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, LICENCIATURA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE ESTIRPES DE
RIZÓBIOS NATIVOS DO VALE DO TAQUARI EM PLANTAS DE
FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Eduardo Martins de Souza

Lajeado, novembro de 2013

**CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, LICENCIATURA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE ESTIRPES DE
RIZÓBIOS NATIVOS DO VALE DO TAQUARI EM PLANTAS DE
FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Eduardo Martins de Souza

Monografia apresentada na disciplina de
Prática Supervisionada em Pesquisa, do
curso de Graduação em Ciências
Biológicas.

Orientador: Dr. Raul Antonio Sperotto
Coorientadora: Camille Eichelberger
Granada

Lajeado, maio de 2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Victor, que iniciou este trabalho e me incentivou a continuá-lo;

Aos meus orientadores Camille e Raul, pelo esforço em ajudar, pelos ensinamentos e pela paciência;

Aos meus pais pela infância e juventude livre que me proporcionaram, e pelo incentivo aos estudos;

À Vanessa, pelo tempo que tem passado ao meu lado, pelo transporte do material da pesquisa, pela paciência durante minha ausência e pelo nosso nenê que está chegando e que me deu a maior razão para continuar;

Ao Unianálises, representado pela Tainá, pela concessão de uso dos equipamentos da microbiologia, e à Júlia, ao Diego e à Graziela, pela força que me deram e que ainda me darão;

Ao laboratório de micropropagação da Univates, pelo empréstimo dos equipamentos e reagentes, à professora Elisete pela permissão de uso dos ambientes e equipamentos, à Marelise e ao Gabriel pelas dicas fundamentais no momento mais desanimador;

À Tuca e à Bia, do laboratório didático de microbiologia, sempre dispostas;

À Miriam, Larissa, Carol e à Úrsula, do Museu de Ciências Naturais pelo empréstimo dos materiais e equipamentos;

Aos camaradas Lucas e Douglas pela força no cuidado com os feijoeiros;

Ao Vilson, e à Cleusa pelo empréstimo de material;

À Fruki, pelas garrafas utilizadas para confeccionar os vasos;

Ao meu avô Domingos, pelo incentivo e por acreditar naquilo que é diferente.

RESUMO

O feijão é produto de grande importância econômica e nutricional, e ao mesmo tempo uma cultura capaz de promover uma melhoria na fertilidade do solo através da fixação biológica do nitrogênio, utilizando-se práticas como a rotação de culturas e adubação verde. Para alcançar melhores resultados a partir destas práticas agrícolas faz-se necessário esclarecer algumas relações entre rizóbios e plantas, relativas à fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico, além de buscar estirpes de bactérias que apresentem resultados mais promissores. A presente monografia é o resultado de uma pesquisa desenvolvida durante o ano de 2013 que pretendeu estudar a relação entre o número de nódulos em raízes de *Phaseolus vulgaris* L. (feijoeiro comum), o peso seco das plantas e a concentração de células de rizóbios inoculado no substrato, comparando o efeito da inoculação de diferentes isolados de rizóbios. Para tanto, conduziu-se um experimento em casa de vegetação, com 10 isolados oriundos do Vale do Taquari em três diferentes densidades de células, no qual o número de nódulos nas raízes, o peso seco da parte aérea e o peso seco das raízes foram avaliados. Apenas em dois tratamentos do isolado RS11 houve diferença significativa no número de nódulos por planta entre as concentrações 10^{-5} e 10^{-7} . Nos tratamentos com o isolado L30 houve diferença significativa no peso seco das partes aéreas em uma das três concentrações testadas e nos tratamentos com o isolado RS11 entre duas das três concentrações testadas. Na comparação entre os diferentes isolados não houve diferença significativa no número de nódulos por planta, e nos tratamentos com E15 e L5 não houve nodulação. O peso seco das raízes não apresentou diferença significativa, e os valores de peso seco das partes aéreas apontaram que os tratamentos M3 e VC28 apresentaram valores significativamente maiores que de todos os controles utilizados. Analisando-se os dados foi possível concluir que o número de células de rizóbios inoculadas no substrato não interfere na nodulação de raízes. Os isolados M3 e VC28 apresentaram-se como potenciais na fixação biológica de nitrogênio na cultura de feijão-comum.

PALAVRAS-CHAVE: Estirpes. Feijão. Nodulação. Rizóbios. Vale do Taquari.

LISTA DE FIGURAS

	Pág
FIGURA 1: Número de nódulos nas raízes de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculados com três diferentes concentrações de células de isolados bacterianos (10^0 , 10^{-5} e 10^{-7}). Os valores são a média de pelo menos três amostras \pm erro padrão. Valores de média acompanhados de diferentes letras são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas referem-se às três concentrações de células de um mesmo isolado.....	19
FIGURA 2: Peso seco (g) de partes aéreas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculados com três diferentes concentrações de células de isolados bacterianos (10^0 , 10^{-5} e 10^{-7}). Os valores são a média de pelo menos três amostras \pm erro padrão. Valores de média acompanhados de diferentes letras são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas referem-se às três concentrações de células de um mesmo isolado.....	20
FIGURA 3: Peso seco (g) de raízes de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculados com três diferentes concentrações de células de isolados bacterianos (10^0 , 10^{-5} e 10^{-7}). Os valores são a média de pelo menos três amostras \pm erro padrão. Valores de média acompanhados de diferentes letras são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas referem-se às três concentrações de células de um mesmo isolado.....	20

LISTA DE TABELAS

	Pág
TABELA 1: Número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) da cultura de diferentes isolados cultivados em tubos contendo 10 mL de meio de cultura líquido Levedura-Manitol após incubação por 72h a 25° C ± 2° C (10 ⁰), e nas diluições 10 ⁻⁵ e 10 ⁻⁷	21
TABELA 2: Número de nódulos nas raízes, peso seco de partes aéreas e peso seco de raízes de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculados com diferentes isolados bacterianos, sem diluição (10 ⁰). Os valores são a média de pelo menos três amostras ± erro padrão. Valores de média acompanhados de diferentes letras são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p≤0,05).....	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 Temas	5
3 Problemas	5
4 Justificativa	5
5 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
5.1 Fixação biológica de nitrogênio.....	7
5.2 Tecnologia de inoculantes agrícolas.....	9
6 OBJETIVOS	10
6.1 Objetivos gerais.....	10
6,2 Objetivos específicos.....	10
7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	11
7.1 Cultivo dos isolados.....	11
7.2 Cultivo dos feijoeiros com diferentes tratamentos.....	12
7.3 Contagem dos nódulos e pesagem da parte aérea e das raízes.....	14
7.4 Análise dos resultados.....	14
8 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	15
9 CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

A popularização da tecnologia da adubação química melhorou a produção agrícola, mas por ser dependente de combustíveis fósseis, esta prática também tornou instável o custo da agricultura (GLIESSMAN, 2006) e contribuiu para a contaminação dos recursos hídricos, já que uma parcela dos fertilizantes se perde carregado pela água da chuva (ALCARDE; GUIDOLIN; LOPES, 1998), podendo causar um aumento na proliferação de algas (CONWAY, 2003; GLIESSMAN, 2006). Uma maior diversidade de tecnologias para a produção agrícola é necessária visto que existem particularidades que podem impedir uma padronização das técnicas de produção (FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003). Características pontuais como o tipo de produto cultivado, variedade, clima, solo, recursos financeiros, mercado e área disponível para cultivo, exigem uma diversificação das técnicas de cultivos (ALTIERI, 1995), não sendo cabível a padronização proposta pelos pacotes agrícolas apresentados a partir da década de 1970 (CONWAY, 2003).

Uma das tecnologias que pode contribuir para o melhor aproveitamento do nitrogênio pelas plantas é a inoculação de rizóbios (DWIVEDI; SINGH, 2004). Estes micro-organismos que interagem com plantas leguminosas, fixando nitrogênio atmosférico e disponibilizando este nutriente para as plantas (CARDOSO; GALLI, 1975). A microbiota do solo varia de um local para o outro, e boa parte das espécies e variedades ainda não foi testada, nem mesmo descrita, podendo apresentar grande potencial biotecnológico (BORÉM; SANTOS, 2004; RODRIGUES, 2013).

A produção e utilização de inoculantes voltados à fixação biológica do nitrogênio atualmente também segue certa padronização (BRASIL, 2011), já que ainda existem poucas estirpes comerciais que muitas vezes não são adequadas a peculiaridades regionais (FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003). Por esta razão são necessários mais estudos para o desenvolvimento de inoculantes adequados a cada local. A proposta deste trabalho foi avaliar a relação entre a quantidade de células de rizóbios inoculadas em plântulas de feijoeiros e o número de nódulos formados nas raízes, e se o número de nódulos e acúmulo de biomassa na parte aérea e raízes são afetados pelos diferentes isolados testados.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fixação biológica do nitrogênio e infecção da planta

A atmosfera terrestre compõe-se de aproximadamente 79% de gás nitrogênio (N_2), que por ser uma molécula muito estável, não está disponível à maioria dos organismos, como as plantas. Além disso, motivados por fatores climáticos, geológicos e biológicos, os solos tropicais são tipicamente pobres em nitrogênio (CARDOSO; GALLI, 1975). O ciclo natural do nitrogênio na Terra tem a totalidade, ou ao menos a maioria das transformações, como fixação de gás nitrogênio, liberação em forma combinada, oxidação de amônia em nitrato, redução de nitrato a nitrito, síntese de compostos amoniacaais e nitratos, que podem ser aproveitados por plantas ou transformados novamente em nitrogênio livre, dependentes da ação de micro-organismos (LIMA, 1975; CARDOSO; GALLI, 1975). Porém, segundo Boyer (1985), uma pequena parcela do aporte de nitrogênio da atmosfera no solo também pode se dar através da chuva, na forma de amônia (NH_3).

Cardoso e Galli (1975) citam dois tipos de fixação biológica de nitrogênio (FBN): a fixação simbiótica, em que o micro-organismo depende de subprodutos da planta; e a fixação assimbiótica, em que o micro-organismo tem vida livre. Na FBN por micro-organismos de vida livre, o mecanismo de absorção do nitrogênio pela planta ainda não está bem elucidado, não se tendo a certeza se o nitrogênio aproveitado pelas plantas é o excesso do metabolismo dos micro-organismos depositado no solo ou se é apenas o resíduo restante após a sua morte e mineralização (BALDANI et al., 2002).

Segundo Patrício (1984) a FBN pelas leguminosas se dá pela interação entre

o micro-organismo fixador e a planta formando nódulos na raiz, e este processo está estreitamente ligado à fertilidade do solo. Para Yuan et al. (2011), a produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas, como o ácido indol acético (AIA), está estreitamente ligada à técnica de fertilização utilizada, e a utilização de adubação química reduz a quantidade de AIA em comparação com a adubação orgânica ou com a adubação de liberação controlada.

Algumas estirpes com potencial fixador já reconhecido atualmente não são cultivadas, apontando a necessidade de investimentos em pesquisa nessa área (BALDANI et al. 2002),. Um exemplo é o trabalho de Rodrigues (2011), que avaliou a diversidade de micro-organismos do solo da Mata Atlântica através de ferramentas metagenômicas, que não atingiu a estabilização nas curvas de rarefação para espécies, e concluiu também que muitos genes de solos de diversos biomas brasileiros apresentam alto potencial biotecnológico. Outros pontos importantes como a seleção de genótipos mais promissores, interação com plantas e microflora nativa, ainda necessitam de estudos mais aprofundados (BALDANI et al., 2002).

De acordo com Cardoso e Galli (1975) a nodulação nas leguminosas ocorre predominantemente após a infecção dos pêlos absorventes das raízes que têm sua extremidade encurvada infectada pela bactéria. Esse enrolamento é atribuído a hormônios vegetais, como o AIA, sintetizados pelos micro-organismos, ainda no solo, a partir da oxidação do triptofano liberado pela planta. Acredita-se que enzimas auxiliam no rompimento das fibras vegetais, facilitando a infecção e formando finalmente os nódulos.

A ecologia dos rizóbios é complexa, e a infecção da planta pode depender de simbiose com outros micro-organismos (CARDOSO; GALLI, 1975) ou ainda ser afetada negativamente por outros grupos presentes no solo (CARDOSO; GALLI, 1975; FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003). Esta é uma das razões pelas quais estirpes de rizóbios indicadas para uma região não necessariamente se adaptarem a outras (FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003).

2.2 Tecnologia de inoculantes agrícolas

Uma forma de aumentar o aproveitamento dos fertilizantes, e assim melhorar

o custo-benefício da adubação é o enriquecimento da flora de micro-organismos fixadores de nitrogênio do solo (PELEGRIN, 2009). Essa prática tem a vantagem adicional de reduzir a eutrofização de recursos hídricos localizados próximos às lavouras, uma vez que a perda de adubo por lixiviação será reduzida. Esse aumento na retenção de nitrogênio nas plantas permite uma redução na distribuição de adubos mantendo a mesma produtividade, tendo em vista que a transformação dos nitrogenados em gás nitrogênio será reduzida.

Segundo Fernandes, Fernandes e Hungria (2003), estirpes de rizóbios alóctones, indicadas para uma região podem não se adaptar às condições de solo, clima e população de rizóbios nativos, porém diversos levantamentos em vários biomas têm demonstrado que micro-organismos autóctones possuem potencial para fixação do nitrogênio e/ou outras aplicações biotecnológicas úteis às plantas, como solubilização de minerais, produção de antibióticos, (ALCÁNTARA, 2010; CARDOSO; HUNGRIA; ANDRADE, 2012; SOARES et al., 2006; MARRA et al., 2012).

A indicação das estirpes recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil é o resultado de uma reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE), e o controle da qualidade é regulado pela Instrução Normativa nº 13 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e prevê uma validade de seis meses e também um número mínimo de 10^9 UFC/g ou mL de inoculante até o prazo final da validade (BRASIL, 2011) de modo que o número de UFC/semente fique em torno de $6,0 \times 10^6$ (FERNANDES JÚNIOR, 2006). Herridge, Gemell e Hartley (2002) criticam a ausência de controle sobre a produção de inoculantes em alguns países e apontam que países como a França, Canadá e Austrália possuem programas de regulação semelhantes, porém no Canadá o número de UFC/mL ou g varia entre 10^3 e 10^5 , dependendo do tamanho da semente para o qual o inoculante é recomendado, e explicam que a qualidade do inoculante está relacionada ao número de UFC/mL ou g presente no produto.

3 TEMAS

Relação entre o número de nódulos em raízes de feijoeiro, peso seco das plantas e a concentração de células de rizóbio inoculado no substrato;

Comparação do efeito da inoculação de diferentes isolados de rizóbios sobre a nodulação em raízes de feijoeiros e sobre o peso seco das plantas.

4 PROBLEMAS

A importância da exigência de um número mínimo de células na produção de inoculantes agrícolas é questionada, e há controvérsias sobre o efeito do número de células sobre a nodulação em raízes e sobre a produção de feijoeiros.

Rizóbios autóctones podem ser mais eficientes que as estirpes recomendadas para a produção de inoculantes.

5 JUSTIFICATIVA

A utilização da tecnologia da inoculação de bactérias simbiotes fixadoras de nitrogênio pode aumentar a produção agrícola com redução de custos da produção agrícola, e ainda reduzir os impactos ambientais. O potencial de fertilização dos adubos poderá ser aumentado se os mesmos forem melhores assimilados pelas plantas, o que ocorre na simbiose entre plantas e rizóbios, reduzindo o gasto com fertilizantes e sendo uma alternativa prevista na produção orgânica. Variedades comerciais de rizóbios já são bastante utilizadas em algumas culturas, porém a sua eficácia depende de diversos fatores que podem variar de acordo com o local. Por esse motivo são importantes estudos que levem em conta a região onde essas culturas são plantadas.

É importante o estudo da interação entre rizóbios e plantas para o aumento da produção de alimentos, redução o impacto ambiental e aumento da rentabilidade

aos produtores, bem como a buscar mais dados da influência de rizóbios sobre indicadores da fixação de nitrogênio. Por isso o presente trabalho visou testar cepas de rizóbios isoladas de solos da região do Vale do Taquari no aumento da nodulação das raízes e biomassa das partes aéreas e raízes de feijoeiros de variedade atualmente cultivada na região.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivos gerais

- Buscar relação entre a quantidade de células inoculadas nas plântulas, o número de nódulos em raízes de feijoeiro, a produção de massa seca da parte aérea e das raízes.
- Identificar os efeitos de diferentes isolados sobre a nodulação, produção de massa seca da parte aérea e das raízes de feijoeiros.

6.2 Objetivos específicos

- Reproduzir estirpes de rizóbios;
- Cultivar feijoeiros em substrato esterilizado contendo diferentes concentrações de rizóbios inoculados;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de células de rizóbio inoculadas em substrato sobre a nodulação das raízes, peso seco das partes aéreas e das raízes de feijoeiros;
- Avaliar o desempenho de diferentes isolados de rizóbios sobre a nodulação das raízes, peso seco das partes aéreas e das raízes de feijoeiros.

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O experimento, com finalidade explicativa e abordagem quantitativa foi realizado no Centro Universitário UNIVATES e foi constituído de duas etapas descritas a seguir:

7.1 Cultivo dos isolados

Os isolados de rizóbios E15, L5, L15, L17, L30, M3, RS10, RS11, VC3 e VC28, oriundos do Vale do Taquari, e já testados quanto à germinação em feijoeiros, solubilização de fosfatos, produção de compostos indólicos e sideróforos (BASSANI; GRANADA; SPEROTTO; 2012) além da estirpe de *Rhizobium tropici* Semia4077, recomendada para o cultivo de feijão no Rio Grande do Sul (BALLARDIN et al., 2000; BRASIL, 2011), foram cultivados em tubos contendo 10 mL de meio de cultura líquido Levedura-Manitol (CLM) (VICENT, 1970) por 72h a $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$. Esse cultivo foi utilizado para a contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e também para inoculação em substrato contendo plântulas de feijão utilizando diferentes concentrações. Para contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) foram realizadas até oito diluições decimais com diluente água-peptona 0,1% partindo da concentração 10^0 e espalhamento de 100 μL das diluições 10^{-5} até 10^{-8} em superfície de placas de Petri de 90 mm contendo meio

sólido Levedura-Manitol (ALM), com posterior incubação por 72h a 25° C ± 2° C. Após a incubação as colônias foram contadas e duas placas de cada cultura contendo entre 30 e 300 UFC foram selecionadas para o cálculo do resultado, utilizando-se a fórmula:

$$N = \sum C / (n_1 + 0,1n_2) \times d$$

Onde:

N= média ponderada de UFC/ml na concentração 10⁰;

$\sum C$ = somatório das UFC nas duas diluições selecionadas;

n₁= número de placas na primeira diluição;

n₂= número de placas na segunda diluição;

d= fator de diluição correspondente à menor diluição selecionada

Os resultados das contagens são apresentados na Tabela 1.

7.2 Cultivo dos feijoeiros com diferentes tratamentos

Sementes de feijão (*P. vulgaris*) grupo preto, cultivar IPR-Tuiuiu foram superficialmente desinfetadas deixando-as em imersão em solução de água purificada por osmose reversa e 0,1% polissorbato 80 por 20 minutos, enxaguando-as em água de abastecimento corrente por 10 minutos, colocando-as de molho em solução de água sanitária comercial 30% a base de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) adicionado de 0,5% de fungicida Captana (N-(trichloromethylthio)cyclohex-4ene-1,2-dicarboximide 500g/kg) por 30 minutos, e em álcool 70% por 30 segundos e enxaguando-as cinco vezes em água estéril.

Imediatamente após o processo de desinfecção, as sementes foram distribuídas em placas de Petri estéreis contendo papel filtro e água, e colocadas para germinar em câmara de germinação a 25° C ± 2° C, com fotoperíodo de 16 horas durante quatro dias e com reposição de água estéril quando necessário.

Após quatro dias as plântulas foram transplantadas para os vasos de Leonard

modificados (SANTOS et al., 2009), contendo na parte superior 1 L de substrato composto de areia fina lavada e vermiculita expandida fina na proporção 3:1, e solução nutritiva Sarruge (25% diluída) na base do vaso.

Os tratamentos utilizados foram os isolados E15, L5, L15, L17, L30, M3, RS10, RS11, VC3 e VC28, nas concentrações 10^0 (sem diluição), 10^{-5} e 10^{-7} , diluídas com o CLM, adicionadas na forma líquida (1 mL) em plântulas de *P. vulgaris* já inseridas nos vasos. Três controles foram testados: um controle negativo (plantas em substrato estéril); um controle positivo para presença de nitrogênio (plantas em substrato estéril com solução nutritiva para plantas completa (0,08 mg/L de NH_4NO_3) a 25% (concentração final 0,02 mg/L NH_4NO_3); e um controle positivo composto por plântulas em substrato contendo 1mL da estirpe SEMIA 4077, na diluição 10^0 . As soluções nutritivas foram repostas uma dose de 500 mL a cada 5 dias, totalizando 100 mg por tratamento ao término do experimento. Para garantir que o mínimo de $6,0 \times 10^5$ UFC fosse fornecida por semente (FERNANDES JÚNIOR, 2006). Todos os tratamentos e os controles foram testados em cinco repetições concomitantes para uma maior garantia de viabilidade do teste.

7.3 Contagem dos nódulos e pesagem da parte aérea e das raízes

As partes aéreas de cada planta foram separadas das raízes com um corte ao nível do substrato, acondicionadas em sacos de papel e secos em estufa com ventilação forçada e temperatura entre 65°C e 70°C , até a estabilização do peso seco em balança analítica. As raízes foram cuidadosamente lavadas a fim de eliminar a areia e a vermiculita sem perder os nódulos. As raízes foram acondicionadas em sacos plásticos para o transporte e posterior contagem dos nódulos, seguido de acondicionamento em sacos de papel para secagem em estufa com ventilação forçada a 65°C e 70°C para a obtenção do peso seco em balança analítica.

7.4 Análise dos resultados

Os dados foram analisados utilizando-se One-Way ANOVA, e as médias foram comparadas através do Teste de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando-se o software IBM SPSS Statistics 21 (SPSS Inc., USA). O Teste de Levene (para testar a homogeneidade da variância) foi realizado antes da ANOVA.

Os valores dos testes de cada isolado foram comparados entre as diferentes concentrações (10^0 , 10^5 e 10^7) para avaliação da influência do número de células sobre as diferentes variáveis. Os dados das três variáveis de todos os tratamentos nas diluições 10^0 foram comparados para avaliar o desempenho de cada isolado.

8 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados obtidos indicam que no teste com diferentes concentrações de células microbianas adicionadas ao substrato (Figura1), apenas os tratamentos contendo o isolado RS11 apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$), no número de nódulos por planta entre as diluições 10^{-5} e 10^{-7} , sendo que na diluição 10^{-5} a média no número de nódulos foi aproximadamente o dobro da diluição 10^{-7} . Nos demais tratamentos a diferença não foi significativa. Segundo Cardoso e Galli (1975), um número muito baixo de células é ainda capaz de causar uma grande nodulação, pois a infecção da raiz por rizóbios pode ocorrer por apenas um ponto de infecção, chegando até o xilema, espalhando-se e permitindo a produção de nódulos em outras regiões das raízes. Isso explica o motivo de ocorrer uma nodulação estatisticamente igual entre as plantas inoculadas com $2,5 \times 10^0$ ou com $2,5 \times 10^7$, como foi o caso do tratamento com as concentrações 10^{-7} e 10^0 do tratamento VC28 (Tabela 1).

Neste mesmo isolado (RS11) foram encontradas diferenças semelhantes com o peso seco da parte aérea (Figura 2). Nos tratamentos com o isolado L30 também houve diferença significativa no peso da parte aérea, porém com a concentração de células 10^0 o valor foi menor que nas diluições 10^{-5} e 10^{-7} .

Em relação à massa seca das raízes, houve diferença apenas nos tratamentos com o isolado M3 e VC28. De forma geral os isolados apresentaram o mesmo número de nódulos e peso seco de parte aérea e raiz, independente do

número de células inoculadas, não sendo possível relacionar, na grande maioria dos casos, o número de células com as três características analisadas. Esses dados se contrapõem aos apresentados por Hiltbold, Thurlow e Skipper (1980), que não obtiveram nodulações em concentrações de células menores que 10^3 UFC/semente.

No trabalho apresentado aqui, obteve-se nodulação inclusive no tratamento com o isolado VC28 diluição 10^{-7} (Figura 1) inoculado com $2,5 \times 10^0$ UFC/semente (Tabela 1), o menor número de células entre todos os tratamentos. Lembrando que o experimento citado foi realizado à campo e testando a nodulação em soja (*Glycine max* L.) uma possível explicação seria que outras variáveis, como por exemplo, competição com outros micro-organismos, ou mesmo nutrientes do solo, poderiam estar agindo sobre o experimento, ou ainda, que o desempenho de uma espécie em relação aos simbioses seja diferente do de outra espécie.

Silva et al. (2012), observaram, em feijão *cowpea* (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), aumento da nodulação e aumento na FBN à medida que a taxa de inoculante foi aumentada. Os mesmos autores relataram um aumento na nodulação e FBN quando a taxa de inoculante foi superior ao número de células de rizóbios nativos, o que mostra uma possibilidade de contornar a competição através da inoculação de um número maior de células inoculadas.

Araújo et al. (2007) testaram a quantidade de células por semente recomendada e o dobro da quantidade recomendada a partir de um inoculante contendo as estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA4077 e SEMIA4080 sobre o número de nódulos, peso dos nódulos, peso seco da parte aérea, N fixado no estádio R6, comprimento da vagem, número de grão por vagem, número de vagens por planta, produtividade (Kg/Ha) e N fixado no grão (Kg/Ha) em plantas de feijão-comum. Nenhum dos parâmetros apresentou diferença significativa entre os dois tratamentos testados.

Thies, Singleton e Bohlool (1991) expõem que o número de rizóbios nativos é inversamente proporcional ao sucesso da simbiose entre as plantas e o inoculante. Portanto não é possível concluir que um grande número de células inoculadas seja desnecessário, já que as condições naturais são diferentes das condições na casa de vegetação. Logo, conclui-se que não é o número de células adicionadas à semente que determina diretamente a eficiência simbiótica, mas outros fatores,

como por exemplo, a compatibilidade com o hospedeiro e a competição com a flora nativa, e que um maior número de células adicionadas às sementes pode gerar uma vantagem competitiva perante os microrganismos nativos.

Quando os tratamentos contendo diferentes isolados e controles foram comparados, na concentração 10^0 (sem diluição), aqueles que continham os isolados E15 e L5 não apresentaram nodulação (Tabela 2). Nos demais, a diferença no número de nódulos por planta não apresentou diferença significativa, com valores brutos entre 35 e 203 nódulos.

Os valores de peso seco das partes aéreas apontaram que os tratamentos inoculados com os isolados M3, e VC28, apresentaram valores significativamente maiores que todos os controles utilizados (Tabela 2). O tratamento com o isolado L15 também obteve resultado superior ao tratamento controle nitrogenado. Na avaliação do peso seco das raízes não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos.

Cardoso, Hungria e Andrade (2012), testando a fixação de nitrogênio em feijoeiros por diferentes isolados, encontraram resultados para a quantidade de N nas plantas infectadas estatisticamente semelhantes aos níveis de N nas plantas com tratamento nitrogenado, mas o peso seco das plantas inoculadas se manteve sempre abaixo do peso das plantas do tratamento nitrogenado. Gonçalves, Manduca e Mercante (2008) também encontraram isolados promissores para a produção de inoculantes para feijoeiros, superando a estirpe recomendada SEMIA4077 na nodulação, peso seco da parte aérea e taxa de nitrogênio fixada na parte aérea, com características desejáveis, como tolerância a altas temperaturas.

Outros trabalhos apontam para a possibilidade de agregar outras qualidades como promover a germinação e crescimento de não leguminosas (BASSANI; GRANADA; SPEROTTO; 2012; KOZUSNY-ANDREANI; ANDREANI JUNIOR; COELHO, 2012), possibilitando um melhor resultado na rotação de culturas e adubação verde com fabáceas.

Os isolados M3 e VC28 possuem um potencial para a promoção de crescimento de feijões, assemelhando-se ou até mesmo superando as estirpes recomendadas, e adubos químicos.

Figura 1: Número de nódulos nas raízes de *Phaseolus vulgaris* inoculados com três diferentes concentrações de células de isolados bacterianos (10^0 , 10^{-5} e 10^{-7}). Os valores são a média de pelo menos três amostras \pm erro padrão. Valores de média acompanhados de diferentes letras são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas referem-se às três concentrações de células de um mesmo isolado.

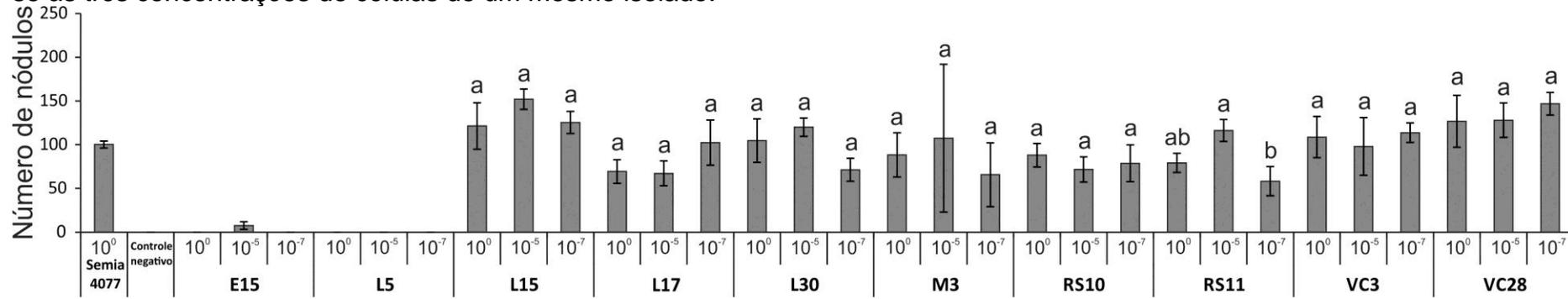


Figura 2: Peso seco (g) de partes aéreas de *Phaseolus vulgaris* inoculados com três diferentes concentrações de células de isolados bacterianos (10^0 , 10^{-5} e 10^{-7}). Os valores são a média de pelo menos três amostras \pm erro padrão. Valores de média acompanhados de diferentes letras são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas referem-se às três concentrações de células de um mesmo isolado.

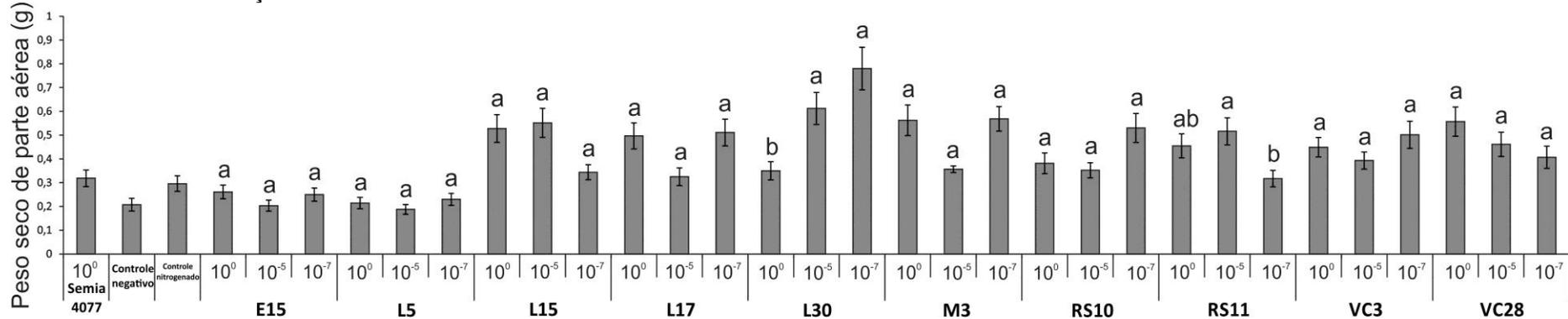


Figura 3: Peso seco (g) de raízes de *Phaseolus vulgaris* inoculados com três diferentes concentrações de células de isolados bacterianos (10^0 , 10^{-5} e 10^{-7}). Os valores são a média de pelo menos três amostras \pm erro padrão. Valores de média acompanhados de diferentes letras são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas referem-se às três concentrações de células de um mesmo isolado.

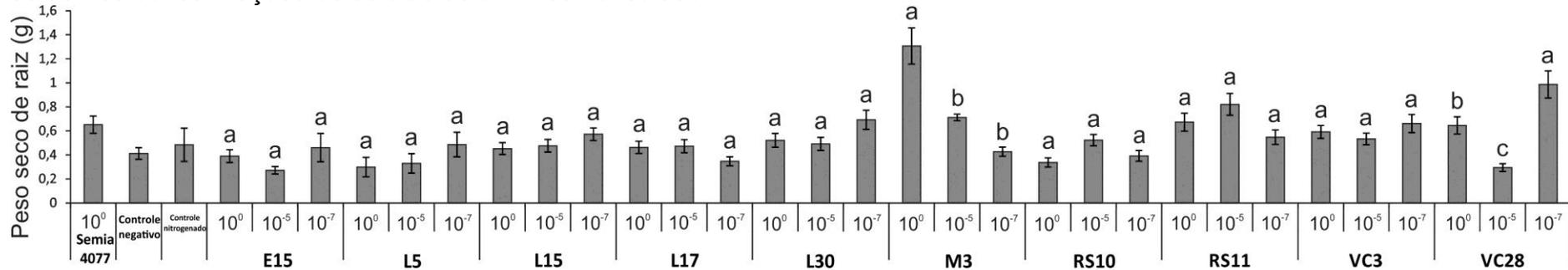


Tabela 1: Número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) da cultura de diferentes isolados cultivados em tubos contendo 10 mL de meio de cultura líquido Levedura-Manitol após incubação por 72h a 25° C ± 2° C (10°), e nas diluições 10⁻⁵ e 10⁻⁷.

	Semia 4077	E15	L5	L15	L17	L30	M3	RS10	RS11	VC3	VC28
UFC/mL (10 ⁰)	3,0 X 10 ⁷	9,7 X 10 ⁸	1,1 X 10 ⁹	1,3 X 10 ⁸	1,9 X 10 ⁸	5,7 X 10 ⁸	3,8 X 10 ⁸	1,1 X 10 ⁸	3,0 X 10 ⁷	1,5 X 10 ⁸	2,5 X 10 ⁷
UFC/mL (10 ⁻⁵)	3,0 X 10 ²	9,7 X 10 ³	1,1 X 10 ⁴	1,3 X 10 ³	1,9 X 10 ³	5,7 X 10 ³	3,8 X 10 ³	1,1 X 10 ³	3,0 X 10 ²	1,5 X 10 ³	2,5 X 10 ²
UFC/mL (10 ⁻⁷)	3,0 X 10 ⁰	9,7 X 10 ¹	1,1 X 10 ²	1,3 X 10 ¹	1,9 X 10 ¹	5,7 X 10 ¹	3,8 X 10 ¹	1,1 X 10 ¹	3,0 X 10 ⁰	1,5 X 10 ¹	2,5 X 10 ⁰

Tabela 2: Número de nódulos nas raízes, peso seco de partes aéreas e peso seco de raízes de *Phaseolus vulgaris* inoculados com diferentes isolados bacterianos, sem diluição (10⁰). Os valores são a média de pelo menos três amostras ± erro padrão. Valores de média acompanhados de diferentes letras são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p≤0,05).

	Semia 4077	Controle negativo	Controle nitrogenado	E15	L5	L15	L17	L30	M3	RS10	RS11	VC3	VC28
Número de nódulos	100,20 ± 3,96 a	SN	SN	SN	SN	121,40 ± 26,59 a	69,40 ± 13,46 a	104,60 ± 24,91 a	88,25 ± 25,31 a	88,00 ± 13,46 a	79,20 ± 10,95 a	108,67 ± 23,68 a	126,80 ± 29,66 a
Peso seco da parte aérea (g)	0,32 ± 0,04 bcde	0,21 ± 0,03 e	0,30 ± 0,03 cde	0,26 ± 0,03 de	0,21 ± 0,02 e	0,53 ± 0,06 ab	0,50 ± 0,06 abc	0,35 ± 0,04 abcde	0,56 ± 0,07 a	0,38 ± 0,04 abcde	0,46 ± 0,05 abcd	0,45 ± 0,04 abcd	0,56 ± 0,06 a
Peso seco da raiz (g)	0,65 ± 0,07 a	0,41 ± 0,05 a	0,49 ± 0,19 a	0,39 ± 0,05 a	0,30 ± 0,08 a	0,45 ± 0,05 a	0,46 ± 0,05 a	0,52 ± 0,06 a	1,31 ± 0,15 a	0,34 ± 0,04 a	0,67 ± 0,07 a	0,59 ± 0,05 a	0,65 ± 0,07 a

9 CONCLUSÕES

Analisando o conjunto de dados das diluições utilizadas foi possível concluir que o número de células de rizóbios inoculadas no substrato não interfere na nodulação.

Os experimentos de comparação entre os diferentes isolados mostraram que, com exceção dos isolados E15 e L5, que não nodularam na concentração 10^0 , a capacidade de nodulação dos oito demais isolados testados foi semelhante à estirpe de *Rhizobium tropici* Semia4077, recomendada para o cultivo de *P. vulgaris* no Rio Grande do Sul (BALLARDIN et al., 2000; BRASIL, 2011).

Os isolados M3 e VC 28 superaram todos os controles utilizados na promoção do crescimento, medida através do peso seco da parte aérea, e uma superou o controle nitrogenado, mostrando-se semelhante à estirpe recomendada para o cultivo, apontando os mesmos como potenciais para a produção de inoculantes.

REFERÊNCIAS

ALCÁNTARA, C.A.D. **Aislamiento, caracterización y selección de *rhizobia* autóctonos que nudulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.) em La República Dominicana**. 2010. 113 p. Tese (Engenharia e Ciências Agrárias). León: Universidad de León, 2010. Disponível em: <<https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1585/Antonio.pdf?sequence=1>>. Acesso em 10 de novembro de 2013.

ALCARDE, J.C.; GUIDOLIN, J.A.; LOPES A.S.n. **Os adubos e a eficiência das adubações**. 3. ed. São Paulo: ANDA, 1998. 35 p.

ALTIERI, M.A. **Agroecology: the science of sustainable agriculture**. 2 ed. Cambridge: Westview, 1995. 433p.

ARAÚJO, F.F.; CARMONA, F.G.; TIRITAN, C.S. CRESTE, J.E. Fixação biológica de N₂ no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. **Acta Scientiae Agronomica**, Maringá, v. 29, n. 4, p. 535-540, 2007.

BALDANI, J. I.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; BALDANI, V.L.D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Org.) **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.p. 197-232.

BALARDIN, R.S.; COSTA, E.C.; RIBEIRO, N.D.; DUTRA, L.M.C.; COSTA, I.F.D. **Feijão: Recomendações técnicas para o cultivo de feijão no Rio Grande do Sul**. Santa Maria : Pallotti, 2000. 80 p.

BASSANI, V. L.; GRANADA, C. E.; SPEROTTO, R. A. **Isolamento de rizóbios a partir de raízes de feijão no sul do Brasil e seu efeito na germinação de rúcula e feijão**. Univates, 2012. Não publicado. Digitado.

BORÉM, A.; SANTOS, F. R. **Biotecnologia simplificada**. 2. ed. Viçosa:UFV, 2004.

BOYER J.L. **Dinâmica dos Elementos Químicos e Fertilidade dos Solos**. Salvador: UFBA:1985. 311 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº13 , de 24 de março de 2011. Brasília: MAPA, 2011.

CARDOSO, E. J. B. N.; GALLI, F. Fixação do Nitrogênio. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U.A. **Biotecnologia: Tópicos de microbiologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. p. 14-46.

CARDOSO, J.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 93, p. 2035-2049, 2012.

CONWAY, G. **Produção de alimentos no século XXI: biotecnologia e meio ambiente**. São Paulo: Estação Liberdade, 2003. 375 p.

DIWIVEDI, S.K.; SINGH, D.P. **Environmental microbiology and biotechnology**. Lucknow: New Age International, 2004. 239p.

FERNANDES JÚNIOR, .P.I. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosas**. 2006. 43 p. Dissertação (Mestrado em agronomia- ciência do solo) Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006. Disponível em:
<[http://www.ia.ufrj.br/cpacs/arquivos/teses_dissert/51_Dissertacao_Paulo_Ivan_\(ME2006\).pdf](http://www.ia.ufrj.br/cpacs/arquivos/teses_dissert/51_Dissertacao_Paulo_Ivan_(ME2006).pdf) . Acesso em 10 de novembro de 2013.

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**, Brasília, v. 38, n. 7, July 2003.

FERNÁNDEZ, F.; GEPTS, P.; LÓPEZ, M. **Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)** Cali: CIAT. 1986. 34p.

GLIESSMANN, S.R. **Agroecology: ecological processes in sustainable agriculture**. 2 ed. Santa Cruz: CRS, 2006.384p.

GONÇALVES, L.B.; MANDUCA, A.M.; MERCANTE, F.M. Seleção preliminar de estirpes de rizóbios para inoculação em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) In: 2º SEMINÁRIO DE AGROECOLOGIA DE MATO GROSSO DO SUL. 2008. Dourados. **A construção participativa da Agroecologia em Mato Grosso do Sul**.

HILTBOLD, A.E., THURLOW, D.L.; SKIPPER, H.D. Evaluation of commercial soybean inoculants by various techniques. **Agronomy Journal**, v.72, n. 4. 1980.p. 675–681.

KOZUSNY-ANDREANI, D.I.; ANDREANI JUNIOR, R.; COELHO, O.M. Efeito de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas no desenvolvimento de mudas de salsa. **Cultivando o saber**. Cascavel, v.5, n.4, 2012. p. 203-212.

LIMA, U. A. Microbiologia do Petróleo. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U.A. **Biotechnologia: Tópicos de microbiologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2. 1975.p. 151-168.

MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M.; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R.F.; LIMA, J.M.; MOREIRA F.M.S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant Soils**, mar. 2012.

PATRÍCIO, I. E. M. S. O Significado da Biotecnologia. In: ALMEIDA, A.L.O. (Coord.) **Biotechnologia e Agricultura: Perspectivas para o caso brasileiro**. Petrópolis: Vozes, 1984.p. 51-85.

PELEGRIN, R. et al. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 1, fev. 2009.

RODRIGUES, T.B. **Diversidade metagenômica microbiana de biomas terrestres e marinhos**. 2011. 250 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, ago. 2011. Disponível em: <<http://pct.capes.gov.br/teses/2011/31001017016P1/TES.PDF>>. Acesso em 10 de novembro de 2013.

SANTOS, C.E.R.S.; BEZERRA, R.V.; FREITAS A.D.S.; SEIDO, S.L.; MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Modificação de vasos de Leonard com garrafas descartáveis tipo Pet. **Comunicado Técnico 124**, 1. ed. Seropédica: Embrapa, 2009.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**. Piracicaba, v.1, n.3, p. 231-234, 1975.

SILVA, M.F.; SANTOS, C.E.R.S.; SOUSA, C.A.; ARAÚJO, R.S.L.; STAMFORD, N.P.; FIGUEIREDO, M.V.B. Nodulação e eficiência da fixação do N₂ em feijão-caupi por efeito da taxa de inoculo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa. v. 36, n. 5, p. 1418-1425, 2012.

SOARES, A.L.L.; FERREIRA, P.A.A.; PEREIRA, J.P.A.R.; DO VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG). II – feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa. v. 30, n. 5, p. 803-811, 2006.

THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Influence of the Size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes. **Applied and environmental microbiology**, jan. Washington. v. 57, p. 19-28, 1991.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p.

YUAN, C. L.; MOU, C.; WU, W.; GUO, Y. Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. **Journal of Soil and Sediments**. v.11, n.2, fev. 2011.