



FERTBIO 2012

A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola
17 a 21 de Setembro - Centro de Convenções - Maceió/Alagoas

Caracterização fenotípica e eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular feijão-caupi

Cátia Aparecida Mosqueiro⁽¹⁾; Krisle da Silva⁽²⁾; Jéri Edson Zilli⁽³⁾

⁽¹⁾ Aluna do curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima (UFRR), Centro de Ciências Agrárias, Campus Caumé, BR 174, Km 12 - Monte Cristo, CEP 69301-970, Boa Vista-RR, catia.ap.mosqueira@gmail.com; ⁽²⁾ Pesquisadora, Microbiologia do Solo; Embrapa Roraima, Rodovia BR-174, Km 8, Distrito Industrial, CEP 69301-970, Boa Vista-RR, krisle.silva@embrapa.br; ⁽³⁾ Pesquisador em Microbiologia do Solo; Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR-465 Km 7 (antiga Rodovia Rio/São Paulo) caixa Postal 74505, CEP 23890-000, Seropédica-RJ, zilli@cnpab.embrapa.br.

RESUMO – O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) é uma cultura importante para o Estado de Roraima, sendo o tipo de feijão predominante cultivado e que pode se beneficiar da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. Desta forma, objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente e avaliar a eficiência no processo de fixação biológica de nitrogênio de estirpes nativas do Estado de Roraima capazes de nodular o feijão-caupi. As bactérias foram isoladas de solos coletados em áreas de mata dos municípios do Cantá, Caracará e Mucajaí e áreas de cerrado dos municípios de Alto Alegre, Boa Vista e Normandia, totalizando 43 bactérias. As bactérias foram caracterizadas quanto à morfo-fisiologia das colônias em meio de cultivo YMA contendo azul de bromotimol. Para avaliação da eficiência simbiótica, foi realizado um experimento em vasos de Leonard com substrato estéril, em delineamento inteiramente casualizado em casa de vegetação, com três repetições. Os tratamentos foram as 43 bactérias, duas estirpes recomendadas para o feijão-caupi a BR 3262 e BR 3267 (*Bradyrhizobium* sp.). Também foram incluídos dois controles, um sem inoculação e outro sem inoculação e com adição de 210 mg de N l⁻¹. Após 30 dias foram avaliados número e massa seca de nódulos e massa seca da parte aérea. As 43 bactérias apresentaram elevada diversidade morfofisiológica. Quanto à eficiência simbiótica, 20 bactérias foram eficientes quando comparadas ao tratamento controle, nitrogenado e estirpes recomendadas para a cultura. Estes resultados demonstram que as bactérias nativas de Roraima são promissoras para a fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi.

Palavras-chave: Fixação Biológica de Nitrogênio. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Rizóbios. Amazônia.

INTRODUÇÃO - O feijão-caupi, feijão-de-corda, feijão-de-praia ou feijão-de-rama (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) constitui-se em uma importante alternativa de fonte de renda e alimento básico para populações, sobretudo para

as de áreas rurais e de baixa renda das regiões Nordeste e Norte do Brasil (Zilli et al., 2009).

Em Roraima a produtividade média de feijão-caupi é de 670 kg ha⁻¹ (CONAB, 2012) sendo maior parte da produção comercializada na cidade de Boa Vista, onde pode ser encontrado tanto na forma de grão seco como de vagem verde.

Historicamente o cultivo do feijão-caupi tem sido feito em solos pobres em matéria orgânica e conseqüentemente, nitrogênio, uma vez que os solos prevalentes desta área, principalmente de cerrado tem apresentado baixa fertilidade natural, o que indica a necessidade do uso de práticas que permita aumentos na produtividade, de maneira ecológica e economicamente sustentável. Dentre as tecnologias para elevar a produtividade do feijão-caupi, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) têm demonstrado grande potencial no aumento do rendimento de grãos. Além disso, este processo pode ser uma alternativa para a substituição, total ou parcial, dos adubos nitrogenados, com isso minimizando o custo da produção e contribuindo para o aumento na fertilidade do solo (Soares et al., 2006).

Assim, neste trabalho objetivou-se caracterizar fenotipicamente e avaliar a eficiência no processo de FBN de bactérias nativas do Estado de Roraima capazes de nodular o feijão-caupi.

MATERIAL E MÉTODOS - Quarenta e três bactérias foram isoladas do Estado de Roraima, utilizando o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). A origem, bem como a análise química do solo de onde cada isolado foi capturado é apresentada na Tabela 1.

Caracterização fenotípica

Para caracterização, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura sólido YMA (Vincent, 1970), contendo azul de bromotimol e incubadas por sete dias a 28°C. A caracterização foi iniciada a partir do aparecimento das primeiras colônias isoladas. As características avaliadas foram: crescimento em dias (aparecimento de colônias isoladas), alteração do pH do meio (neutro, ácido e

alcalino), diâmetro das colônias (mm), forma (puntiforme, circular ou irregular), elevação das colônias (plana, convexa, côncava, elevada e protuberante), borda (inteira ou irregular), superfície da colônia (lisa ou rugosa), produção de muco (escassa, pouco, moderada e abundante), transparência (opaca, transparente e translúcida), muco (homogêneo ou heterogêneo). Além das 43 bactérias isoladas do estado de Roraima, foram incluídas duas estirpes referências recomendadas para o feijão-caupi, sendo a BR 3262 (Zilli et al., 2008) e BR 3267 (Martins et al., 2003).

Eficiência simbiótica

Para avaliação da eficiência simbiótica foi conduzido experimento em casa de vegetação em vasos de Leonard (Vincent, 1970), contendo a solução nutritiva estéril de Hoagland & Arnon (1950) modificada, diluída quatro vezes sem nitrogênio. A cultivar de caupi utilizada foi à Guariba. As sementes empregadas foram desinfestadas superficialmente com álcool 92% e hipoclorito de sódio a 1% por 2 minutos. Lavadas 10 vezes com água destilada esterilizada. Foram semeadas quatro sementes por vasos, estas foram inoculadas com 1 ml de cultivo de cada bactéria crescidas em meio YM líquido (Vincent, 1970).. Decorridos três a cinco dias da germinação, foi feito o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Foram incluídos 4 controles: dois controles positivos com a inoculação da BR 3262 (Zilli et al., 2008) e BR 3267 (Martins et al., 2003); um controle sem inoculação e sem adição de N mineral, e outro sem inoculação com adição de N mineral (210 mg kg⁻¹ de N). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

As plantas foram colhidas aos 30 dias após a germinação, para determinação do número e massa seca de nódulos, além da massa seca da parte aérea. Os nódulos e parte aérea foram secos em estufa (65°C) até o peso seco constante. Os dados foram analisados estatisticamente usando programa Sisvar versão 4.3 (Ferreira, 2008) sendo realizados os testes de distribuição normal dos erros e a análise de variância. Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados de número de nódulos foram transformados para $\sqrt{(X+0,5)}$ e massa seca de nódulos em $\log(X + 0,5)$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO - Quanto à caracterização fenotípica, através da morfologia cultural das colônias, verificou-se que 56% das bactérias apresentaram crescimento lento, 25% rápido e 19% intermediário. Quanto à alteração do pH do meio, 49% apresentaram reação ácida; 49% neutra e 2% alcalina em meio YMA acrescido de azul de bromotimol. Bactérias de crescimento lento e reação neutra a alcalina são características típicas do gênero de *Bradyrhizobium* que nodula abundantemente com o feijão-caupi (Zilli et al., 2004; 2006). No entanto, bactérias com crescimento rápido também são capazes de induzir nódulos em caupi (Medeiros et al., 2009), pois esta planta é altamente promíscua. Baseada nas características morfológicas das bactérias e das estirpes-referência foi gerado um dendrograma onde foi possível verificar a formação de vinte e dois grupos com 80% de similaridade entre si

(Figura 1), demonstrando a elevada diversidade morfológica encontrada.

Quanto à eficiência simbiótica, das 43 bactérias, 36 foram capazes de nodular o feijão-caupi. Os resultados do número de nódulos, matéria seca de nódulos e parte aérea são apresentados na tabela 2. Vinte e uma bactérias apresentaram número de nódulos igual ao apresentado pelas plantas inoculadas com as estirpes recomendada para inoculação do caupi BR 3262 e BR 3267 (Tabela 2). Quanto à massa seca de nódulos, 23 bactérias que não diferiram das estirpes recomendadas, com destaque para as bactérias 3FC 3.1, 3 FC 3.2 e 4 FC 1.2. Ao avaliar o parâmetro massa seca da parte aérea, também foi possível observar que 20 bactérias mostraram-se superiores, quanto aos tratamentos sem inoculação e similares ao tratamento nitrogenado e inoculado com estirpes recomendadas para cultura.

Os resultados obtidos demonstram elevada diversidade morfológica cultural das bactérias e que pelos menos 20 destas possuíram bom desempenho quanto à eficiência simbiótica e, portanto, são potenciais inoculantes para feijão-caupi. No entanto, há necessidade da avaliação da contribuição destas bactérias para o desenvolvimento e produção de grãos de feijão-caupi em condições de campo.

CONCLUSÕES - As bactérias isoladas do Estado de Roraima capazes de nodular feijão-caupi, possuem uma elevada diversidade morfológica cultural.

Entre os isolados obtidos, há bactérias promissoras para a fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi.

REFERÊNCIAS

- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, Nono levantamento, junho 2012 / Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2012.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: a program for statistical analysis and teaching. **Rev. Symposium**, 6: 36-41, 2008.
- HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: 1950. California Agricultural Experiment Station, 32 p.
- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving yield in the Semi-Arid region of Brazil. **Biol. Fert. Soils**, 38: 333-339, 2003.
- MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V.R.; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Sci. Agron.**, 31: 529-535, 2009.
- SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA F. M. S.; Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). i – caupi(1). **Rev. Bras. Ci. Solo**, 30:795-802, 2006.

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

ZILLI, J. E.; MARSON, L.C.; MARSON, B.F.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. *Acta Amaz.*, 39: 749 - 758 2009.

ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Assessment of cowpea

rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 35:281-287. 2004.

ZILLI, J.É.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. **BR 3262: nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a inoculação de feijão-caupi em Roraima.** Boa Vista: Embrapa Roraima, 2008. 7p. (Embrapa Roraima. Comunicado técnico, 10).

Tabela 1- Origem, análise química do solo e número de isolados capazes de nodular feijão-caupi obtidos por área no Estado de Roraima.

Áreas	Fito-fisionomia	Coordenadas	Município	pH	Ca	Mg	K	Al	P	MO	n. de isolados
				H ₂ O	cmol _c dm ⁻³			mg dm ⁻³		%	
1		N 1° 2' 03,6" W 59° 53' 06,5"	Caracarái (Prop. particular)	4,5	1,1	0,42	0,22	0,73	4,14	31,6	3
2		N 2° 36' 07,1" W 60° 57' 01,0"	Mucajáí (Prop. particular)	4,5	0,47	0,32	0,19	0,43	2,9	27,2	4
3	Mata	N 1° 28' 35,1" W 60° 44' 41,2"	Caracarái (Prop. particular)	5,3	0,78	0,37	0,05	0,43	2,22	30,1	2
4		N 02° 39' 48" W 60° 50' 15"	Cantá (Campo exper. confiança)	4,2	0,38	0,18	0,06	1,13	1,92	33,9	3
5		N 02° 24' 00" W 60° 58' 37,46"	Mucajáí (Campo exper. Serra da Prata)	4,2	0,16	0,1	0,03	1,08	4,08	28,7	8
6		N 02° 56' 20" W 61° 00' 5"	Alto alegre (Prop. particular)	5	0,57	0,33	0,03	0,23	1,84	14,7	7
7		N 02° 57' 46" W 60° 42' 20,70"	Boa Vista (Campo Exper. Monte Cristo)	5,4	1,94	0,67	0,03	0,03	1,4	19,3	4
8	Cerrado	N 3° 52,57' 35" W 59° 36,58' 58,18"	Normandia (Prop. particular)	5	0,19	0,11	0,02	0,83	3,96	22,5	8
9		N 02° 15' 00" W 60° 39' 54"	Boa Vista (Campo Exper. Água Boa)	4,9	0,19	0,13	0,02	0,68	2,02	16,8	4

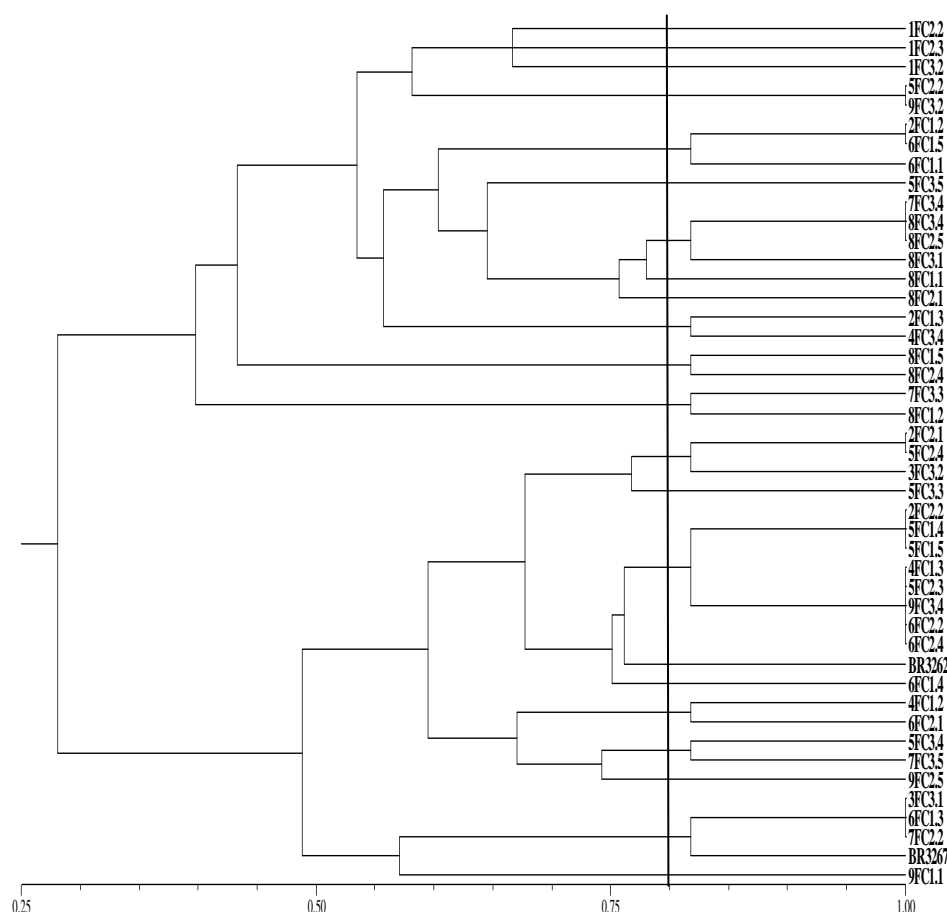


Figura 1 - Dendrograma de similaridade de bactérias que nodulam o feijão-caupi coletadas em área de cerrado e mata do Estado de Roraima.

Tabela 2 - Número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) de plantas de feijão-caupi inoculadas com isolados nativos de Roraima e estirpes-referência recomendadas para a cultura.

Trat	NN	MSN (g planta ⁻¹)	MSPA (g planta ⁻¹)	Trat	NN	MSN (g planta ⁻¹)	MSPA (g planta ⁻¹)
1FC 2.2	4.33 b	0.010 b	0.78 b	6 FC 2.1	25.0 a	0.216 a	2.510 a
1FC 3.2	6.00 b	0.033 b	0.78 b	6FC 2.2	27.33 a	0.220 a	2.116 a
2FC 1.2	6.50 b	0.023 b	0.93 b	6 FC 2.4	30.66 a	0.236 a	2.583 a
2FC 1.3	5.33 b	0.060 b	1.19 b	7 FC 2.2	16.83 a	0.063 b	0.920 b
2FC 2.1	11.83 b	0.050 b	0.93 b	7 FC 3.4	16.16 a	0.083 b	1.293 b
3 FC 3.1	26.00 a	0.270 a	2.666 a	7 FC 3.5	25.00 a	0.213 a	2.343 a
3 FC3.2	25.16 a	0.286 a	2.580 a	8 FC 1.1	15.50 a	0.130 b	1.933 a
4 FC 1.2	27.33 a	0.293 a	2.583 a	8 FC 1.2	6.50 b	0.050 b	1.21 b
4 FC 1.3	23.50 a	0.200 a	1.963 a	8 FC 1.5	4.50 b	0.036 b	1.12 b
5 FC 1.4	14.33 a	0.130 a	2.11 a	8 FC 2.1	10.33 b	0.053 b	1.16 b
5 FC 1.5	14.50 a	0.180 a	1.816 a	8 FC 3.1	11.0 b	0.090 b	1.23 b
5 FC 2.2	25.5 a	0.136 a	1.080 b	8 FC 3.4	11.0 b	0.090 b	1.45 b
5 FC 2.3	15.66 a	0.163 a	1.846 a	9 FC 1.1	17.0 a	0.156 a	2.196 a
5 FC 2.4	26.16 a	0.196 a	1.766 a	9 FC 2.5	26.50 a	0.200 a	2.453 a
5 FC 3.3	21.1 a	0.190 a	1.936 a	9 FC 3.2	22.0 a	0.086 b	1.096 b
5 FC 3.4	28.00 a	0.233 a	1.663 b	9 FC 3.4	27.66 a	0.230 a	2.266 a
5 FC 3.5	7.00 b	0.043 b	0.76 b	BR 3262	22.0 a	0.210 a	2.173 a
6 FC 1.3	22.5 a	0.183 a	3.350 a	BR 3267	31.66 a	0.226 a	2.833 a
6 FC 1.4	22.8 a	0.270 a	2.793 a	Controle	0.00 b	0.00 b	1.46 b
6 FC 1.5	24.83 a	0.216 a	2.303 a	Nitrogenada	0.00 b	0.00 b	1.75 a

Valores seguidos da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.