

Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central

Aloísio Freitas CHAGAS JUNIOR¹, Luiz Antonio de OLIVEIRA², Arlem Nascimento de OLIVEIRA³, André Luiz WILLERDING⁴

RESUMO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é uma cultura importante na Amazônia Central, mas os rizóbios associados a essa leguminosa são poucos estudados. O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade e caracterizar fenotipicamente os isolados de rizóbio que nodulam feijão-caupi na região. As populações de rizóbio de Novo Ayrão proporcionaram as maiores produções de matéria seca da parte aérea e total, raiz, número de nódulos e peso dos nódulos secos nas plantas de feijão-caupi; porém, não diferiram do tratamento testemunha com N. Com base nos critérios fenotípicos avaliados, foi possível identificar uma ampla diversidade de populações de rizóbios contidos nos solos da Amazônia.

PALAVRAS-CHAVE: diversidade microbiana, ecologia microbiana, infectividade.

Effectiveness and phenotypic characterization of cowpea rhizobia isolated from central Amazonian soils

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata*) is an important legume cultivated in central Amazonia, but its rhizobia have been little studied. The present study aimed to evaluate the effectiveness and to characterize phenotypically the population of indigenous rhizobia that infect cowpea in the region. The rhizobia population from Novo Ayrão soils provided the highest shoot, root and total dry matter yields, number of nodules and nodule dry weights in cowpea plants; however, they were not different from those found for the control treatment with N. Based on phenotypic criteria, it was possible to identify a wide diversity of populations of rhizobia contained in Amazonian soils.

KEY WORDS: microbial diversity, microbial ecology, infectivity.

¹ Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi, Rua Badejós, chácaras 69-72, Lote 07 Zona Rural, Caixa Postal: 66, CEP: 77402-970 Gurupi-TO, Brasil. E-mail: chagasjraf@bol.com.br

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. E-mail: luizoli@inpa.gov.br

³ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. E-mail: arlem@yahoo.com.br

⁴ Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), Coordenação de Bioquímica e Biologia Molecular, Av. Gov. Danilo Areosa, 691, CEP 69075-351, Distrito Industrial, Manaus-AM, Brasil. E-mail: andre.cba@sufrema.gov.br

A seleção de estirpes de rizóbio visando desenvolver inoculantes para sementes de leguminosas vem sendo objeto de muitos estudos (Hungria *et al.*, 2001; Hara & Oliveira, 2005). Tal seleção deve objetivar a obtenção de estirpes eficientes, adaptadas às condições edafoclimáticas locais e competitivas em relação à população nativa. Em ecossistemas naturais, vários autores têm encontrado alta diversidade genética dentro de populações de rizóbio (Hungria *et al.*, 2001; Zilli *et al.*, 2004). Segundo eles, essa diversidade deve-se à rápida reprodução, variações, mutações e aos processos naturais de transferência genética. O estudo de rizóbios nativos, visando à seleção de estirpes altamente eficientes, é facilitado com o uso de plantas-iscas e isolamento das bactérias a partir dos nódulos formados. As características morfofisiológicas dos rizóbios, tais como o tempo de crescimento, alteração do pH, consistência do muco produzido, além de outras, fornecem informações importantes para a identificação e agrupamento de estirpes. Assim, o presente trabalho visou obter rizóbios capazes de nodular efetivamente o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivado em diferentes solos da Amazônia, bem como caracterizá-los fenotipicamente.

Para capturar e avaliar a eficiência das populações de rizóbio (teste de infectividade e fixação de N₂) foram obtidas 63 amostras de solo (0-20 cm de profundidade) nos municípios de Novo Ayrão, Manaus, Rio Preto da Eva, Manacapuru, Iranduba, Careiro da Várzea e Barreirinha, no Estado do Amazonas, em diferentes formas de uso da terra (cultivos agrícolas e áreas de floresta). As amostras de solo-inóculo foram misturadas na proporção de 1:10 com areia esterilizada (Oliveira *et al.*, 2006). Plantas de feijão-caupi foram usadas como iscas (Xavier *et al.*, 1997), com três repetições para cada amostra de solo-inóculo (tratamento) e três plantas por vaso com capacidade de 1 kg. Em casa-de-vegetação, as plantas-iscas receberam solução nutritiva isenta de nitrogênio (Oliveira *et al.*, 2006), além de água esterilizada. No estágio de floração (45 dias após a germinação), as plantas e os nódulos foram coletados, e submetidos às seguintes avaliações: matéria seca da parte aérea das plantas (MSPA), matéria seca das raízes (MSR), massa seca total (MST), número de nódulos (NN) e massa de nódulos secos (MNS).

As análises estatísticas foram realizadas de acordo com um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 65 tratamentos, dois quais 63 com utilização de solos-inóculos e dois controles, adubado com N (50 kg⁻¹ de uréia em três aplicações) e testemunha (sem N e sem inoculação), ambos cultivados somente com areia esterilizada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e os tratamentos significativos contrastados pelo teste de Tukey. Os dados referentes aos nódulos foram transformados para raiz quadrada ($x + 0,5$).

O isolamento e a purificação dos rizóbios foram realizados em meio YMA (Vincent, 1970), contendo azul de bromotimol, enquanto a caracterização morfofisiológica baseou-se em Martins *et al.* (1997). Para cada um dos isolados considerou-se o tempo de crescimento, pH do meio de cultura, diâmetro, forma, elevação, borda, transparência, aparência e cor da colônia, elasticidade e tipo de muco.

A maioria dos solos-inóculos promoveu aumentos significativos no crescimento das plantas de feijão-caupi em relação à testemunha. As fontes de inóculos presentes nas amostras de solo de Novo Ayrão (INPA NA) proporcionaram aumentos significativos na produção de MSPA, MSR, MST, NN e MNS, porém, sem diferirem das plantas adubadas com N (Tabela 1). Os resultados de biomassa registrados para o feijão-caupi, com a utilização de amostra de solo de Novo Ayrão (INPA NA), podem ser explicados pela maior eficiência de algumas bactérias presentes nestas fontes de inóculos. Porém, nem todas as plantas que apresentaram número e massa de nódulos secos significativos, como os tratamentos com as fontes de inóculos INPA TP12, INPA CV6 e INPA CA 15, tiveram os maiores rendimentos de matéria seca, indicando diferenças entre os isolados de rizóbio quanto à capacidade de fixar nitrogênio. Hara & Oliveira (2005) também encontraram baixos coeficientes de correlação entre a produção de matéria seca e número e peso dos nódulos secos em diferentes fontes de inóculos para o feijão-caupi.

O dendrograma baseado nos dados morfofisiológica permitiu agrupar 200 isolados em 22 grupos (Tabela 2). Os rizóbios dos grupos 6 e 10, 4 e 5, e 2 e 8 exibiram similaridades acima de 90% (Figura 1). Devido à grande dissimilaridade entre os outros grupos de isolados, pode-se afirmar que a comunidade de rizóbios nativos que nodulam o feijão-caupi na Amazônia é bem diversificada, similar a observações em outras regiões brasileiras (Hungria *et al.*, 2001; Zilli *et al.*, 2004).

Os grupos de isolados que acidificaram o meio de cultura apresentaram crescimento rápido (Tabela 2), características culturais típicas dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Moreira & Pereira, 2001). Por sua vez, os que alcalinizaram o meio de cultura exibiram características do gênero *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984; Moreira & Pereira, 2001). Hameed *et al.* (2004) discutem que as características morfofisiológicas revelam uma ampla diversidade de populações de rizóbios, e que normalmente estão relacionadas com os estudos em nível molecular. Porém, para confirmar essa inferência e esclarecer a posição taxonômica dos isolados obtidos neste trabalho, torna-se necessário estudá-los geneticamente.

A caracterização morfofisiológica possibilitou um maior conhecimento da população de rizóbios dos solos da Amazônia Central, e o agrupamento facilitará o desenvolvimento das etapas seguintes de confirmação da nodulação e seleção de

Tabela 1 - Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi colonizadas por rizóbios provenientes de solos de diferentes áreas. ⁽¹⁾

Inóculos ²	MSPA (g.vaso ⁻¹)	MSR (g.vaso ⁻¹)	MST (g.vaso ⁻¹)	NN.vaso ⁻¹	MSN (mg.vaso ⁻¹)
INPA NA1	5,37 a	2,27 ab	7,64 ab	76,3 a	377 a
INPA NA2	5,73 a	4,33 ab	10,06 a	82,7 a	360 a
INPA NA3	5,63 a	5,13 a	10,76 a	77 a	300 ab
INPA NA4	6,20 a	3,70 ab	9,9 a	92,7 a	310 ab
INPA NA5	5,43 a	2,57 ab	8,0 ab	79 a	430 a
INPA NA6	7,13 a	2,57 ab	9,7 a	106 a	313 ab
INPA NA7	5,80 a	4,13 ab	9,93 a	78,7 a	423 a
INPA RB1	1,93 bc	0,91 cd	2,84 d	11,7 efg	13,3 g
INPA RB2	2,76 b	1,74 c	4,50 c	8,0 fg	53,3 e
INPA RB3	1,69 c	0,71 cd	2,40 de	2,0 ghi	3,3 h
INPA RB4	2,51 b	1,23 cd	3,74 cd	2,7 ghi	23,3 f
INPA RB5	3,30 b	1,19 cd	4,49 c	40 bc	90 d
INPA RB6	2,69 b	1,19 cd	3,88 cd	52,3 b	113,3 cd
INPA RB7	1,94 c	0,84 cd	2,78 de	16,7 ef	126,7 c
INPA RB8	2,80 b	0,77 cd	3,57 cd	17,3 ef	263,3 b
INPA RB9	1,67 c	0,61 cde	2,28 de	5,7 fgh	86,7 d
INPA RB10	1,57 c	0,80 cd	2,37 de	17,3 efg	66,7 de
INPA RB11	2,15 bc	0,86 cd	3,01 cd	26,7 de	106,7 c
INPA RB12	2,72 b	0,81 cd	3,53 cd	11,7 efg	256,7 b
INPA RB13	1,08 cd	0,50 de	1,58 f	3,0 ghi	22,7 f
INPA RB14	1,44 c	0,56 de	2,00 e	7,7 fgh	51,7 e
INPA RB15	0,92 cd	0,38 def	1,30 f	18,3 efg	65 de
INPA RB16	1,60 c	0,49 de	2,09 e	10,7 fgh	83,7 d
INPA RB17	1,67 c	0,53 de	2,20 e	24,0 de	90 d
INPA RB18	1,51 c	0,62 cde	2,13 e	16,7 efg	94,7 cd
INPA TP1	1,46 c	0,29 f	1,75 f	19,3 de	53,3 e
INPA TP2	2,52 b	0,39 def	2,91 d	22,7 de	63,5 de
INPA TP3	3,19 b	0,46 def	3,65 cd	45,3 bc	166,7 c
INPA TP4	2,84 b	0,5 def	3,34 cd	17,3 efg	123,3 c
INPA TP5	1,58 c	0,63 cde	2,21 e	32,7 bc	156,7 c
INPA TP6	2,94 b	0,45 ef	3,39 cd	44,3 bc	143,3 c
INPA TP7	2,83 b	0,41 ef	3,24 cd	42 bc	120 c
INPA TP8	3,06 b	0,45 ef	3,51 cd	43,3 bc	160 c
INPA TP9	2,98 b	0,48 def	3,46 cd	41,7 bc	150 c
INPA TP10	3,01 b	0,45 ef	3,46 cd	28,7 cd	133,3 c
INPA TP11	3,11 b	0,58 de	3,69 cd	40,7 bc	150 c
INPA TP12	2,82 b	0,53 de	3,35 cd	114,3 a	136,7 c
INPA MA1	2,78 b	0,65 cde	3,43 cd	28,3 cd	133 c
INPA MA2	2,69 b	0,61 cde	3,30 cd	33 bc	123 c
INPA MA3	3,20 b	0,62 cde	3,82 cd	28,3 cd	100 cd
INPA CA4	3,49 b	0,57 de	4,06 c	57,7 b	137 c
INPA CV5	2,43 b	0,62 cde	3,05 cd	41,3 bc	107 cd
INPA CV6	3,0 b	0,87 cd	3,87 cd	26 de	413 a
INPA CV7	2,42 b	0,52 de	2,94 d	32,3 bc	73 de
INPA CV8	2,92 b	0,62 cde	3,54 cd	42 bc	110 cd
INPA CV9	3,05 b	0,60 cde	3,65 cd	34,3 bc	103 cd
INPA MA10	1,9 bc	0,65 cde	2,55 de	21,7 de	117 cd
INPA MA11	2,07 bc	0,55 de	2,62 de	31 bcd	67 de
INPA CV12	3,17 b	0,51 de	3,68 cd	51,7 b	127 c

Tabela 1 - Continuação

Inóculos ²	MSPA (g.vaso ⁻¹)	MSR (g.vaso ⁻¹)	MST (g.vaso ⁻¹)	NN.vaso ⁻¹	MSN (mg.vaso ⁻¹)
INPA CV13	3,31 b	0,67 cd	3,98 cd	43 bc	140 c
INPA CV14	2,62 b	0,59 de	3,21 cd	42,3 bc	107 cd
INPA CA15	2,51 b	0,71 cd	3,22 cd	76,7 a	120 c
INPA CA16	2,92 b	0,63 de	3,55 cd	48,7 bc	113 cd
INPA CA17	3,02 b	0,61 de	3,63 cd	50,7 b	113 cd
INPA BA1	1,66 c	0,58 de	2,24 e	24,7 de	129,3 c
INPA BA2	1,56 c	0,50 de	2,06 e	13,3 f	66,7 de
INPA BA3	1,48 c	0,53 de	2,01 e	20,3 de	109,7 cd
INPA BA4	0,89 d	0,39 ef	1,28 f	30 cd	91,7 d
Testemunha SN	1,05 cd	0,43 ef	1,48 f	0 j	0 hi
Testemunha CN	6,2 a	4,1 a	10,3 a	0 j	0 hi
CV (%)	28,1	29,8	27,6	25,5	23,8

¹ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

² Fontes de inóculos provenientes das regiões de Novo Ayrão (INPA NA), Ramal do Brasileiro, Manaus (INPA RB), Rio Preto da Eva, Manacapuru e Iranduba (INPA TP), Catalão e Marchantaria, Manacapuru (INPA MA), Careiro da Várzea (INPA CV) e Barreirinha (INPA BA), no Estado do Amazonas. As coletas dos solos foram feitas a uma profundidade máxima de 20 cm.

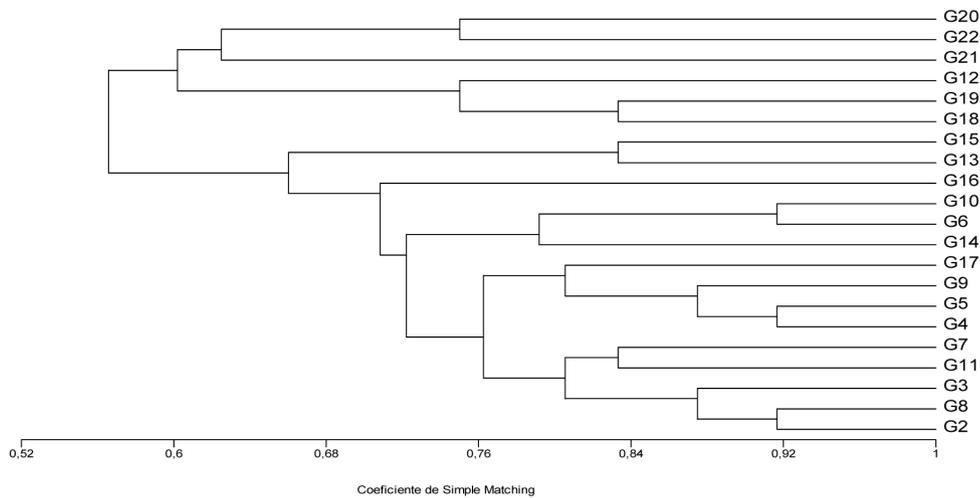


Figura 1 - Dendrograma das características morfo-fisiológicas dos isolados de rizóbio estudados. Os rizóbios foram agrupados com base no coeficiente Simple Matching, utilizando-se o programa MVSP (KCS, 2009).

Tabela 2 - Características morfo-fisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos de diferentes regiões na Amazônia Central.

Grupos/Nº de Isolados ¹	Características dos grupos de isolados ²											
	TC	pH	DC	FC	EC	BC	Tr	AC	CC	AM	EM	TM
Grupo 1 (11)	R	Ac	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	CE	Vis
Grupo 2 (21)	R	Ac	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
Grupo 3 (17)	R	Ac	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
Grupo 4 (3)	R	Al	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
Grupo 5 (15)	R	Al	≤ 2	C	P	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
Grupo 6 (12)	R	Ac	≤ 2	C	P	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis
Grupo 7 (11)	L	Ac	> 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis
Grupo 8 (6)	L	Ac	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
Grupo 9 (17)	L	Al	≤ 2	C	P	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
Grupo 10 (5)	L	Ac	≤ 2	C	P	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis
Grupo 11 (2)	L	Al	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
Grupo 12 (14)	R	Ac	≤ 2	C	P	I	S	Ho	A	Ho	SE	Vis
Grupo 13 (14)	L	Ac	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	CE	But

Tabela 2 - Continuação

Grupos/Nº de Isolados ¹	Características dos grupos de isolados/ ²											
Grupo 14 (4)	L	Ac	≤ 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	But
Grupo 15 (4)	R	Ac	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	CE	But
Grupo 16 (1)	R	Al	≤ 2	C	E	I	N	Ho	A	Ho	SE	Vis
Grupo 17 (12)	L	Al	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	CE	Vis
Grupo 18 (4)	R	Ac	≤ 2	C	P	I	S	He	A	He	SE	Vis
Grupo 19 (13)	R	Ac	> 2	C	P	Ir	S	He	A	He	SE	Vis
Grupo 20 (5)	L	Ac	≤ 2	C	E	I	N	He	A	He	SE	Vis
Grupo 21 (3)	R	Al	> 2	C	E	I	S	He	A	He	SE	Vis
Grupo 22 (6)	L	Ac	≤ 2	C	E	I	S	He	B	He	CE	Vis

¹ Grupos de isolados.

²TC - tempo de crescimento (R: rápido ≤ 3 dias, L: lento > 3 dias); pH do meio (Ac: ácido, Al: alcalis); DC - diâmetro da colônia em mm; FC - forma da colônia (C: circular); EC - elevação da colônia (P: plana, E: elevada); BC - borda da colônia (I: inteira, Ir: irregular); Tr - transparência (S: sim, N: não); AC - aparência da colônia (Ho: homogênea, He: heterogênea); CC - cor da colônia (A: amarela, B: branca); AM - aparência do muco (Ho: homogênea, He: heterogênea); EM - elasticidade do muco (SE: sem elasticidade, CE: com elasticidade); TM - tipo de muco (Vis: viscoso, But: butirico).

rizóbio eficiente para a fixação do N₂ em feijão caupi. O estudo das características fisiológicas e morfológicas revelou uma diversidade ampla dos isolados de rizóbio.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa ao primeiro autor; à UFAM e ao INPA pelo espaço físico, e à FAPEAM e ao CNPq pelos recursos financeiros que viabilizaram o estudo.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Hameed, S.; Yasmin, S.; Malik, K.A.; Zafar, Y.; Hafeez, Y. 2004. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. *Biol. Fertil. Soils*, 39:179-185.
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A. 2005. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40:667-672.
- Hungria, M.; Chueire, L.M.O.; Coca, R.G.; Megías, M. 2001. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1349-1361.
- Jordan, D.C. 1984. Family III Rhizobiaceae. In: Kriegel, N.R.; Holt, J.G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 234-256.
- Kovach Computing Services. 2009. Multi-Variate Statistical Package. (www.kovcomp.co.uk/mvsp/).
- Martins, L.M.V.; Xavier, G.R.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 1997. *Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio"*. (Comunicado Técnico nº 19). Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. 14p.
- Moreira, F.M.S.; Pereira, E.G. 2001. Microsymbionts: rhizobia. In: Swift, M.; Bignell, D. (Ed.). *Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practices*. ICRAF, Bogor, Indonésia. p. 19-24.
- Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A.; Andrade, J.S.; Chagas Júnior, A.F. 2006. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26:853-860.
- Vincent, J. M. 1970. *A manual for practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook, n. 15. Blackwell Scient. Publ., Oxford. 140p.
- Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Zilli, J.E.; Peixoto, R.C.; Rumjanek, N.G. 1997. *Protocolo operacional para isolamento de rizóbios a partir de nódulos de planta-isca*. (Documentos, 43). Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. 7p.
- Zilli, J.E.; Valisheski, R.R.; Freire Filho, F.R.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 2004. Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. *Bras. J. Microbiol.*, 35:281-287.

Recebido em 22/11/2007

Aceite em 20/05/2009

