

# Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH

Márcia Rufini<sup>(1)</sup>, Paulo Ademar Avelar Ferreira<sup>(1)</sup>, Bruno Lima Soares<sup>(1)</sup>, Dâmiany Pádua Oliveira<sup>(2)</sup>, Messias José Bastos de Andrade<sup>(2)</sup> e Fatima Maria de Souza Moreira<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal de Lavras (Ufla), Departamento de Ciência do Solo, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: marciarufini@yahoo.com.br, avelarufila@gmail.com, brunolsoares@gmail.com, fmoreira@dcs.ufla.br <sup>(2)</sup>Ufla, Departamento de Agricultura. E-mail: damy\_agro84@hotmail.com, mandrade@dag.ufla.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pH do meio de cultivo na eficiência simbiótica de estirpes de *Rhizobium*, em solo com e sem calagem. Foram realizados experimentos em casa de vegetação, com e sem calagem, e no campo, apenas com calagem. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com quatro repetições, e os tratamentos foram cinco estirpes de *Rhizobium* (UFLA 02-100, UFLA 02-68, UFLA 04-195, UFLA 04-202 e CIAT 899), cultivadas em meio de cultura 79 com diferentes valores de pH (5,0, 6,0 e 6,9), e testemunhas sem inoculação, com ou sem nitrogênio mineral. Foram avaliados número e massa de matéria seca de nódulos, massa de matéria seca da parte aérea, eficiência relativa, teor e acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos, número de vagens por planta, número de grãos por vagem e rendimento e massa de 100 grãos. O valor de pH ideal para o meio de cultivo variou com as estirpes e com a variável analisada. Os tratamentos que receberam calagem foram superiores aos demais. No campo, independentemente do pH do inoculante, as populações nativas do solo e as estirpes introduzidas promoveram rendimento de grãos semelhante ao da testemunha com 70 kg ha<sup>-1</sup> de N e ao da estirpe referência CIAT 899.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium*, acidez, fixação biológica de nitrogênio, inoculante.

## Symbiosis of nitrogen fixing bacteria with common bean in different pH values

Abstract – The objective of this study was to evaluate the effect of the culture medium pH in the symbiotic effectiveness of *Rhizobium* strains in soil, with and without liming. Assays were performed in greenhouse, with and without liming, and in the field, with liming. The experimental design was randomized blocks with four replicates, and treatments were five strains (UFLA 02-100, UFLA 02-68, UFLA 04-195, UFLA 04-202 and CIAT 899), grown in a 79 culture medium with different pH values (5.0, 6.0 and 6.9), and two controls without inoculation: with or without mineral nitrogen. Variables analyzed were number and weight of dry nodules, shoot dry matter, relative efficiency, nitrogen content and accumulation in shoots and grains, number of pods per plant, number of grains per pod, and yield and weight of 100 grains. The optimum pH value for the culture medium varied with the strains and the variable analyzed. Treatments with liming were superior to the others. In the field, regardless of the inoculant pH, the native soil populations and the introduced strains promoted grain yields similar to those of the control with 70 kg ha<sup>-1</sup> of N and to those of the reference strain CIAT 899.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium*, acidity, biological nitrogen fixation, inoculant.

### Introdução

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a principal fonte de proteína na dieta da maioria da população brasileira. O nutriente absorvido em maior quantidade pelo feijoeiro-comum é o nitrogênio, que apresenta alto custo e é facilmente perdido por volatilização ou lixiviação (Cantarella, 2007). Por isso, o suprimento adequado desse nutriente para a cultura é fundamental, principalmente no período de maior absorção, que ocorre dos 35 aos 50 dias após

a emergência da planta (Rosolem & Marubayashi, 1994).

Parte das exigências do feijoeiro-comum em relação ao nitrogênio pode ser suprida pelo processo de fixação biológica, por meio da simbiose estabelecida com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (BFNN). Há, no entanto, descrédito quanto à capacidade dessa leguminosa de fixar N<sub>2</sub> suficiente para alcançar produtividades elevadas, por causa de diversos fatores bióticos e abióticos que afetam as BFNN e a planta hospedeira e, conseqüentemente, influenciam

o estabelecimento e a eficiência da simbiose. A competição com populações de BFNN nativas pouco eficientes e estabelecidas no solo, a baixa adaptação às condições ambientais, como temperatura e acidez, e o ciclo curto do feijoeiro-comum geralmente limitam a taxa de fixação (Moreira & Siqueira, 2006). Em razão desses fatores e da promiscuidade da nodulação observada no feijoeiro-comum, é necessário tomar certos cuidados para se obter um resultado satisfatório com a inoculação. O uso de um elevado número de células viáveis da estirpe eficiente, selecionada e adaptada às condições do ambiente, pode garantir vantagem competitiva pelos sítios de infecção em relação às BFNN nativas (Moreira & Siqueira, 2006).

O pH do solo constitui um dos principais fatores limitantes à simbiose BFNN-leguminosas, quanto à multiplicação e à sobrevivência das BFNN e à nodulação e à fixação de nitrogênio (Hungria & Vargas, 2000; Raza et al., 2001). Algumas espécies de BFNN podem tolerar melhor a acidez do que outras, e essa tolerância pode variar entre estirpes de uma mesma espécie (Hungria et al., 1997). As BFNN crescem em uma faixa de pH ideal entre 6,0 e 7,0, e poucas crescem bem em pH menor que 5,0 (Graham et al., 1994; Rodrigues et al., 2006; Ali et al., 2009).

Para maximizar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) ao feijoeiro-comum em solos ácidos, é necessário que as estirpes de BFNN utilizadas nos inoculantes sejam adaptadas à essa condição, competitivas e eficientes no processo de infecção. Estirpes de crescimento rápido geralmente são menos tolerantes à acidez do que as de crescimento lento (Graham et al., 1994; Moreira & Siqueira, 2006). Algumas estirpes de crescimento rápido do gênero *Rhizobium* toleram pH mais ácido, como a *Rhizobium loti* (atualmente *Mesorhizobium loti*), a *Rhizobium meliloti* e *Rhizobium tropici* (Graham et al., 1994). A origem das estirpes e sua tolerância à acidez também parecem ter boa correlação, ou seja, estirpes isoladas de solos ácidos mostram-se mais adaptadas a essas condições do que as isoladas de solos com pH mais elevado (Moreira, 1994). De acordo com Dilworth et al. (1999), esse fato pode ser explicado pelo fenômeno denominado “acid habituation”.

O fato de os inoculantes serem produzidos com o pH próximo à neutralidade pode limitar a adaptação das estirpes às condições de acidez dos solos tropicais

e, conseqüentemente, a simbiose efetiva. Dessa forma, a submissão de estirpes de *Rhizobium* a condições de estresse, durante a produção do inoculante, pode aumentar sua sobrevivência e eficiência simbiótica em campo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pH do meio de cultivo na eficiência simbiótica de estirpes de *Rhizobium*, em solo com e sem calagem.

## Material e Métodos

Foram realizados três experimentos no laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras (Ufla), em casa de vegetação e no campo experimental, no período de outubro de 2009 a maio de 2010.

O solo do campo experimental foi classificado como um Latossolo Vermelho distrófico, com baixo pH e baixa fertilidade, cultivado com cana-de-açúcar há alguns anos, sem relato de cultivo de leguminosas e de inoculação na área. As características químicas do solo indicaram: pH em água, 5,1; P (Mehlich I), 4,0 mg dm<sup>-3</sup>; K, 80 mg dm<sup>-3</sup>; Ca, 1,2 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg, 0,3 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al, 0,4 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al, 6,3 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; soma de bases, 1,7 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; T, 8,0 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; V, 21,3%; e matéria orgânica, 2,7 dag kg<sup>-1</sup>.

Para os experimentos em casa de vegetação e campo, foram selecionadas quatro estirpes da coleção de BFNN do Laboratório de Microbiologia do Solo da Ufla, eficientes em estabelecer simbiose com o feijoeiro-comum. As estirpes testadas foram: UFLA 04-195 (*Rhizobium etli*), UFLA 04-202 (*R. etli*), UFLA 02-100 (*R. etli*) e UFLA 02-68 (*R. etli* bv. *mimosae*). Duas destas estirpes, UFLA 04-195 e UFLA 04-202, foram isoladas de nódulos do siratro [*Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urb.], utilizada como planta-isca. Plantas de siratro foram inoculadas com suspensões obtidas a partir de amostras de solos ácidos da Amazônia Ocidental, em trabalho realizado por Lima et al. (2009). Essas duas estirpes crescem melhor quando cultivadas em meio de cultura 79 líquido, com pH 5,0 (Ferreira, 2008b). As estirpes UFLA 02-100 e UFLA 02-68 foram isoladas por Pereira et al. (2000) de nódulos de feijoeiro-comum, no Município de Theobroma, RO. A estirpe UFLA 02-100 cresce melhor em meio de cultura 79 líquido com pH 6,0 e a UFLA 02-68 não mostra crescimento diferenciado nas três condições de pH (5,0, 6,0 e 6,9).

As quatro estirpes foram comparadas à estirpe controle de *R. tropici*, CIAT 899, recomendada como inoculante para a cultura do feijoeiro-comum pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e que apresenta melhor crescimento em pH 5,0, em meio de cultura 79 líquido (Ferreira, 2008b). As estirpes avaliadas são bastante eficientes em contribuir para o melhor crescimento do feijoeiro-comum pela FBN (Soares et al., 2006; Ferreira, 2008b; Ferreira et al., 2009).

No primeiro experimento, avaliou-se a eficiência das estirpes crescidas em meio de cultivo com diferentes condições de pH e inoculadas em plantas de feijoeiro-comum em vaso, com capacidade de 1,8 dm<sup>3</sup>, contendo solo do campo experimental com e sem calagem.

O solo foi coletado na camada arável (0–20 cm), destorroado, homogeneizado e passado em peneira de 4 mm. O cálculo da dose de calcário foi realizado segundo o método de saturação por bases, de modo a elevar a saturação para 60%, nos tratamentos com calagem. Em todas as parcelas, foi efetuada uma adubação com 300, 300, 40, 0,8, 1,5, 3,6, 5,0 e 0,15 mg dm<sup>-3</sup> de K, P, S, B, Cu, Mn, Zn e Mo, respectivamente (Malavolta et al., 1989). Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições e arranjo fatorial 5x3x2 + 4, com cinco estirpes, três valores de pH do meio de cultura 79 líquido (5,0, 6,0 e 6,9), dois níveis de calagem (com e sem), e quatro tratamentos adicionais: testemunhas sem inoculação, com ou sem N mineral, na presença ou ausência de calagem. O nitrogênio mineral correspondeu a 300 mg dm<sup>-3</sup>, com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> como fonte, parcelados em três aplicações.

Foi utilizada a cultivar de feijoeiro-comum BRSMG Majestoso (Abreu et al., 2007). As sementes foram desinfestadas superficialmente e colocadas para germinar em condições estéreis. Foram utilizadas quatro sementes pré-germinadas por vaso e, em cada uma, foi inoculado 1 mL do inóculo cultivado no meio 79 de cultura líquido. Após a emergência, foi feito o desbaste e foram deixadas duas plântulas por vaso. As plantas foram colhidas no período da floração, para avaliar: número de nódulos (NN), massa de matéria seca de nódulos (MSN) e da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER), teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA). A ER foi calculada em relação à produção de MSPA das plantas do tratamento que receberam N mineral (TCN), por meio da expressão:  $ER = (MSPA_{tratamento} \times 100) / MSPA_{TCN}$ . Para o cálculo da

ER, os tratamentos que receberam calagem foram comparados à testemunha que recebeu N mineral e calagem; já os tratamentos sem calagem foram comparados à testemunha que recebeu N mineral sem calagem.

O segundo experimento foi conduzido no campo, na área experimental, na safra da seca, com uso do nível tecnológico 2 (NT2), que não inclui irrigação, preconizado pela 5ª Aproximação das Recomendações para o Uso de Corretivos e Fertilizantes no Estado de Minas Gerais (Ribeiro et al., 1999). Foi utilizada a cultivar BRSMG Majestoso de grão tipo carioca. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso com quatro repetições e arranjo fatorial 5x3 + 2, com as cinco estirpes, três valores de pH (5,0, 6,0 e 6,9) do meio de cultura 79 líquido, e dois tratamentos adicionais: testemunhas sem inoculação, com ou sem N mineral. Todos os tratamentos receberam calagem.

Os métodos descritos em Ferreira et al. (2009) foram utilizados para preparo do inoculante, inoculação das sementes, preparo e adubação do solo; plantio e coleta das plantas para as avaliações de número de nódulos, massa de matéria seca de nódulos e parte aérea, teor de nitrogênio; e para cálculos da determinação do acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos, e da eficiência relativa. Foram analisados número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e rendimento de grãos com umidade corrigida para 13%.

As parcelas foram constituídas por seis linhas de 4 m de comprimento, espaçadas em 0,50 m, o que totalizou 12 m<sup>2</sup> de área total e 4 m<sup>2</sup> de área útil, com duas linhas destinadas à colheita dos grãos. Nos experimentos de casa de vegetação e campo, o teor de nitrogênio total foi avaliado pelo método semi-microkjedahl, de acordo com Sarruge & Haag (1979).

No terceiro experimento, conduzido em laboratório, foi avaliada a densidade das populações nativas do solo do campo experimental a partir do número mais provável (NMP), na camada de 0–20 cm do solo. Foram utilizados vidros escuros de 500 mL, tipo "big neck", que continham solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), com 5,25 mg L<sup>-1</sup> de N na forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub>. As sementes de feijoeiro-comum, cultivar BRSMG Majestoso, foram inoculadas com 1 mL de suspensão de solo das diluições seriadas 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>. Foi incluído um controle positivo (inoculação da estirpe eficiente CIAT 899), além de dois controles

negativos sem inoculação: um com adição de N mineral e outro sem N mineral.

Os dados foram submetidos à análise de variância, por meio do SISVAR, versão 4.0 (Ferreira, 2008a). As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Nos três experimentos, os valores das variáveis número de nódulos (NN) e massa de matéria seca de nódulos (MSN) foram previamente transformados pela fórmula  $(x + 0,5)^{0,5}$ .

## Resultados e Discussão

No experimento em casa de vegetação, nenhuma das variáveis analisadas foi afetada pelo pH do meio de cultivo das estirpes, e apenas o NN e TNPA apresentaram diferenças entre as estirpes estudadas. As estirpes CIAT 899, UFLA 04-195, UFLA 04-202 e UFLA 02-100 apresentaram NN superior ao da estirpe UFLA 02-68 (Tabela 1). A estirpe CIAT 899 apresentou menor TNPA em relação às outras estirpes. Não houve diferenças significativas nos demais parâmetros (MSN, MSPA, ER e ANPA). Para todos os parâmetros analisados, excetuando-se a ER, os tratamentos com calagem superaram os sem calagem, o que corrobora resultados obtidos por Campanharo et al. (2010). O fato de os tratamentos sem calagem terem se desenvolvido menos não significa falta de adaptação da estirpe à acidez do solo, já que a própria sensibilidade das plantas à acidez pode ter influenciado esse resultado. De acordo com Moreira & Siqueira (2006), o hospedeiro pode ser mais afetado pela acidez do solo do que a bactéria.

O desdobramento da interação tripla não foi significativo para NN e MSN. Para a característica MSPA (Tabela 2), houve significância apenas quanto às estirpes UFLA 02-100 e UFLA 02-68. A estirpe UFLA 02-100 se destacou no solo com calagem quando cultivada em pH 5,0 e 6,0; já a estirpe UFLA 02-68 apresentou melhor desempenho no solo com calagem, ao ser cultivada em pH 6,0 e 6,9. Quanto ao solo sem calagem, o pH de cultivo não afetou nenhuma das estirpes. As estirpes cultivadas em pH mais elevado, 6,9, ao serem inoculadas em solo ácido, apresentaram a mesma eficiência, para esta característica, que as estirpes cultivadas em pH ácido, 5,0, o que descarta a ocorrência de "acid habituation". Isso pode ser explicado pela facilidade de alteração do pH do meio pelas estirpes, em razão do baixo poder tampão do meio de cultivo e da alta concentração de células utilizadas (Barberi et al., 2004). Em campo, o poder tampão é maior e o número de células, menor.

No desdobramento da interação tripla para TNPA, houve significância apenas quanto à estirpe UFLA 04-195, que proporcionou maior TNPA quando cultivada nos valores de pH 5,0 e 6,0, no solo com calagem e sem calagem (Tabela 2). Em relação ao parâmetro ANPA, a interação tripla foi significativa nas estirpes CIAT 899, UFLA 02-100 e UFLA 04-195. Em solo com calagem, a estirpe CIAT 899 possibilitou maior ANPA ao ser cultivada em pH 5,0 ou 6,0, e a estirpe UFLA 02-100 em pH 5,0. Em solo sem calagem, a estirpe UFLA 04-195 foi menos eficaz no pH 5,0. De acordo com Ferreira (2008b), esta é a condição de pH do meio de cultura 79 em que esta estirpe apresenta melhor crescimento.

**Tabela 1.** Média dos valores de número de nódulos por vaso (NN), massas de matéria seca de nódulos (MSN) e de parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER), teor (TNPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) avaliadas em casa de vegetação, de acordo com as estirpes ou com o uso ou não de calagem<sup>(1)</sup>.

Calagem	NN	MSN ------(g por vaso)-----	MSPA	ANPA (mg por vaso)	ER ------(%)-----	TNPA
Estirpes						
CIAT 899	840a	0,317a	3,73a	55,7a	39,1a	1,48b
UFLA 04-195	808a	0,341a	3,66a	63,7a	38,7a	1,73a
UFLA 04-202	856a	0,343a	3,94a	62,4a	41,7a	1,58a
UFLA 02-100	675a	0,354a	3,69a	61,1a	38,9a	1,64a
UFLA 02-68	544b	0,270a	3,63a	57,2a	38,8a	1,59a
Calagem						
Com	885a	0,372a	4,11a	70,5a	33,0b	1,72a
Sem	605b	0,278b	3,35b	49,7b	46,0a	1,49b

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O desdobramento da interação tripla sobre a ER mostrou que, na presença de calagem, não houve diferenças entre os valores de pH de cultivo, para nenhuma das estirpes (Tabela 2). Sem calagem, as estirpes CIAT 899 e UFLA 04-202, cultivadas em pH 5,0 ou 6,0, possibilitaram maior eficiência relativa no feijoeiro-comum, enquanto a estirpe UFLA 04-195 se destacou quando cultivada em pH 6,0 ou 6,9.

Os contrastes com inoculação e os com N mineral, com e sem calagem, foram significativos para todas as variáveis analisadas. Na Tabela 3, verifica-se que, tanto no solo com calagem como no sem calagem, os tratamentos com inoculação apresentaram maior NN e MSN que as testemunhas que receberam N mineral. Quanto às outras variáveis analisadas, as testemunhas que receberam N mineral superaram os tratamentos com inoculação. Nas testemunhas sem N mineral, as variáveis analisadas não diferiram dos tratamentos com inoculação, o que mostra a capacidade das populações nativas de BFNN em nodular e promover o crescimento vegetal no feijoeiro-comum.

No experimento no campo, não houve efeito significativo de estirpes nem do pH de cultivo nas características NN, MSN, MSPA, ER, TNPA e ANPA. A interação pH e estirpe, no entanto, foi significativa: a estirpe UFLA 02-68 apresentou maior NN, MSPA, ER e ANPA quando o cultivo no inoculante foi realizado

em pH 5,0 e 6,0 (Tabela 4). A MSN foi maior quando a estirpe foi cultivada em pH 6,0, e o TNPA foi maior com o cultivo em pH 5,0 ou 6,9. Para a estirpe CIAT 899, houve apenas significância quanto ao parâmetro TNPA, com maiores valores em pH 5,0 e 6,0. Para as demais estirpes, não houve diferenças significativas dos parâmetros avaliados entre os valores de pH do meio.

Em relação aos parâmetros de produtividade avaliados e ao teor e ao acúmulo de N nos grãos, não houve diferença significativa entre estirpes, nem entre as diferentes condições de cultivo das estirpes. Não houve diferença significativa quanto à interação entre esses dois parâmetros, exceto no caso da massa de 100 grãos (Tabela 4), em que a estirpe UFLA 02-100 proporcionou maior valor quando cultivada no pH 6,0 e as outras estirpes não diferiram.

O contraste dos tratamentos com inoculação e com N mineral, com exceção dos parâmetros TNPA e massa de 100 grãos, não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos com inoculação e a testemunha que recebeu N mineral (CN). O TNPA e a massa de 100 grãos foram superiores na testemunha que recebeu N mineral (Tabela 5). Entre os tratamentos com inoculação e a testemunha sem N mineral (SN), também não houve diferença. Todos os tratamentos apresentaram teores de nitrogênio na parte aérea acima

**Tabela 2.** Média dos valores de massa de matéria seca (MSPA), teor (TNPA) e acúmulo (ANPA) de nitrogênio na parte aérea, e de eficiência relativa da nodulação (ER), em feijoeiro-comum, com e sem calagem, em presença de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio cultivadas em diferentes condições de pH, em casa de vegetação<sup>(1)</sup>.

pH do meio de cultivo	CIAT 899		UFLA 04-195		UFLA 04-202		UFLA 02-100		UFLA 02-68	
	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com	sem
MSPA (g por vaso)										
pH 5,0	4,72a	3,75a	4,18a	2,70a	4,03a	3,74a	4,66a	3,60a	3,24b	3,07a
pH 6,0	4,15a	3,31a	3,52a	3,45a	4,56a	3,83a	4,31a	3,22a	3,78a	3,42a
pH 6,9	3,67a	2,78a	4,37a	3,76a	4,51a	2,94a	3,44b	2,94a	4,52a	3,73a
TNPA (%)										
pH 5,0	1,74a	1,40a	2,14a	1,43a	1,66a	1,22a	1,89a	1,68a	1,68a	1,61a
pH 6,0	1,51a	1,35a	2,07a	1,81a	1,84a	1,41a	1,51a	1,56a	1,46a	1,53a
pH 6,9	1,43a	1,46a	1,61b	1,30b	1,81a	1,56a	1,86a	1,36a	1,63a	1,61a
ANPA (mg por vaso)										
pH 5,0	82,2a	53,0a	89,2a	38,3b	64,5a	45,8a	87,7a	60,9a	53,6a	49,2a
pH 6,0	62,3a	44,4a	72,6a	62,4a	83,1a	53,8a	63,9b	51,0a	55,0a	51,7a
pH 6,9	52,4b	40,4a	71,4a	48,8a	81,9a	45,7a	64,1b	39,7a	73,9a	60,5a
ER (%)										
pH 5,0	37,8a	50,5a	33,0a	37,3b	32,0a	52,8a	37,0a	49,3a	25,8a	42,0a
pH 6,0	33,3a	45,3a	28,5a	47,5a	36,8a	52,5a	34,8a	45,0a	30,3a	47,3a
pH 6,9	29,8a	38,0b	35,5a	50,5a	36,5a	39,8b	27,8a	39,5a	36,3a	51,5a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

do nível crítico que, segundo Ambrosano et al. (1996), é de 3% no período do florescimento. Isso indica que as estirpes usadas e as populações nativas foram eficientes para atender parte da demanda da planta por nitrogênio durante o seu ciclo, e mostra a importância da fixação biológica de nitrogênio para a cultura do feijoeiro-comum. As estirpes selecionadas e a estirpe CIAT 899 proporcionaram rendimento de grãos que

não diferiram significativamente da testemunha com N na dose total de 70 kg ha<sup>-1</sup> e da que não recebeu N mineral.

A falta de resposta à inoculação para os diferentes tratamentos pode estar relacionada às condições climáticas no período do experimento. O principal fator que pode ter afetado a planta, a BFNN e, conseqüentemente, a simbiose foi a precipitação

**Tabela 3.** Média dos valores de número de nódulos (NN), massa de matéria seca de nódulos (MSN) e de parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER), teor (TNPA) e acúmulo (ANPA) de nitrogênio na parte aérea, em feijoeiro-comum em presença de contrastes entre os tratamentos que receberam inoculação com estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio e as testemunhas com (inoculado vs. com N) e sem N mineral (inoculado vs. sem N), em solos com e sem calagem, em casa de vegetação.

Tratamento	NN	MSN	MSPA	ANPA	ER	TNPA
		------( g por vaso) -----	-----	(mg por vaso)	-----	(%) -----
Sem calagem						
Inoculados	605	0,278	3,35	49,7	45,90	1,48
Sem nitrogênio	480 <sup>ns</sup>	0,269 <sup>ns</sup>	3,27 <sup>ns</sup>	44,8 <sup>ns</sup>	45,00 <sup>ns</sup>	1,38 <sup>ns</sup>
Com nitrogênio	0*	0,000*	7,50*	245,0*	100,00*	3,34*
Com calagem						
Inoculados	885	0,372	4,11	70,5	33,00	1,48
Sem nitrogênio	903 <sup>ns</sup>	0,464 <sup>ns</sup>	4,15 <sup>ns</sup>	63,6 <sup>ns</sup>	33,25 <sup>ns</sup>	1,53 <sup>ns</sup>
Com nitrogênio	190*	0,063*	12,62*	302,1*	100,00*	2,40*

<sup>ns</sup>Não significativo. \*Diferença significativa a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, entre os tratamentos que receberam inoculação e as testemunhas com ou sem adição de N mineral.

**Tabela 4.** Média dos valores de número de nódulos por vaso (NN), massa de matéria seca de nódulos (MSN) e de parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER), teor (TNPA) e acúmulo (ANPA) de nitrogênio na parte aérea, número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de 100 grãos (M100), rendimento, teor (TNG) e acúmulo (ANG) de N nos grãos em função da inoculação com as estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio, cultivadas em diferentes condições de pH, em campo<sup>(1)</sup>.

pH do meio	NN	MSN	MSPA	ANPA	ER	TNPA	NVP	NGV	ANG	M100 (g)	Rendimento (kg ha <sup>-1</sup> )	TNG (%)
		(g por planta)	(mg por planta)	-----	(%)-----	(mg por planta)						
UFLA 02-100												
5,0	76a	0,048a	6,58a	229,5a	107a	3,55a	10,7a	4,8a	45,78a	19,73b	1.306a	3,51a
6,0	65a	0,043a	6,55a	252,0a	107a	3,84a	9,9a	4,6a	52,75a	22,69a	1.464a	3,59a
6,9	42a	0,025a	5,42a	195,7a	89a	3,63a	10,5a	4,6a	45,29a	20,08b	1.192a	3,77a
UFLA 02-68												
5,0	42a	0,030b	6,62a	269,8a	105a	4,07a	10,2a	4,7a	40,46a	20,57a	1.091a	3,72a
6,0	125a	0,103a	8,14a	282,1a	134a	3,44b	11,3a	4,4a	49,92a	21,89a	1.386a	3,59a
6,9	33b	0,028b	3,71b	145,2b	61b	3,89a	8,8a	4,5a	37,40a	20,56a	1.041a	3,62a
UFLA 04-202												
5,0	78a	0,075a	6,11a	235,3a	99a	3,91a	9,9a	4,8a	41,98a	20,75a	1.171a	3,51a
6,0	50a	0,038a	4,95a	185,1a	81a	3,73a	9,5a	4,8a	51,52a	20,65a	1.382a	3,72a
6,9	105a	0,048a	6,22a	231,9a	105a	3,63a	11,7a	4,5a	55,06a	21,14a	1.529a	3,61a
UFLA 04-195												
5,0	24a	0,025a	4,85a	169,0a	81a	3,57a	11,0a	4,6a	44,70a	20,42a	1.246a	3,56a
6,0	54a	0,048a	5,17a	195,4a	82a	3,78a	11,4a	4,7a	53,53a	20,52a	1.391a	3,87a
6,9	30a	0,025a	6,75a	257,1a	107a	3,78a	11,3a	4,7a	51,43a	21,29a	1.395a	3,69a
CIAT 899												
5,0	55a	0,038a	6,08a	212,7a	99a	3,49a	9,6a	4,5a	44,53a	21,29a	1.233a	3,64a
6,0	28a	0,023a	5,42a	214,4a	90a	4,02a	10,8a	4,6a	50,85a	21,28a	1.374a	3,69a
6,9	53a	0,043a	5,93a	205,7a	98a	3,44b	9,4a	4,7a	48,25a	20,91a	1.324a	3,56a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, para cada estirpe, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

**Tabela 5.** Média dos valores de número de nódulos (NN), massa de matéria seca de nódulos (MSN) e de parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER %), teor (TNPA) e acúmulo (ANPA) de nitrogênio na parte aérea, número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de 100 grãos ( $M_{100}$ ), rendimento, teor (TNG) e acúmulo (ANG) de N nos grãos de feijoeiro-comum em presença de contrastes entre tratamentos que receberam inoculação com estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio e os tratamentos com (inoculado vs. com N) e sem nitrogênio mineral (inoculado vs. sem N), em condições de campo.

pH do meio	NN	MSN ---- (g por planta) ---	MSPA --- (mg por planta)	ANPA (mg por planta)	ER -----(%)-	TNPA	NVP	NGV	$M_{100}$ (g)	ANG (mg por planta)	Rendimento kg ha <sup>-1</sup>	TNG (g)
Inoculados	57	0,042	5,90	218,72	96	3,72	10,4	4,6	20,917	47,56	1.302	3,64
Sem nitrogênio	70 <sup>ns</sup>	0,048 <sup>ns</sup>	5,72 <sup>ns</sup>	232,61 <sup>ns</sup>	93 <sup>ns</sup>	4,05 <sup>ns</sup>	10,7 <sup>ns</sup>	4,7 <sup>ns</sup>	21,513 <sup>ns</sup>	60,07 <sup>ns</sup>	1.579 <sup>ns</sup>	3,81 <sup>ns</sup>
Com nitrogênio	16 <sup>ns</sup>	0,005 <sup>ns</sup>	6,23 <sup>ns</sup>	279,61 <sup>ns</sup>	100 <sup>ns</sup>	4,49*	10,0 <sup>ns</sup>	4,7 <sup>ns</sup>	22,695*	46,90 <sup>ns</sup>	1.243 <sup>ns</sup>	3,79 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup>Não significativo. \*Diferença significativa a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, entre os tratamentos que receberam inoculação e as testemunhas com ou sem adição de N mineral.

pluvial. A média de precipitação no período do experimento foi de apenas 180 mm, muito baixa em relação ao ideal para a cultura do feijoeiro-comum, que se situa entre 300 e 400 mm (Andrade et al., 2008). Durante a formação de vagens e enchimento dos grãos, fases mais críticas para o feijoeiro-comum em relação à deficiência hídrica, choveu apenas 12 mm. A falta de chuva pode ter afetado também a disponibilidade do N mineral aplicado nas parcelas que receberam este fertilizante, e pode ter contribuído para seu pequeno desenvolvimento, já que não se destacaram em comparação aos outros tratamentos. Vargas et al. (1991) avaliaram a capacidade nodulante de genótipos de feijão e não obtiveram diferenças significativas entre os tratamentos com e sem N mineral e os tratamentos com inoculação, os quais também foram afetados por uma estiagem prolongada. Apesar da falta de chuva, o rendimento médio de grãos do experimento (Tabela 5) foi muito superior à média nacional, que, na última safra da seca, foi de 728 kg ha<sup>-1</sup> (Companhia Nacional de Abastecimento, 2010).

Em relação à estirpe UFLA 02-100, os resultados deste estudo se assemelham aos obtidos por Soares et al. (2006) em Perdões, MG, pois a produtividade obtida foi semelhante à da estirpe referência CIAT 899 e à da testemunha que recebeu N mineral. A estirpe UFLA 02-68 não se mostrou tão eficiente no trabalho de Soares et al. (2006), ao se igualar aos outros tratamentos. Os autores obtiveram produtividades inferiores às encontradas neste trabalho.

No trabalho de Ferreira et al. (2009), em Lavras, MG, a estirpe UFLA 02-100 foi equivalente em rendimento de grãos à CIAT 899 e à testemunha sem N mineral; já a estirpe UFLA 02-68 foi semelhante à testemunha adubada com N mineral. As produtividades obtidas por esses autores foram semelhantes às do presente trabalho.

A densidade média de BFNN nativas, obtida com uso do feijoeiro-comum como planta-isca, foi de 10<sup>4</sup> UFC por g de solo. Essa densidade média situa-se na faixa encontrada em outros trabalhos (Pereira et al., 2000; Soares et al., 2006).

## Conclusões

1. O aumento do pH do solo favorece a simbiose entre as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas e o feijoeiro-comum.
2. O valor de pH ideal para produção de inoculante varia com as estirpes utilizadas.
3. As estirpes testadas e as populações nativas de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas são eficientes em fornecer nitrogênio para a cultura do feijoeiro-comum.

## Agradecimentos

Ao Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento do projeto e pela concessão de bolsas aos autores.

## Referências

- ABREU, A. de F.B.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; CARNEIRO, J.E. de S.; DEL PELOSO, M.J.; PAULA JÚNIOR, T.J. de; FARIA, L.C. de; MELO, L.C.; BARROS, E.G. de; MOREIRA, M.A.; PEREIRA FILHO, I.A.; MARTINS, M.; RAVA, C.A.; COSTA, J.G.C. da. BRSMG Majestoso: another common bean cultivar of carioca grain type for the state of Minas Gerais. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.7, p.403-405, 2007.
- ALI, S.F.; RAWAT, L.S.; MEGHVANSI, M.K.; MAHNA, S.K. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v.4, p.13-18, 2009.
- AMBROSANO, E.J.; TANAKA, R.T.; MASCARENHAS, H.A.A.; RAIJ, B. van; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H. Leguminosas

- e oleaginosas. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: IAC, 1996. p.187-199.
- ANDRADE, M.J.B.; CARVALHO, A.J.; VIEIRA, N.M.B. Exigências edafoclimáticas. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2.ed. atual. Viçosa: UFV, 2008. p.67-86.
- BARBERI, A.; MOREIRA, F.M.S.; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.397-405. 2004.
- CAMPANHARO, M.; LIMA JUNIOR, M.A.; NASCIMENTO, C.W.A.; STAMFORD, N.P.; FREIRE, F.J.; COSTA, J.V.T. Acidez do solo na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro comum. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, p.285-290, 2010.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos: safra 2009/2010: quarto levantamento: janeiro 2010**. Brasília: Conab, 2010. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos\\_09.12.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_09.12.pdf)>. Acesso em: 20 jul. 2010.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.) **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.375-470.
- DILWORTH, M.J.; RYNEF, G.; CASTELLI, J.M., VIVAS-MARFISI, A.I.; GLENN, A.R. Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. **Microbiology**, v.45, p.1585-1593, 1999.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008a.
- FERREIRA, P.A.A. **Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio em feijoeiro e sua tolerância a acidez e alumínio "in vitro"**. 2008b. 50p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- FERREIRA, P.A.A.; SILVA, M.A.P.; CASSETARI, A.; RUFINI, M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. **Ciência Rural**, v.39, p.2210-2212, 2009.
- GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.; FERREY, M.L.; CONROY, M.J.; HAMMER, B.E.; MARTINEZ, E.; NAARONS, S.R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.198-207, 1994.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (California Agricultural Experiment Station. Circular, 347).
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. p.187-294.
- LIMA, A.S.; NÓBREGA, R.S.A.; BARBERI, A.; SILVA, K. da; FERREIRA, D.F.; MOREIRA, F.M.S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v.20, p.1-19, 2009.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1989. 201p.
- MOREIRA, F.M.S. Fixação biológica de nitrogênio em espécies arbóreas. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismo de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.121-150.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: Ufla, 2006. 729p.
- PEREIRA, E.G.; LACERDA, A.M.; LIMA, A.S.; MOREIRA, F.M.S.; CARVALHO, D.; SIQUEIRA, J.O. Genotypic, phenotypic and symbiotic diversity among rhizobia isolates from *Phaseolus vulgaris* L. growing in the Amazon region. In: TROPICAL SOIL BIOLOGY AND FERTILITY PROGRAMME. **The Biology and fertility of tropical soils: TSBF report, 1997-1998**. Nairobi: TSBF, 2000. p.86-87.
- RAZA, S.; JORNSGARD, B.; ABOU-TALEB, H.; CHRISTIANSEN, J.L. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. **The Society for Applied Microbiology**, Letters in Applied Microbiology, v.32, p.379-383, 2001.
- RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ V., V.H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5a aproximação**. Viçosa: CFSEMG, 1999. p.306-307.
- RODRIGUES, C.S.; LARANJO, M.; OLIVEIRA, S. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. **Current Microbiology**, v.53, p.1-7, 2006.
- ROSOLEM, C.A.; MARUBAYASHI, O.M. Seja o doutor do seu feijoeiro. **Informações Agrônomicas**, n.68, p.1-16, 1994. Encarte.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: USP, 1979. 27p.
- SOARES, A.L.L.; FERREIRA, P.A.A.; PEREIRA, J.P.A.R.; VALE, H.M.M. do; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B. de; MOREIRA, F.M.S. Eficiência Agrônômica de Rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões, MG. II-Feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.803-811, 2006.
- VARGAS, A.A.T.; SILVEIRA, J.S.M.; ATHAYDE, J.T.; ATHAYDE, A.; PACOVA, B.E.V. Comparação entre genótipos de feijão quanto à capacidade nodulante e à produtividade com inoculação com rizóbios e/ou adubação de N-mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.15, p.267-272, 1991.