

# Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi

Aloisio Freitas Chagas Junior<sup>1\*</sup>, Luiz Antonio de Oliveira<sup>2</sup> e Arlem Nascimento de Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fundação Universidade Federal do Tocantins, Cx. Postal 66, 77402-970, Gurupi, Tocantins, Brasil. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazônia, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: chagasjraf@uft.edu.br

**RESUMO.** A fixação biológica do nitrogênio é de fundamental importância na sustentabilidade agrícola, e a caracterização fenotípica rizobial contribui para o conhecimento da sua diversidade em coleções e para a utilização posterior em sistemas agrícolas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica de rizóbio isolados de solos da Amazônia e suas eficiências simbióticas quando inoculados em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Os isolados nativos apresentaram diversidade quanto às características morfológicas e fisiológicas. Foi verificado que a inoculação com isolados de rizóbio nativos contribuiu, de forma significativa, para o aumento da biomassa, nodulação de caupi e em eficiência simbiótica.

**Palavras-chave:** diversidade fenotípica, fixação de nitrogênio, *Vigna unguiculata*.

**ABSTRACT.** Phenotypic characterization of rhizobia strains isolated from Amazonian soils and symbiotic efficiency in cowpea. Biological nitrogen fixation is of fundamental importance for agricultural sustainability, and the evaluation of the rhizobial diversity contributes to the knowledge of their diversity in collections, as well as for later use in agricultural systems. The objective of this paper was to evaluate phenotype diversity and symbiotic efficiency of rhizobia isolates from Amazonian soils when inoculated on cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). The native isolates presented diversity regarding their morphologic and physiological characteristics. It was verified that the inoculation with isolates of native rhizobia contributed to the increase of the biomass, nodulation on cowpea and symbiotic efficiency.

**Key words:** phenotype diversity, nitrogen fixation, *Vigna unguiculata*.

## Introdução

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) é importante na substituição da adubação nitrogenada em diversas partes do mundo (KYEI-BOAHEN et al., 2002; SANGINGA, 2003), bem como na Amazônia (HARA; OLIVEIRA, 2005). Um melhor entendimento da associação rizóbio-leguminosa nas condições ácidas e de baixa fertilidade dos solos da Amazônia pode prover uma contribuição efetiva no balanço de nitrogênio tanto no solo como nas plantas. Assim, torna-se importante o emprego dessa biotecnologia de baixo custo para leguminosas, especialmente aquelas de subsistência cultivadas por pequenos agricultores, como o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Devido sua ampla variabilidade genética, tolerância às condições edafoclimáticas desfavoráveis, fixação de N<sub>2</sub>, alto potencial produtivo, além do excelente valor nutritivo, o feijão caupi é uma espécie de grande valor genético estratégico (MARTINS et al., 2003). O Amazonas possui grandes áreas de cultivo,

tanto na várzea como na terra firme, adequadas ao cultivo do feijão caupi. É uma leguminosa de grande importância na alimentação humana, sendo uma cultura estritamente relacionada às atividades de subsistência no Estado, e de significativa relevância sócio-econômica para a região (DIAS et al., 2002).

Nos últimos anos, a diversidade microbiana vem sendo determinada principalmente pelo uso de técnicas moleculares. Entretanto, a avaliação das características culturais é o primeiro passo na identificação de novos grupos taxonômicos de microrganismos. Atualmente, busca-se uma taxonomia polifásica e as características culturais fazem parte dos caracteres utilizados para essa classificação. Essas características podem indicar diferenças morfológicas e fisiológicas importantes entre microrganismos, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais avançados.

Os princípios básicos que devem orientar a seleção de estirpes de rizóbio com propósito prático de inoculação em leguminosas têm sido objeto de

muitos estudos (HARA; OLIVEIRA, 2005; ZAMAN-ALLAH et al., 2007). A seleção deve objetivar estirpes eficientes e adaptadas às condições prevalentes no local de emprego, como os solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. Além disso, devem ser competitivas frente à população nativa e apresentarem vários aspectos agronômicos e culturais, tais como potencial de nodulação, fixação de  $N_2$  e crescimento da planta hospedeira (LIMA et al., 2005; ZILLI et al., 2006), além das características fisiológicas como a capacidade de solubilização de fosfatos e a produção de fitormônios como ácido indol-acético (THAKURIA et al., 2004).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente 26 isolados de rizóbio, bem como avaliar a eficiência simbiótica dos mesmos em plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.).

### Material e métodos

Foram utilizados 20 isolados obtidos da Coleção de Rizóbio do Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Essas bactérias foram previamente isoladas de solos de terra firme e várzea da região, usando o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) como planta isca (XAVIER et al., 1997). Outras seis estirpes-referência foram obtidas da Coleção de Cultura da Embrapa Agrobiologia (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro): *B. elkanii* (BR 115 = USDA 76), *B. japonicum* (BR 114 – USDA 06), *Sinorhizobium fredii* (BR 112 = LMG 6217), *R. tropici* IIA (BR 10016 = CFN 299), *R. etli* (BR 10026 = CFN 42) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (BR 10052 = LMG 8819).

### Caracterização fenotípica

As características fenotípicas estudadas foram às morfológicas e fisiológicas. As características morfológicas avaliadas para os isolados nativos e as estirpes-referência foram: tempo de crescimento (1 a 8 dias); diâmetro, forma, elevação, borda, transparência, aparência e coloração da colônia; modificação do pH do meio; aparência, elasticidade e tipo de muco (HUNGRIA et al., 2001).

Quanto às fisiológicas, foram realizados testes de tolerância à acidez e ao alumínio tóxico, capacidade de solubilização de fosfatos e síntese de ácido indol acético (AIA). Para os testes de tolerância à acidez e ao alumínio tóxico foram utilizados os meios YMA com pH 4,5, pH 4,5 + 2,0 cmol<sub>c</sub> de Al L<sup>-1</sup> e pH 6,5 (controle), com quatro repetições; as avaliações foram feitas a cada três dias durante o período de 15 dias. De acordo com o crescimento celular, foram dados valores para cada isolado e estirpe-referência,

os quais variaram de 1 (sem crescimento visível após riscagem) a 4 (máximo crescimento), com valores intermediários entre os extremos, determinando o grau de tolerância das bactérias (OLIVEIRA; MAGALHÃES, 1999).

Quanto ao teste de solubilização de fosfatos, foram utilizados dois meios específicos, sendo o meio GL para solubilizadoras de fosfato de cálcio (P-Ca), ajustando-se o pH para 6,5 (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982), e outro meio, GL modificado, para verificar a solubilização de fosfato de alumínio (P-Al), com pH ajustado para 4,5 (HARA; OLIVEIRA, 2005). As bactérias foram repicadas para cada meio de solubilização, estabelecendo-se cinco colônias por placa com duas placas por isolado. As avaliações foram feitas num período de 15 dias, cujas medidas dos diâmetros do halo de solubilização e da colônia foram mensuradas a cada três dias, utilizando-se paquímetro digital. A partir dessas medidas foram obtidos os índices de solubilização (IS), em mm, usando a fórmula: IS = diâmetro do halo (mm) / diâmetro da colônia (mm). Com base nesses índices, as bactérias foram classificadas como estirpes com baixa (IS < 2), média (2 ≤ IS < 4) e alta solubilização (IS > 4) (HARA; OLIVEIRA, 2005).

Para os testes de síntese de AIA pelas bactérias, colônias de 2-3 mm de diâmetro foram transferidas para frascos de Erlenmeyer (150 mL) contendo 25 mL de meio de cultura YM (meio líquido) na ausência e presença de triptofano (0 e 150 mg L<sup>-1</sup>). Depois de quatro dias de crescimento sobre um agitador rotatório (100 rpm) a 26 ± 2°C, a biomassa bacteriana foi separada por centrifugação (12.000 rpm por 15 min.). Para as análises colorimétricas de AIA no sobrenadante (GORDON; WEBER, 1951) foram utilizadas uma parte do reagente de Salkowski [(FeCl<sub>3</sub> 0,5 M + HClO<sub>4</sub> (35%)] e duas partes do sobrenadante bacteriano. Após a comprovação qualitativa de AIA no sobrenadante (coloração rosa após 25 min. de reação a 26 ± 2°C), o fitormônio foi quantificado em espectrofotômetro a 530 nm. As concentrações, em µg mL<sup>-1</sup>, foram calculadas a partir de uma curva padrão construída com AIA.

Os dados fenotípicos obtidos foram transformados em um código binário, de 0 e 1, e submetidos à análise de agrupamento. Um total de 24 parâmetros foi considerado, sendo 12 para as características morfológicas e 12 para as fisiológicas. Para as características morfológicas foram determinados os seguintes parâmetros: tempo de crescimento (≤ 3 dias, 0; > 3 dias, 1); pH do meio (alcalinizou, 0; acidificou, 1); diâmetro (≤ 2 mm, 0; > 2 mm, 1), forma (circular, 0; irregular, 1), elevação (elevada, 0; plana, 1), borda (inteira, 0;

irregular, 1), transparência (sim, 0; não, 1), aparência (homogênea, 0; heterogênea, 1) e cor da colônia (branca, 0; amarela, 1); aparência (homogênea, 0; heterogênea, 1), elasticidade (com, 0; sem, 1) e tipo de muco (viscoso, 0; butírico, 1). Para as características fisiológicas foram utilizadas: tolerância à acidez, divididas em dois níveis, pH 4,5 e pH 6,5 (não, 0; sim, 1), tolerância à acidez e ao Al (não, 0; sim, 1); índice de solubilização de P-Ca e P-Al, divididos em três níveis,  $IS < 2$ ,  $2 < IS < 4$  e  $IS > 4$  (não, 0; sim, 1); produção de AIA, dividido em três níveis,  $\leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $> 100 < 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e  $\geq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (não, 0; sim, 1).

Foram construídos três dendrogramas de agrupamento com base nas características avaliadas, sendo um para morfológicas, um para fisiológicas e um considerando ambas as características. Foi utilizado o algoritmo UPGMA e a matriz de similaridade com coeficiente Simple Matching, utilizando o programa MVSP (Multi-Variate Statistical Package versão 3.13).

#### Eficiência simbiótica

Para as avaliações de inoculação, os isolados foram testados em vasos plásticos com capacidade para 1 kg em casa-de-vegetação no INPA, com solo coletado no Ramal do Brasileirinho, Manaus, Estado do Amazonas, tendo, por kg de solo, as seguintes concentrações de macro e micronutrientes: 3,0 mg de P; 0,12 cmol<sub>c</sub> de K; 0,12 cmol<sub>c</sub> de Ca; 0,06 cmol<sub>c</sub> de Mg; 2,5 cmol<sub>c</sub> de Al + H; 124 mg de Fe; 2,7 mg de Zn; 0,8 mg de Mn; pH 4,1 em H<sub>2</sub>O e pH 3,7 em KCl.

O solo corrigido (fertilidade e acidez) foi comparado com o controle (fertilidade e acidez originais), a fim de avaliar o potencial da simbiose planta-bactéria. O solo foi adubado com superfosfato triplo (100 kg P ha<sup>-1</sup>), KCl (80 kg K ha<sup>-1</sup>) e sulfatos de cálcio (5 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>) e magnésio (3 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso com 28 tratamentos e quatro repetições, constituídos pela inoculação individual dos 20 isolados nativos e das seis estirpes-referência mais dois controles (adubação com N sem inoculação e testemunha sem N e sem inoculação). As plantas foram colhidas em plena floração (45 dias após o plantio), determinando posteriormente a produção de matéria seca da parte aérea, radicular e total, número e peso dos nódulos. Foi feita ainda a avaliação do estado nutricional das plantas, determinando-se os teores de N na parte aérea (EMBRAPA, 1997). O N acumulado (ANPA) na matéria seca da parte aérea (MSPA) foi calculado, multiplicando o peso pelo teor de N.

A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada segundo a fórmula:  $ER = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ com N}) \times 100$ , em que MSPA inoculada é a matéria seca da parte aérea da planta com inoculação e MSPA com N é a matéria seca da parte aérea da planta com N mineral (LIMA et al., 2005). A eficiência simbiótica foi calculada por meio da fórmula:  $ES = [(N_{\text{total fixado}} - N_{\text{total TS/N}}) / (N_{\text{total TC/N}} - N_{\text{total TS/N}}) \times 100]$ , em que  $N_{\text{total fixado}}$  = Nitrogênio total do tratamento;  $N_{\text{total TS/N}}$  = Nitrogênio total da testemunha sem nitrogênio;  $N_{\text{total TC/N}}$  = Nitrogênio total da testemunha nitrogenada. O nitrogênio foi aplicado na forma de uréia (100 kg ha<sup>-1</sup>) em 3 parcelas, a cada 15 dias. Foi utilizado como planta teste o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) cv. IPEAN V-69. Os isolados utilizados, após crescimento em meio YMA por cinco dias, foram suspensos individualmente em solução salina (0,2% MgSO<sub>4</sub>) e cada uma dessas suspensões (de 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>) foi adicionada às sementes. Foram semeadas 10 sementes por vaso e após uma semana foi realizado o desbaste deixando três plantas por vaso.

Foi determinada a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) nas raízes de plantas em estudo, usando metodologias descritas por Kormanick et al. (1980) e Schenck (1982). Não houve inoculação com FMAs, levando-se em consideração que no solo utilizado já existiam esses fungos. Os dados foram submetidos à análise de variância e a médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa STATISTICA 6.0.

## Resultados e discussão

### Caracterização fenotípica

Considerando os parâmetros morfológicos (Tabela 1), dos 20 isolados nativos estudados, 14 exibiram crescimento rápido e 19 acidificaram o meio de crescimento. Doze isolados formaram colônias  $\leq 2$  mm de diâmetro, e 17 com coloração branca. Quanto à forma, borda, elevação, transparência e aparência da colônia, todas as bactérias apresentaram forma circular e borda inteira, 14 com colônia elevada e seis plana, doze com colônia transparente e oito não transparente, 17 com colônia homogênea e três heterogênea. Quanto ao tipo de muco, 17 com aparência do muco homogênea e três heterogênea, 15 sem elasticidade do muco e cinco com elasticidade, 18 foram caracterizados como viscoso e dois como butírico (Tabela 1).

Com base nas características morfológicas dos isolados nativos e das estirpes-referência (Tabela 1) foi possível agrupá-los em cinco grupos (Figura 1). O grupo 1 foi formado por isolados nativos e a

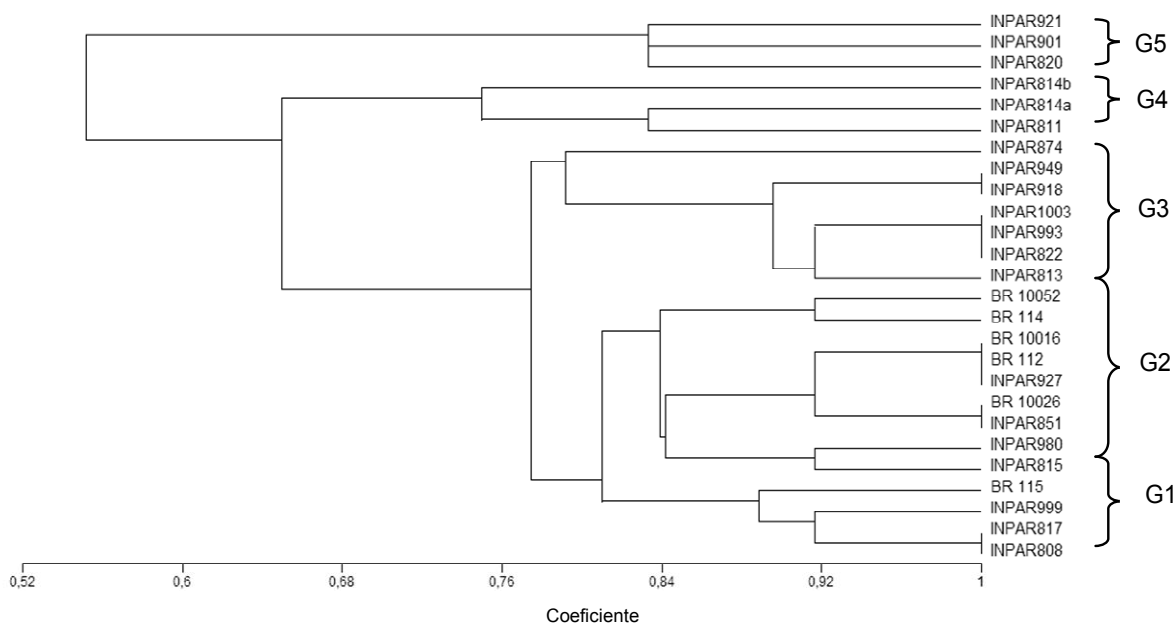
estirpe-referência BR 115 (*Bradyrhizobium elkanii*), com similaridade de 89%. O grupo 2 apresentou similaridade de 84% entre os isolados e as estirpes-referência BR 10026 (*Rhizobium etli*), BR 112 (*Sinorhizobium fredii*), BR 10016 (*R. tropici*), BR 114 (*B. japonicum*) e BR 10052 (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*). Os grupos 3, 4 e 5 mostraram índices de

similaridade de 78, 75 e 83%, respectivamente, não se agrupando com nenhuma estirpe-referência. Para as 12 características morfológicas estudadas foi possível observar índice de similaridade de 100% entre o isolado INPA R851 e BR 10026, e o INPA R927 e as estirpes referência BR 10016 e BR 112, encontrados no grupo 2.

**Tabela 1.** Características morfológicas dos isolados de rizóbio que nodulam caupi.

Isolados/Estirpes <sup>1</sup>	Características dos isolados/estirpes <sup>2</sup>											
	TC	pH	DC	FC	EC	BC	Tr	AC	CC	AM	EM	TM
INPA R808	R	Ac	> 2	C	P	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
INPA R811	L	Al	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
INPA R813	R	Ac	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	CE	Vis
INPA R814a	R	Ac	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	CE	Vis
INPA R814b	R	Ac	≤ 2	C	E	I	S	Ho	A	Ho	CE	But
INPA R815	L	Ac	≤ 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis
INPA R817	R	Ac	≤ 2	C	P	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
INPA R820	R	Ac	≤ 2	C	P	I	S	He	A	He	SE	Vis
INPA R822	R	Ac	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
INPA R851	R	Ac	≤ 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	CE	Vis
INPA R874	L	Ac	> 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	CE	Vis
INPA R901	L	Ac	≤ 2	C	P	I	S	He	B	He	SE	Vis
INPA R918	R	Ac	> 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis
INPA R921	L	Ac	≤ 2	C	P	I	N	He	A	He	SE	Vis
INPA R927	R	Ac	≤ 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis
INPA R949	R	Ac	> 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis
INPA R980	L	Ac	≤ 2	C	P	I	N	Ho	B	Ho	SE	But
INPA R993	R	Ac	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
INPA R999	R	Ac	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
INPA R1003	R	Ac	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis
BR 115	L	Al	≤ 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	But
BR 114	L	Ac	≤ 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis
BR 112	R	Ac	> 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis
BR 10016	R	Ac	> 2	C	E	I	N	Ho	A	Ho	SE	Vis
BR 10026	R	Ac	> 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis
BR 10052	R	Ac	> 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis

<sup>1</sup>INPA R, isolados da coleção do INPA; BR, estirpes da coleção Embrapa Agrobiologia; <sup>2</sup>TC - 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); 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: butírico).



**Figura 1.** Dendrograma mostrando similaridade dos isolados estudados e das estirpes-referência, considerando 12 características morfológicas.

Com base na escala de valores para a avaliação do crescimento, foi observado que todos os isolados e estirpes-referência apresentaram um alto crescimento no meio com pH 6,5, apresentando o mesmo comportamento no pH 4,5, aos 15 dias de avaliação. No tratamento com pH 4,5 + Al, 20 das 26 bactérias estudadas apresentaram alto crescimento, o que permite inferir que são tolerantes à acidez e ao Al tóxico (Tabela 2). Para as bactérias que apresentaram baixo crescimento, foi observado que o alumínio foi mais limitante que a acidez. Resultados semelhantes foram reportados por Oliveira e Magalhães (1999) e Hara e Oliveira (2005), evidenciando variações na tolerância à acidez e ao alumínio tóxico por isolados de rizóbio.

Das 26 bactérias estudadas, doze solubilizaram P-Ca, sendo que apenas os isolados INPA R813 e INPA R820 apresentaram índice de solubilização médio (Tabela 2). Quanto à solubilização de P-Al, somente nove apresentou capacidade de solubilização, sendo que todos apresentaram baixo índice de solubilização (IS < 2,0). Todas as bactérias que solubilizaram P-Al também solubilizaram P-Ca, corroborando os resultados reportados por Hara e Oliveira (2005). Porém, Silva Filho e Vidor (2000) registraram baixa ocorrência de isolados que solubilizaram ambos os fosfatos.

Todos os isolados e as estirpes-referência

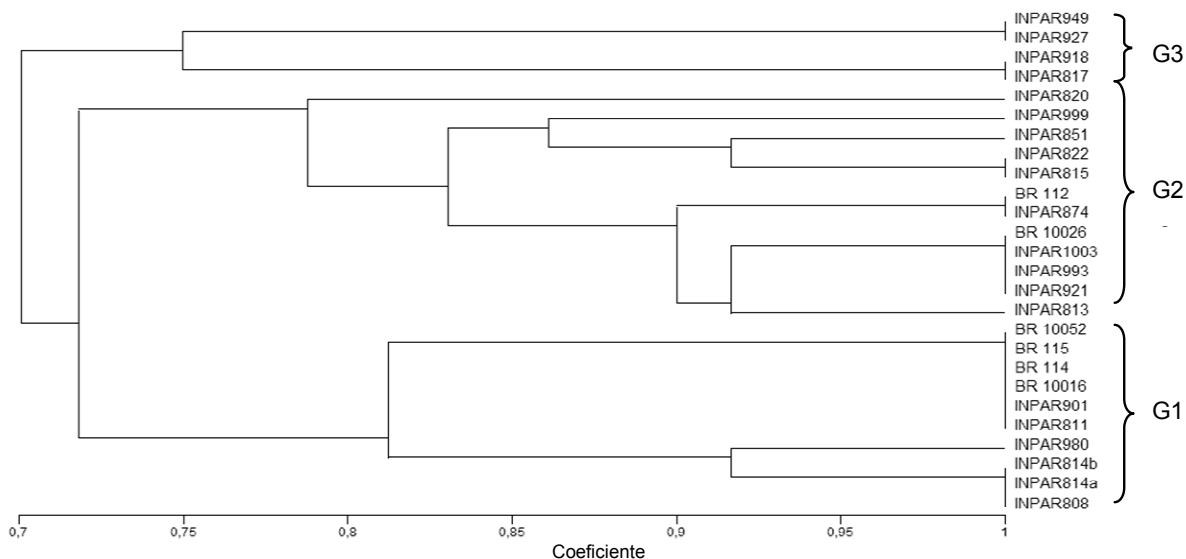
avaliados em meio de cultura suplementado com L-triptofano sintetizaram AIA, havendo grande variação nas concentrações produzidas. Quatro apresentaram produção de AIA acima de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 12 entre 100 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 10 abaixo de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Antoun et al. (1998) e Hameed et al. (2004) com isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em meio de cultura suplementado com L-triptofano. Num período de incubação de quatro dias em meio de cultura suplementado com 500  $\text{mg L}^{-1}$  de L-triptofano, Bano e Musarrat (2003) registraram níveis de AIA inferiores a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Quanto às características fisiológicas (Tabela 2), foram definidos três grupos (Figura 2). O grupo 1 apresentou similaridade entre os isolados e as estirpes-referência BR 10016, BR 114, BR 115 e BR 10052 de 81%, sendo que estas apresentaram 100% de similaridade com os isolados INPA R901 e INPA R811. O grupo 2 formado por isolados e as estirpes-referência BR 10026 e BR 112 apresentou similaridade de 78%, aproximadamente, encontrando-se similaridade de 100% entre o isolado INPA R874 e a estirpe-referência BR112, e os isolados INPA R1003, INPA R993 e INPA R921 e a estirpe-referência BR 10026. O grupo 3, com similaridade de 75%, não se agrupou com estirpes-referência.

**Tabela 2.** Tolerância à acidez e ao Al tóxico, solubilização de fosfatos e produção de AIA por isolados de rizóbio e estirpes-referência.

Isolados / Estirpes	Tolerância à acidez e ao Al <sup>(1)</sup>			Solubilização de fosfatos <sup>(2)</sup>		Produção de AIA <sup>(3)</sup>
	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	P-Ca	P-Al	
INPA R808	+	+	+	+	+	+
INPA R811	+	+	+	-	-	+
INPA R813	+	+	+	++	-	++
INPA R814a	+	+	+	+	+	+
INPA R814b	+	+	+	+	+	+
INPA R815	+	+	+	+	-	++
INPA R817	+	+	+	+	+	+++
INPA R820	+	+	+	++	+	++
INPA R822	+	+	+	+	-	++
INPA R851	+	+	+	+	+	++
INPA R874	+	-	+	-	-	++
INPA R901	+	+	+	-	-	+
INPA R918	+	+	+	+	+	+++
INPA R921	+	+	+	-	-	++
INPA R927	+	-	+	-	-	+++
INPA R949	+	-	+	-	-	+++
INPA R980	+	-	+	+	+	+
INPA R993	+	+	+	-	-	++
INPA R999	+	-	+	+	+	++
INPA R1003	+	+	+	-	-	++
BR 115	+	+	+	-	-	+
BR 114	+	+	+	-	-	+
BR 112	+	-	+	-	-	++
BR 10016	+	+	+	-	-	+
BR 10026	+	+	+	-	-	++
BR 10052	+	+	+	-	-	+

INPA R, isolados da coleção do INPA; BR, estirpes da coleção da Embrapa Agrobiologia; <sup>(1)</sup> +, reação positiva (tolerante, com média de crescimento acima de 3,06); -, reação negativa (sensível, média de crescimento abaixo de 3,06); <sup>(2)</sup> Índice de solubilização de fosfato (IS): +, IS < 2 (baixo); ++, 2 < IS < 4 (médio); +++, IS > 4 (alto); <sup>(3)</sup> +, produção de AIA abaixo de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; ++, acima de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; +++, acima de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 2.** Dendrograma mostrando similaridade dos isolados estudados e das estirpes-referência, considerando 12 características fisiológicas.

Considerando as características morfológicas mais as fisiológicas, foi construído um dendrograma onde foram formados 3 grupos (Figura 3). O grupo 1 foi formado pelos isolados INPA R808, INPA R817, INPA R999, INPA R980, INPA R814a, INPA R814b, INPA R811, INPA R901 e as estirpes-referência BR 10016, BR 10052, BR 114 e BR 115, com similaridade de 74%, aproximadamente. O grupo 2, com similaridade de 80% entre os isolados INPA R813, INPA R822, INPA R993, INPA R1003, INPA R815, INPA R851, INPA R874, INPA R918, INPA R927, INPA R949 e as estirpes-referência BR 10026 e BR 112. O grupo três formado pelos isolados INPA R820 e INPA R921 apresentou similaridade de 83% não apresentando similaridade com as estirpes-referência. Neste dendrograma foi possível encontrar índice de similaridade de 92% entre o isolado INPA R851 e a estirpe-referência BR 10026. Assim, os isolados apresentaram características fenotípicas distribuídas nos gêneros das estirpes-referência conforme Moreira e Pereira (2001). Este resultado confirma a baixa especificidade do feijão caupi e concorda com aqueles encontrados por Lima et al. (2005), Soares et al. (2006) e Medeiros et al. (2009), avaliando a diversidade fenotípica de rizóbios em diversos ecossistemas, utilizando o feijão caupi como planta isca.

A caracterização morfofisiológica possibilitou um maior conhecimento da população de rizóbio dos solos coletados neste trabalho, e o agrupamento facilitará o desenvolvimento das etapas seguintes de confirmação da nodulação e seleção de rizóbio eficiente para a fixação do  $N_2$  em variedades de feijão

caupi. Segundo Hameed et al. (2004), o estudo das características fisiológicas e morfológicas revela uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizóbio e costuma estar relacionado com estudos em nível de DNA. Estes dados são importantes, uma vez que o conhecimento das comunidades nativas por meio destas ou de outras técnicas revelam-se fundamentais para se conhecer a diversidade das espécies, principal recurso para o trabalho na área de biotecnologia.

Embora a maioria dos isolados agrupados com as estirpes-referência, de acordo com as características fenotípicas, tenha sido relacionada com os gêneros das estirpes-referência, alguns isolados formam grupos separados ou com baixa similaridade com as estirpes-referência. Esses resultados indicam que estes grupos divergentes podem pertencer a outros gêneros ou espécies. Porém, para confirmar essa inferência e esclarecer a posição taxonômica desses isolados, tornam-se necessários estudos genéticos.

#### **Eficiência relativa e simbiótica**

Em relação à testemunha, todos os 20 isolados inoculados em feijão caupi aumentaram significativamente ( $p < 0,001$ ) o crescimento das plantas (Tabela 3). Entre esses, INPA R808, INPA R811, INPA R814a, INPA R815, INPA R817, INPA R820, INPA R822, INPA R874, INPA R901, INPA R921, INPA R980 e INPA R999 proporcionaram as maiores produções de matéria seca da parte aérea (MSPA) e total (MST), porém sem diferirem significativamente do tratamento adubado (com nitrogênio) e as estirpes-referência BR 114 e BR 112 para MST.

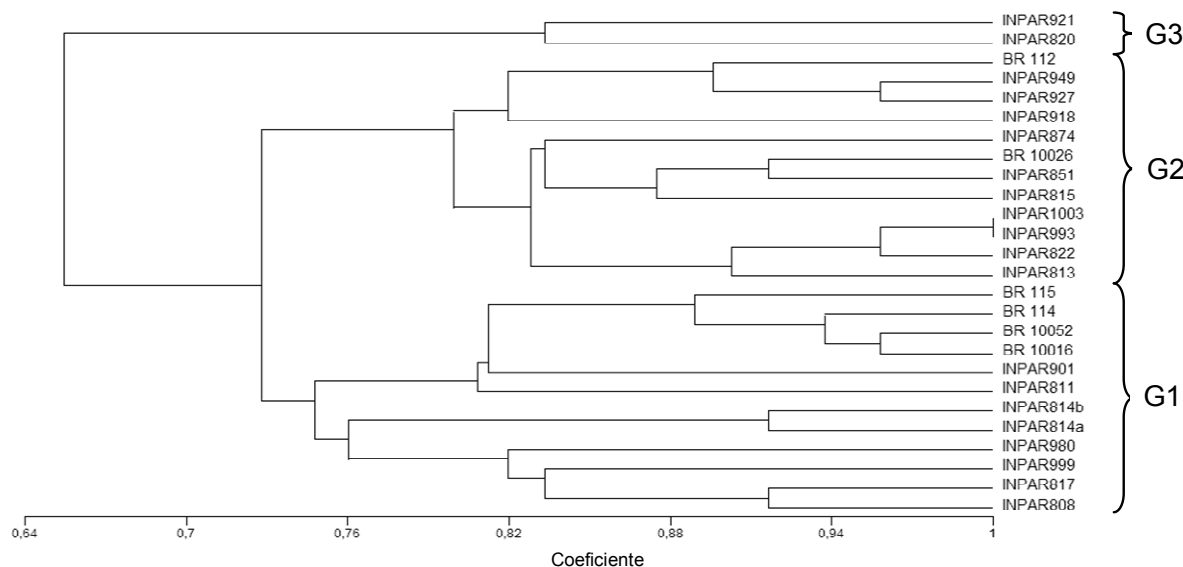


Figura 3. Dendrograma mostrando similaridade dos isolados estudados e das estirpes-referência, considerando 12 características morfológicas mais 12 características fisiológicas.

Esses isolados exibiram também número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos significativamente superiores ( $p < 0,001$ ) aos outros isolados e similares aos registrados para as estirpes-referência BR 112 e BR 10016. A matéria seca da raiz (MSR) foi significativamente inferior para os isolados INPA R918, INPA R993 e a testemunha sem N.

Os isolados que proporcionaram aumentos significativos para MSPA e MST das plantas contribuíram para a eficiência relativa (ER) superiores em relação aos demais isolados avaliadas e estirpes-referência, porém similares ao tratamento

adubado com uréia (Tabela 3). O mesmo foi observado para o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) usando esses isolados, proporcionando, também, os maiores valores de eficiência simbiótica (ES), com percentuais acima de 70% (Figura 4).

Em todos os tratamentos foi observada a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Tabela 3), podendo inferir que houve sinergismo entre rizóbio e FMA, no qual resultou em aumento no crescimento de feijão caupi. As interações sinérgicas entre FMA e rizóbio foram descritas por Abd-Alla e Omar (2001).

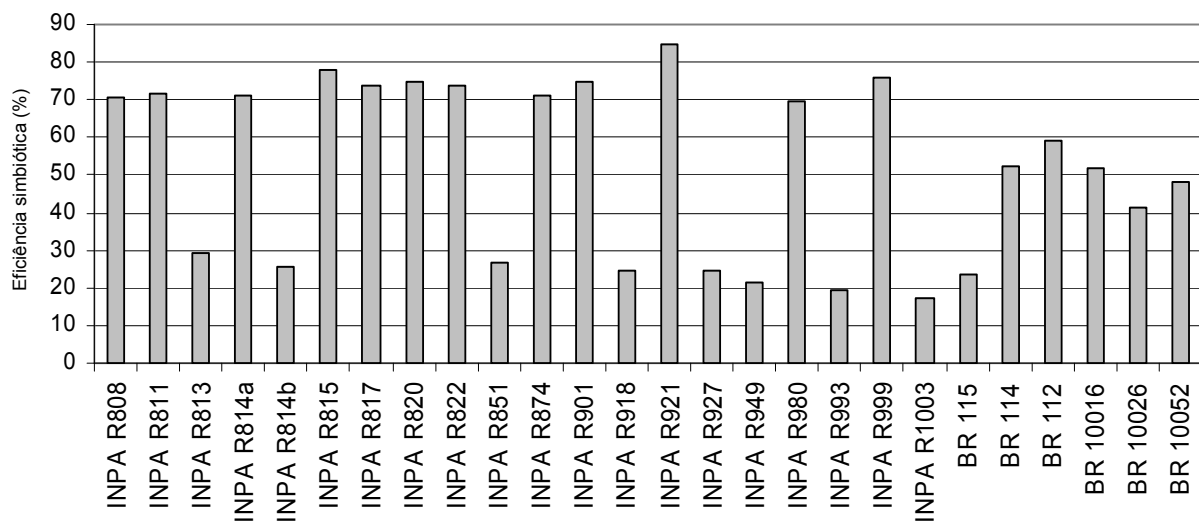


Figura 4. Índices de eficiência simbiótica dos tratamentos inoculados com isolados e estirpes-referências de rizóbios, em relação ao N total acumulado em feijão caupi, 45 dias após o plantio.

**Tabela 3.** Matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR), total (MST), número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), eficiência relativa (ER), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e fungomicorrízicos (FMA) em feijão caupi inoculado com rizóbio<sup>(1)</sup>.

Isolados e estirpes	MSPA (g vaso <sup>-1</sup> )	MSR (g vaso <sup>-1</sup> )	MST (g vaso <sup>-1</sup> )	NN <sup>(2)</sup>	MSN <sup>(2)</sup> (mg vaso <sup>-1</sup> )	ER (%)	ANPA (mg)	FMA <sup>(3)</sup>
INPA R808	3,5 ab	0,6 bcde	4,1 bc	38 ab	253 bc	85,4 bc	123,8 c	+
INPA R811	3,7 a	0,8 ab	4,5 ab	35 ab	293 ab	94,8 ab	125,8 c	+
INPA R813	2,1 fghi	0,4 def	2,5 gh	16 de	76 hi	51,9 hi	63,3 efg	+
INPA R814a	3,4 ab	0,8 ab	4,2 bc	39 ab	280 bc	89,6 bc	124,8 c	+
INPA R814b	1,8 hi	0,6 bcde	2,4 ghi	12 de	52 ij	50,5 hi	58,1 efg	+
INPA R815	3,9 a	0,8 ab	4,7 a	45 ab	301 ab	99,7 a	134,6 bc	+
INPA R817	3,4 ab	0,5 cdef	3,9 bc	40 ab	298 ab	83,3 c	128,9 c	+
INPA R820	3,5 ab	0,8 ab	4,3 abc	40 ab	286 abc	91,2 bc	130,2 bc	+
INPA R822	3,7 a	0,6 bcde	4,3 abc	43 ab	228 cde	90,9 bc	128,8 bc	+
INPA R851	2,1 fghi	0,4 def	2,5 gh	10 e	49 ij	52,6 hi	59,9 efg	+
INPA R874	3,5 ab	0,6 bcde	4,1 bc	45 ab	219 cde	85,4 bc	125,1 c	+
INPA R901	3,6 ab	0,8 ab	4,4 ab	54 a	342 a	91,4 bc	130,3 bc	+
INPA R918	2,0 ghi	0,3 g	2,3 hi	16 de	86 hi	48,8 hi	56,2 efg	+
INPA R921	3,7 a	0,8 ab	4,5 ab	39 ab	206 cde	94,9 ab	145,1 b	+
INPA R927	2,3 efg	0,4 def	2,7 gh	11 de	34 j	55,8 ghi	56,1 efg	+
INPA R949	2,2 efg	0,4 def	2,6 gh	9 e	27 j	56,1 ghi	52,1 fg	+
INPA R980	3,7 a	0,8 ab	4,5 ab	37 ab	229 cde	93,8 ab	122,5 c	+
INPA R993	2,0 ghi	0,3 g	2,3 hi	9 e	40 ij	49,5 hi	48,8 fg	+
INPA R999	3,5 ab	0,6 bcde	4,1 bc	53 a	235 cd	86,9 bc	131,6 bc	+
INPA R1003	2,4 efg	0,5 cdef	2,9 fgh	10 e	35 j	60,5 fghi	45,4 fg	+
BR 115	1,6 hi	0,5 cdef	2,1 i	14 de	73 hi	43,7 i	55,2 fg	+
BR 114	2,8 cde	0,7 abc	3,5 c	30 bc	144 fg	74,3 de	97,4 de	+
BR 112	2,9 cde	0,8 ab	3,7 c	41 ab	185 ef	78,6 d	107,1 d	+
BR 10016	2,8 cde	0,5 cdef	3,3 de	42 ab	200 ef	70,2 def	96,1 de	+
BR 10026	2,5 def	0,5 cdef	3,0 efg	25 cde	91 hi	63,4 fg	80,8 def	+
BR 10052	2,6 def	0,5 cdef	3,1 efg	28 cde	123 gh	64,8 efg	91,1 de	+
Testemunha sem N	0,6 j	0,3 g	0,9 j	0 f	0 k	17,3 j	20,3 h	+
Aduado com N	3,9 a	0,9 a	4,8 a	0 f	0 k	100 a	167,3 a	+
CV (%) <sup>(4)</sup>	13,8	22,8	17,4	21,5	26,2	21,1	5,5	

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%; <sup>(2)</sup>Dados transformados por raiz de X + 0,5;<sup>(3)</sup>+, ocorrência de FMA; <sup>(4)</sup>Coefficiente de variação.

Esses dados indicam que, apesar da pequena diferença entre MSN das bactérias com os melhores desempenhos simbióticos, os parâmetros acúmulo de N total, produção de matéria seca, ER e ES podem ser usados como bons indicadores da potencialidade de uso dos isolados INPA R808, INPA R811, INPA R814a, INPA R815, INPA R817, INPA R820, INPA R822, INPA R874, INPA R901, INPA R921, INPA R980 e INPA R999 como inoculantes para o feijão caupi.

Os isolados que exibiram os maiores valores para os parâmetros estudados foram iguais ou superiores aos valores encontrados para as estirpes-referência. Resultados semelhantes foram reportados em outros trabalhos, como Lacerda et al. (2004), Lima et al. (2005), Soares et al. (2006) e Zilli et al. (2006), que observaram uma menor eficiência simbiótica das estirpes-referência em relação às estirpes isoladas de nódulos de feijão caupi.

Associando-se os resultados de eficiência simbiótica e nodulação, observou-se que os isolados que apresentaram bom desempenho são potenciais inoculantes para o feijão caupi em solos da Amazônia. Contudo, existe a necessidade da avaliação da contribuição desses isolados para a fixação do N<sub>2</sub> e para a produtividade de feijão caupi por meio de testes agrônomicos em condições de campo.

## Conclusão

Houve grande diversidade entre os isolados quanto às suas características morfológicas e fisiológicas, apresentando características distribuídas nos gêneros das estirpes-referência.

Os isolados nativos são constituídos por estirpes com eficiência variável, dos quais alguns são potenciais inoculantes para o caupi, em razão do bom desempenho quanto à eficiência-relativa, simbiótica e nodulação, podendo ser recomendadas para testes de eficiência agrônômica.

## Agradecimentos

À UFAM e INPA, aos colaboradores na pesquisa e à CAPES, FAPEAM e CNPq pelos recursos financeiros que viabilizaram essa pesquisa.

## Referências

- ABD-ALLA, M. H.; OMAR, S. A. Survival of rhizobia/bradyrhizobia and rock-phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus niger* on various carriers from some agro-industrial wastes and their effects on nodulation and growth of faba bean and soybean. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 261-272, 2001.
- ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes



- (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v. 204, n. 1, p. 57-67, 1998.
- BANO, N.; MUSSARAT, J. Isolation and characterization of phorate degrading bacteria of agricultural significance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 324-328, 2003.
- DIAS, M. C.; BARRETO, J. F.; XAVIER, J. J. B. N. **Agricultura familiar no Amazonas**: cultivo de feijão caupi em várzea: cultivar BR 8-Caldeirão. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2002.
- EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Brasília: Embrapa/CNPQ, 1997.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951.
- HAMEED, S.; YASMIN, S.; MALIK, K. A.; ZAFAR, Y.; HAFEZ, F. Y. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 3, p. 179-185, 2004.
- HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.
- HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.; COCA, R. G.; MEGÍAS, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybeans nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 10, p. 1349-1361, 2001.
- KORMANICK, P. P.; BRYAN, W. C.; SCHULTZ, R. C. Procedures and equipment for staining large number of plant root samples for endomycorrhizal assay. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 26, p. 536-538, 1980.
- KYEI-BOAHEN, S.; SLINKARD, A. E.; WALLEY, F. L. Evaluation of rhizobial inoculation methods for chickpea. **Agronomy Journal**, v. 94, n. 4, p. 851-859, 2002.
- LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; MAGALHÃES, F. M. M.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. E. C. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade de feijão caupi. **Revista Ceres**, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.
- LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.
- 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. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 6, p. 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 Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.
- MOREIRA, F. M. S.; PEREIRA, E. G. Microsymbionts: rhizobia. In: SWIFT, M.; BIGNELL, D. (Ed.). **Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice**. Bogor: Icrf, 2001. p. 19-24.
- OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, H. P. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 3, p. 203-208, 1999.
- SANGINGA, N. Role of biological nitrogen fixation in legume based cropping systems; a case study of West Africa farming systems. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 25-39, 2003.
- SCHENCK, N. C. **Methods and principles of mycorrhizal research**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1982.
- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fósforo por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311-319, 2000.
- 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. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 795-802, 2006.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, F. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fósforo na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.
- THAKURIA, D.; TALUKDAR, N. C.; GOSWAMI, C.; HAZARIKA, S.; BORO, R. C.; KHAN, M. R. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, v. 86, n. 7, p. 978-985, 2004.
- XAVIER, G. R. MARTINS, L. M. V.; ZILLI, J. E.; PEIXOTO, R. C.; RUMJANEK, N. G. **Protocolo operacional cultivo de planta-isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulo de planta-isca**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1997.
- ZAMAN-ALLAH, M.; SIFI, B.; L`TAIEF, B.; EL AOUNI, M. H.; DREVON, J. J. Rhizobial inoculation and P fertilization response in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under glasshouse and field conditions. **Experimental Agriculture**, v. 43, n. 1, p. 67-77, 2007.
- ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isolados de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.

Received on July 4, 2007.

Accepted on February 21, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.