

Efeito da inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* (Bradyrhizobiaceae) sobre o desenvolvimento de *Senna multijuga* e *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae)

Effect of inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* (Bradyrhizobiaceae) in the development of *Senna multijuga* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae)

Elton J Lírio¹, Erineti Arnholz², Cintia Hencker³, Maria Margareth C Roldi⁴, Raphael B Soares⁴, Valderes B Sarnaglia Jr¹, Francismeire Bonadeu¹ e Selma Hebling⁵

1. Programa de Pós-graduação em Botânica, Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rua Pacheco Leão, 2040, Solar da Imperatriz, Horto, Rio de Janeiro – RJ. CEP: 22460-030. Endereços eletrônicos: lirioeltonj@gmail.com, valderesbento@yahoo.com.br, francismeireb@gmail.com; 2. Programa de Pós-graduação em Planejamento e Conservação, Escola Superior São Francisco de Assis. Rua Bernardino Monteiro, 700, Dois Pinheiros, Santa Teresa - ES. CEP: 29650-000. Endereço eletrônico: erinetiarnholz@yahoo.com.br; 3. Laboratório de Gestão de Recursos Hídricos e Desenvolvimento Regional – Universidade Federal do Espírito Santo. Av. Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, Vitória – ES. Caixa Postal 01-9011, CEP: 29060-970. Endereço eletrônico: hencker.bio@gmail.com; 4. Museu de Biologia Professor Mello Leitão. Avenida José Ruschi, 04, Centro, Santa Teresa – ES. CEP: 29650-000. Endereços eletrônicos: margacroidi@gmail.com & raphaelbecallisoares@hotmail.com; 5. Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo. Av. Vitória, 950, Forte São João, Vitória – ES. CEP: 29017-950. Endereço eletrônico: shebling@gmail.com.

Resumo A associação simbiótica entre rizóbios e plantas possibilita a fixação de nitrogênio atmosférico para compostos assimiláveis, o qual favorece o desenvolvimento e a produção do vegetal. *Bradyrhizobium japonicum* é um rizóbio com associação para diversas leguminosas, dentre elas, recomendado para o cultivo da soja. *Phaseolus vulgaris* e *Senna multijuga* (Fabaceae) são espécies de interesse comercial, e a segunda utilizada em recuperação de áreas degradadas. O presente trabalho objetivou determinar a influência da inoculação de *B. japonicum* no desenvolvimento inicial de *S. multijuga* e total de *P. vulgaris*. No experimento foram utilizados os parâmetros altura, diâmetro do caule a altura do solo, número de folhas e massa seca; e a análise dos dados consistiu no teste de normalidade de Shapiro-Wilk, quando normais através do teste t-Student e quando não-normais, teste de Mann-Whitney. A partir dos resultados, é inferido que *S. multijuga* não apresenta interação positiva com o rizóbio, enquanto que para *P. vulgaris* uma correlação positiva é encontrada na análise de alguns dos parâmetros. Tais resultados são discutidos e confrontados com outros trabalhos e são propostas as tendências de interação entre *B. japonicum* e os grupos filogenéticos das leguminosas.

Palavras-chaves: Leguminosae, rizóbio, especificidade hospedeira.

Abstract Symbiotic association between rhizobia and plants allows the fixation of atmospheric nitrogen to assimilable compounds that favor the development and production of the

plant. *Bradyrhizobium japonicum* is a rhizobia which presents association with several legumes, being recommended for soybean cultivation. *Phaseolus vulgaris* and *Senna multijuga* (Fabaceae) are commercially important species, moreover, the latter is used in recovery of degraded areas. This study aims to determine the influence of inoculation of *B. japonicum* on the initial development of *S. multijuga* and on the total development of *P. vulgaris*. The parameters considered were: height, stem diameter at ground height, number of leaves and dry weight. The data analyses consisted of Shapiro-Wilk test for normality, t-Student's test when normal and, when not-normal, Mann-Whitney test. Based on the results, it is inferred that there is a lack on *S. multijuga* positive interactions with the rhizobia, whilst *P. vulgaris* exhibits positive correlation in some parameters. These results are discussed and compared with other papers and trends of interaction are proposed between *B. japonicum* and phylogenetic groups of legumes.

Keywords: Leguminosae, rhizobia, host specificity.

Introdução

O nitrogênio é um dos principais elementos necessários ao desenvolvimento das plantas, constituinte de muitos componentes da célula vegetal, sua deficiência inibe rapidamente o crescimento

vegetal (Paracer e Ahmadjian 2000). Apesar de a atmosfera ser rica em nitrogênio, as plantas necessitam da disponibilidade de compostos nitrogenados assimiláveis no solo, como o amônio e o nitrato, compostos obtidos por meio da decomposição da matéria orgânica, fertilizantes químicos, fixação e nitrificação por bactérias de vida livre e por bactérias simbióticas em nódulos de raízes (Hungria *et al.* 1994; Paracer e Ahmadjian 2000).

A família Fabaceae apresenta espécies que desenvolveram associação com bactérias simbióticas, coletivamente conhecidas como rizóbios, as quais penetram no sistema radicular da planta durante seu desenvolvimento inicial, induzem a divisão celular em regiões do córtex, tornam-se fixadoras de nitrogênio e proliferam, o que resulta na formação de tumores denominados nódulos (Moreira 1994, Raven *et al.* 2007). Os compostos nitrogenados produzidos nos nódulos são transportados para o resto da planta, o que supre ou complementa as necessidades desta.

O gênero *Bradyrhizobium* (Bradyrhizobiaceae) foi proposto devido, principalmente, a diferenças fisiológicas apresentadas pela espécie *Rhizobium japonicum*, como seu crescimento mais lento que as demais espécies de *Rhizobium* (Jordan 1982). *Bradyrhizobium japonicum* é uma bactéria simbiótica que possui interação com diversas leguminosas, dentre elas, recomendada para melhor produção na cultura de *Glycine max* (L.) Merr, a soja (Ruiz-Díez *et al.* 2012).

Phaseolus vulgaris L. (Faboideae), o feijão, é uma espécie de importância econômico-social, considerada um dos principais alimentos da dieta brasileira e um importante gerador de emprego, devido à mão-de-obra empregada em seu cultivo (Aidar 2003). A rentabilidade da cultura está proporcionalmente relacionada com a produtividade e qualidade dos grãos produzidos, que pode ser comprometida devido à sua exigência por nutrientes, sistema radicular superficial e ciclo curto (Rosolem & Marubayashi 1994). Estudos têm pontuado que *P. vulgaris* apresenta interação positiva com diversos rizóbios, principalmente do gênero *Rhizobium*, no entanto, não foram encontrados estudos com *B. japonicum* em “plantio direto” em solo, uma vez que outros métodos podem não representar as particularidades encontradas em ambientes naturais (Michiels *et al.* 1998, Triplett 1990, Prévost *et al.* 2012).

Senna multijuga (Rich.) H.S Irwin & Barneby (Cesalpinoideae) é uma árvore, com sementes de tegumento delgado, que ocorre em quase todo o território brasileiro, principalmente na Mata Atlântica (Amorim *et al.* 2008). É uma espécie utilizada na recuperação de ecossistemas degradados e de interesse econômico pela produção madeireira (Amorim *et al.* 2008).

A elucidação das relações ecológicas e necessidades nutricionais de espécies florestais e de interesse econômico em plantio direto podem subsidiar tecnologias para obtenção de plantas saudáveis e com baixo custo, com a possibilidade de dispensar ou minimizar o uso de fertilizantes (Barnett & Baker 1991, Moreira 1994). Deste modo, foi avaliado o efeito da inoculação de *B. japonicum* no desenvolvimento inicial de *Senna multijuga* e no

desenvolvimento total de *P. vulgaris* L. em condições de plantio das sementes direto em solo.

Métodos

O estudo foi realizado no campo experimental da Escola Superior São Francisco de Assis (19°56'10" e 40°36'06" W), Santa Teresa, Espírito Santo, situada a 650m de altitude, com precipitação média anual de 1404 mm (Mendes & Padovan 2000). O clima é classificado como Cwa, mesotérmico, com estação seca no inverno e maior pluviosidade no verão, o solo predominante caracterizado como latossolo, com teores razoáveis de acidez e baixo teor nutricional (Mendes & Padovan 2000). O cultivo de *S. multijuga* foi conduzido no período de maio a setembro de 2010 e de *P. vulgaris* no período de junho a agosto de 2010.

As sementes de *S. multijuga* foram coletadas em um remanescente de Mata Atlântica, na cidade de Santa Maria de Jetibá – ES, e o *voucher* foi incorporado ao acervo do herbário MBML e as sementes de *Phaseolus vulgaris* cv. ‘Vermelho’ foram obtidas no mercado local.

Foram utilizadas 100 sementes de cada espécie as quais foram submetidas a dois tratamentos, das quais 50 sementes foram inoculadas com *B. japonicum* e as outras 50 não inoculadas (controle). As sementes foram semeadas em canteiros de 1,0 x 0,80 m, em sulcos com espaçamento de 0,3 m. Os canteiros semeados com *S. multijuga* foram cobertos com telas do tipo “sombrite” (com contenção de 50% de luminosidade) e aqueles semeados com *P. vulgaris* permaneceram a pleno sol.

Para inoculação, foi efetuada uma diluição de 1 ml de solução com bactéria e 3 ml de água destilada para cada 5g de sementes e estas foram protegidas da luz solar no momento de semeadura.

Foram mensuradas altura, diâmetro do caule à altura do solo (DAS), número de folhas do total de indivíduos e a massa seca final (seis meses após o plantio para *S. multijuga* e três meses para *P. vulgaris*) de cinco indivíduos para ambas as espécies. Para *P. vulgaris*, adicionalmente contabilizou-se o número de vagens.

A análise dos dados foi realizada no Past (Hammer *et al.* 2001) e consistiu no teste de normalidade de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk 1965). Quando normais foram comparados através de teste t-Student e quando não-normais através do teste de Mann-Whitney, considerada a significância $\alpha = 0,05$.

Resultados e discussão

Os tratamentos com *S. multijuga* não apresentaram diferença significativa para nenhum dos parâmetros (figuras 1-2), para *P. vulgaris*, houve diferença significativa para os parâmetros altura, DAS e número de folhas (figura 3), entretanto, para os parâmetros de

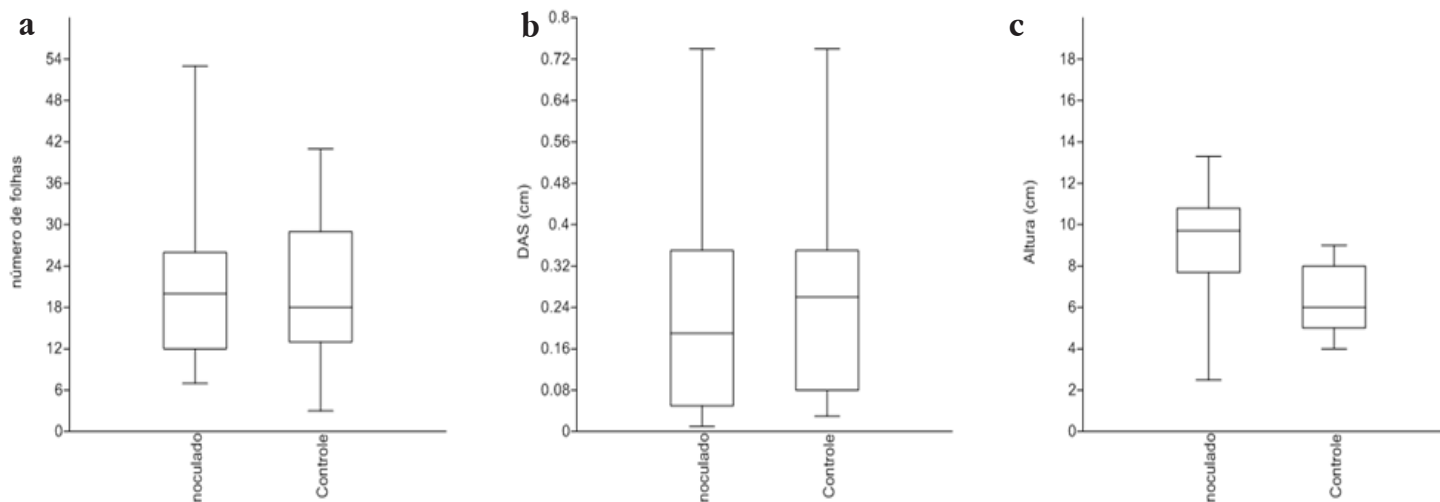


Figura 1 Gráficos de boxplot para *Senna multijuga* ao final do experimento: a) Número de folhas (teste de Mann-Whitney, $U=102,5$; $p=0,93$); b) Diâmetro a altura do solo (teste de Mann-Whitney, $U=82$; $p=0,67$) e c) Altura (teste de Mann-Whitney, $U=71$; $p=0,34$).

matéria seca e número de vagens não houve diferença (figuras 4-5).

A ausência de diferença significativa para os tratamentos de *S. multijuga*, indica que a inoculação não exerceu influência sobre seu desenvolvimento. Apesar de a espécie apresentar interação com micorrizas arbusculares (Vasconcelos 1982), estudos que testaram a inoculação desta espécie com bactérias do gênero *Rhizobium* relatam a ausência de interação (Faria *et al.* 1984, Oliveira 1988, Souza *et al.* 1994), o que poderia estar relacionado à especificidade da relação rizóbio-hospedeiro (Araújo & Hungria 1994).

A nodulação de *B. japonicum* é apontada em diversos trabalhos com leguminosas, no entanto, a especificidade de interação parece apresentar tendência a um grupo de espécies filogeneticamente relacionados, restritos à Faboideae: *Glycine hispida* (Moench) Maxim., *G. max*, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi, *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L., *Lupinus luteus* L., *Ornithopus sativus* Brot., *Cytisus villosus* Pourr., *Lablab purpureus* (L.) Sweet (Souza *et al.* 1999, Delic *et al.* 2010, Chang *et al.* 2011, Chahboune *et*

al. 2011, Stepkowski *et al.* 2011, Ruiz-Díez *et al.* 2012).

Outros trabalhos, que tratam da interação de rizóbios com leguminosas corroboram o padrão supracitado, e apresentam uma tendência gradativa de interação entre as espécies das subfamílias, Faboideae com a maior taxa, seguida por Mimosoideae, e Cesalpinioideae (Allen & Allen 1981, Souza *et al.* 1994, Barberi *et al.* 1998). A baixa ocorrência de interação de Cesalpinioideae pode ser explicada pelo fato deste grupo ser mais basal na escala da evolução de Fabaceae, e acredita-se que a interação rizóbio-leguminosa possa ter surgido ao mesmo tempo em que a subfamília tenha se estabelecido (Faria *et al.* 1984).

Em estudo com *Phaseolus vulgaris* cv. 'Carioca', realizado em condições controladas, foi verificado que houve nodulação, mas não ocorreu a fixação de nitrogênio nos nódulos produzidos (Michiels *et al.* 1998). No presente estudo infere-se que os índices positivos obtidos (figura 3) são decorrentes da interação com o rizóbio e conseqüente fixação de nitrogênio, no entanto, o suprimento de assimilados de nitrogênio não repercutiu suficientemente no

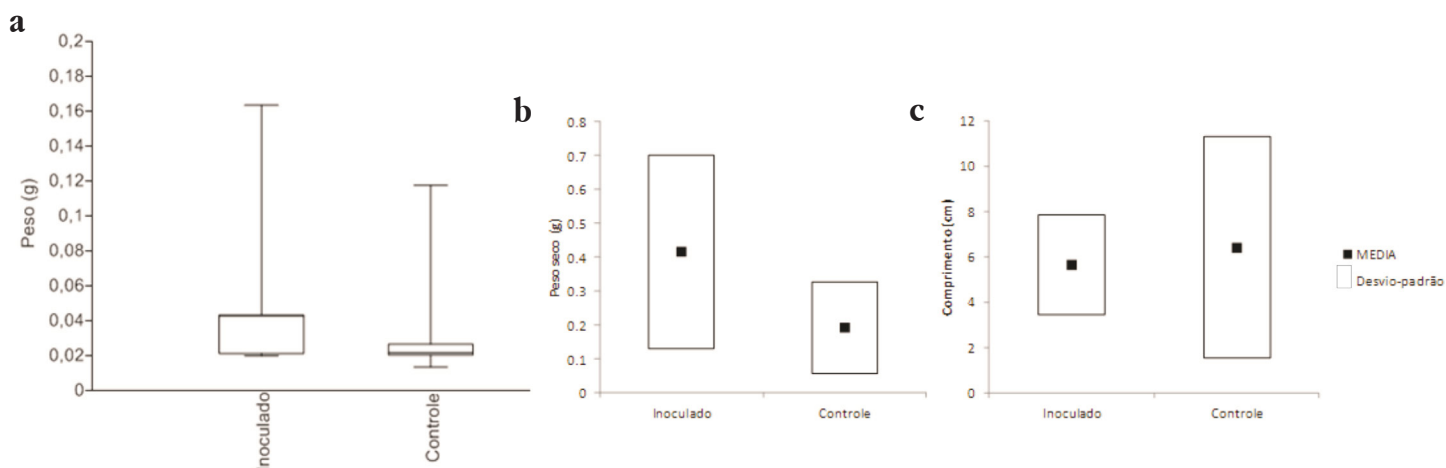


Figura 2 a) Gráfico de boxplot para *Senna multijuga* referente ao peso seco da raiz (Teste de Mann-Whitney, $U=9$, $p=0,53$); b) Gráfico de desvio-padrão referente ao peso seco da parte aérea de *S. multijuga* (Teste t, $t=2,36$, $p=0,07$) e c) Gráfico de desvio-padrão referente ao comprimento da raiz (Teste t, $t=-0,42$, $p=0,69$).

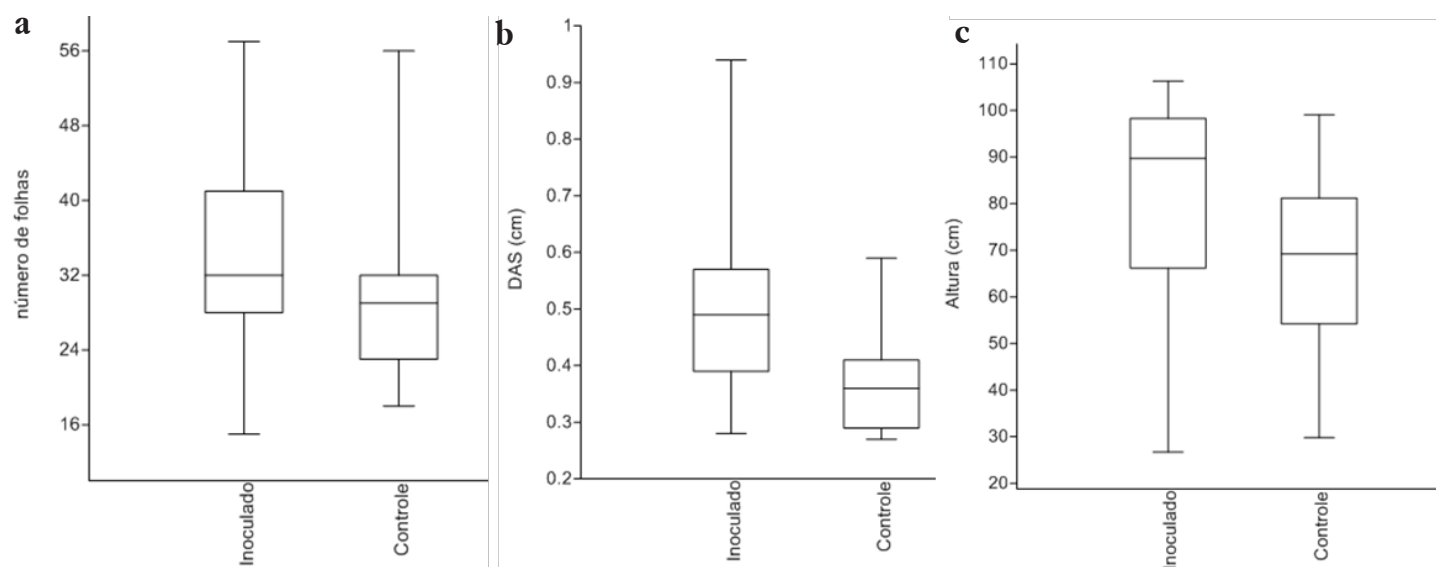


Figura 3 Gráficos de boxplot para *Phaseolus vulgaris* ao final do experimento: a) número de folhas (teste de Mann-Whitney, $U = 524,5$; $p = 0,007$); b) DAS (teste de Mann-Whitney, $U = 360$; $p < 0,001$) e c) Altura (teste de Mann-Whitney, $U = 465$; $p = 0,001$).

desenvolvimento das plantas para ser detectado pelos testes estatísticos nos demais parâmetros (figuras 4-5). Esta baixa relação pode estar relacionada com a baixa capacidade de fixação de nitrogênio em associações de rizóbios com *P. vulgaris*, como apontado para o gênero *Rhizobium* (EMBRAPA 1993).

Estes dados não eximem *P. vulgaris* da interação com *B. japonicum*, mas motiva a busca por mais pesquisas para elucidação desta possível interação e de suas respostas fisiológicas, bem como os resultados positivos na utilização da inoculação de *B. japonicum* em consórcio com adubação nitrogenada, a fim de tornar a cultura menos onerosa. No que tange a espécies florestais encorajam-se mais estudos, uma vez que a escassez de trabalhos dificulta a exploração de técnicas de inoculação potenciais para produção de mudas saudáveis e mais resistentes para uso em reflorestamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Escola Superior São Francisco de Assis pelo apoio logístico e financiamento, e em especial a Marcela Milli, coordenadora de laboratórios; ao Me. Helio de Queiroz Boudet Fernandes, curador do herbário do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão; aos biólogos Luana Marquardt, Claucineia S. Traichel, Diones M. Lüttig, Mayara M. Ravara, Fabíola T. Sperandio, Simone S. Morozesque e Lucian Filippini pelas contribuições ao trabalho e a Matheus A. Poubel pelas correções no texto em inglês..

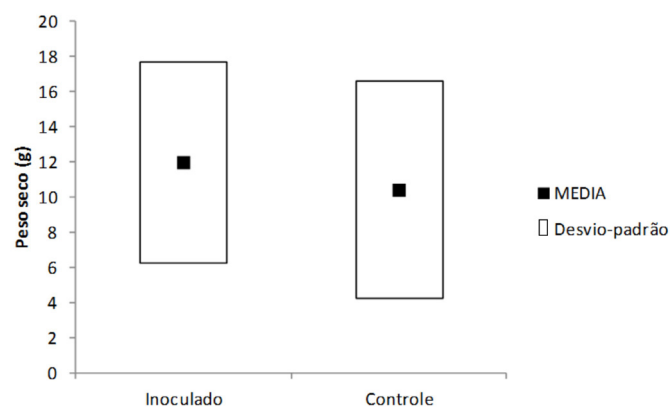


Figura 4 Gráfico de desvio-padrão para *Phaseolus vulgaris* referentes ao peso seco obtido ao final do experimento (Teste $t = 0,84$; $p = 0,44$).

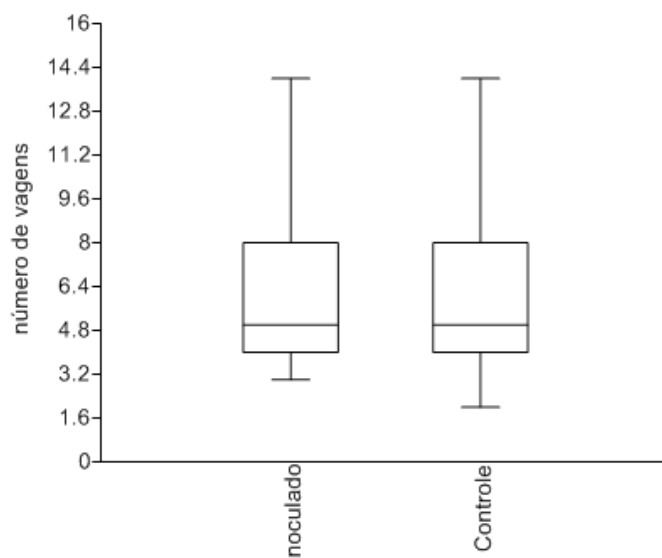


Figura 5 Gráfico de Boxplot para *Phaseolus vulgaris* referentes ao número de vagens médio por feijoeiro (teste de Mann-Whitney, $U = 755$; $p = 0,66$).

Referências

- Aidar H (2003) Sistemas de Produção. In: Aidar H. **Cultivo do feijoeiro comum**. Embrapa Arroz e Feijão (documento eletrônico) 2: 64-65.
- Allen ON, Allen E (1981) **The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation**. Washington, The University of Wisconsin Press, 1981.
- Amorim JRA de, Resende RS, Holanda JS de, Fernandes PD (2008) Qualidade da água na agricultura irrigada. In: Albuquerque PEP e Durães FOM (ed.). **Uso e manejo de irrigação**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, pp 255-316.
- Araújo RS, Hungria M (1994) **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília, Embrapa-SPI.
- Barberi A, Carneiro MAC, Moreira FMS, Siqueira J.O (1998) Nodulação em Leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne** 4: 145-153.
- Barnett JP, Baker JB (1991) Regeneration methods. In: Duryea MLE & Dougherty, P.M. (Ed.) **Forest regeneration manual**. London, Kluwer Academic Publishers, pp 35-50.
- Chahboune R, Barrijal S, Morenob S, Bedmar EJ (2011) Characterization of Bradyrhizobium species isolated from root nodules of *Cytisus villosus* grown In: Morocco. **Systematic and Applied Microbiology** 34: 440-445.
- Chang YL, Wang ET, Sui XH, Zhang XX, Chen WX (2011) Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Lablab purpureus* (Linn.) grown in Southern China. **Systematic and Applied Microbiology** 34: 276-284.
- Delić D, Stajković O, Rasulić N, Kuzmanović D, Josić D, Miličić B (2010) Nodulation and N₂ fixation effectiveness of Bradyrhizobium strains in symbiosis with Adzuki Bean, *Vigna angularis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 53: 293-299.
- Embrapa (1993) **Recomendações técnicas para o cultivo do feijão**: Zonas 61 e 83. Brasília: Embrapa-SPI, 93 p.
- Faria SM, Franco AA, Jesus RM, Menandro M de S, Baitello JB, Mucci ESF, Dobreiner J, Sprent JI (1984). New nodulating legume trees from southeast Brazil. **New Phytologist** 98: 317-328.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 4: 1-9.
- Hungria M, Vargas MAT, Suhel AR, Peres JRR (1994) Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: Araujo RS, Hungria, M. (Eds.) **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília, EMBRAPA-SPI. pp 9-90.
- Jordan DC (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology** 32: 136-139.
- Mendes SL, Padovan MP (2000) A Estação Biológica de Santa Lúcia. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (N. série)** 11/12: 7-34.
- Michiels J, Dombrecht B, Vermeiren N, Xi C, Luyten E, Vanderleyden J (1998) *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulations. **FEMS Microbiology and Ecology** 26: 193-205.
- Moreira FMS (1994) Fixação biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. In: Araujo RS, Hungria M (Eds) **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília, EMBRAPA-SPI pp 121-150.
- Oliveira LA de (1988) Competitive ability of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains. 125 p. Tese de Ph. D. - University of Minnesota, Minnesota.
- Paracer S, Ahmadian V (2000) **An Introduction to Biological Associations**. 2 ed. Oxford, Oxford University Press.
- Prévost D, Gauvin-Trudel C, Juge C (2012) Diversity of *Bradyrhizobium* populations associated to soybean-maize rotations in Québec, Eastern Canada, and their potential to improve growth of both plant species. **Applied Soil Ecology** 59: 29-38.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2007) **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Rosolem CA, Marubayashi OM (1994). Seja o doutor do seu feijoeiro In: **Encarte de Informações Agronômicas**. pp 16.
- Ruiz-Díez B, Fajardo S, Felipe MR de, Fernández-Pascual M (2012) Characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties. **Journal of Basic Microbiology** 52: 66-78.
- Shapiro SS, Wilk MB (1965) Na analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika** 52: 591-611.
- Souza V, Eguiarte L, Avila G, Cappelo R, Gallardo C, Montoya J, Piñero D (1994a) Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. **Applied Environmental Microbiology** 60: 1260-1268.
- Souza LAG, Silva MF, Moreira FW (1994b) Capacidade de nodulação de cem leguminosas da Amazônia. **Acta Amazonica** 24: 9-18.
- Souza AA, Burity HA, Figueiredo MVB, Silva MLRB, Melotto M, Tsai SM (1999) Eficiência simbiótica de Estirpes Hup*, Hup^{HP} e Hup de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* em cultivares de Caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34: 1925-1931.
- Stepkowski T, Zak M, Moulin L, Króliczak J, Golinska B, Narozna D, Safronova VI, Madrzak CJ. (2011) *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. **Systematic and Applied Microbiology** 34: 368-375.
- Triplett EW (1990) Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness. **Applied Environmental Microbiology** 56: 98-103.
- Vasconcelos I (1982) Associação simbiótica entre microorganismos e espécies florestais do Nordeste. In: **VII Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais**, Curitiba.