

Isolamento e seleção em condições estéreis de estirpes de rizóbio para ervilha

Edemar Brose¹ e Aleksander Westphal Muniz²

Resumo – A ervilha é uma espécie de alto valor nutritivo na alimentação humana e animal e de valor ecológico e econômico pela capacidade de fixação biológica do nitrogênio. Devido à constatação de falhas na nodulação em ervilha, foram iniciados trabalhos de isolamento e seleção de novas estirpes bacterianas para futuras recomendações em produção de inoculante. Foram testados 175 novos isolamentos em três experimentos em casa de vegetação, com areia + vermiculita (2:1) estéril e solução nutritiva. Foi observado que duas estirpes oficialmente recomendadas, SEMIA 3007 e SEMIA 3012, estavam ineficientes, mas foi possível recuperar a eficiência de SEMIA 3007. Foi observada também a existência de estirpes com alta capacidade de formar nódulos, porém não tão eficientes em fixar nitrogênio como a EEL 5501. Até este estágio de seleção, as estirpes recomendadas para continuar com testes em solo e a campo são: EEL 2301, 2901, 3001, 5501, 3301, 3302, 6502, 6802, 7802 e 13402. **Termos para indexação:** *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, seleção de estirpes, nodulação, fixação de nitrogênio.

Isolation and selection in sterile conditions of rhizobia for peas

Abstract – Peas are nutritionally important for humans and animals. Ecologically and economically its value raises from the ability to fix nitrogen symbiotically. Due to failures in nodulation under field conditions, a program of isolation and selection of rhizobia for peas was carried out to establish future recommendations for inoculant production. Three experiments were carried out and a total of 175 new isolations were tested under controlled conditions, using sand + vermiculite (2:1) and nutrient solution. In two officially recommended strains (SEMIA 3007 and SEMIA 3012) inefficiencies were detected, but it was possible to recover the efficiency of the strain SEMIA 3007. This study showed the existence of potentially infective strains but not efficient in nitrogen fixation such as EEL 5501. According to the selection stage achieved in this study, the strains recommended to continue in the selection program in soil and field conditions are: EEL 2301, 2901, 3001, 5501, 3301, 3302, 6502, 6802, 7802 and 13402.

Index terms: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, strain selection, nodulation, N fixation.

Ervilha é uma leguminosa com qualidades nutricionais excelentes, tanto para o homem como para animais. Quanto às vantagens nutricionais, uma das mais relevantes é o alto teor de proteína, e quanto às vantagens ecológicas e econômicas, destaca-se a capacidade de

fixar o nitrogênio do ar biologicamente, o que é realizado por bactérias do gênero *Rhizobium* (rizóbio) que infectam suas raízes.

A produção nacional desta leguminosa não é suficiente para atender ao consumo nacional. As importações apenas de grãos secos

de cinco países como Argentina, Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e França somaram em torno de 24 mil toneladas em 2001 e 21 mil toneladas em 2003, segundo IBGE (2004). Comparadas com uma produção de 8 mil toneladas no Brasil, há perspectiva de gran-

Aceito para publicação em 20/8/07.

¹Eng. agr., Ph.D., Rua Papagaio, 185/316, 88215-000 Bombinhas, SC, fone: (55) 9935-3977, e-mail: edbrose@gmail.com.

²Eng. agr., M.Sc., Epagri/Estação Experimental de Lages, C.P. 181, 88502-970 Lages, SC, fone/fax: (49) 3224-4400, e-mail: aleks@epagri.sc.gov.br.

de demanda dentro do território nacional.

Nos anos recentes tem havido incentivo, por parte de empresas alimentícias, para a produção nacional, especialmente no Rio Grande do Sul. Em vista disto, foram reiniciados cultivos de ervilha e lentilha em algumas propriedades e foi observado que, mesmo com o uso de inoculantes comerciais para viabilizar a fixação biológica de nitrogênio, houve baixa nodulação ou falha total em alguns casos. Por causa dos resultados negativos e pelo fato de as recomendações de estirpes de rizóbio para esta espécie estarem sendo feitas com base em trabalhos realizados há muitos anos (ou décadas), ou com base em recomendações de outros países, foram iniciados trabalhos de seleção de novas estirpes para esta cultura.

Este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar novas estirpes de rizóbio com eficiência igual ou maior do que as já existentes e recomendadas.

Os nódulos destinados para o isolamento foram coletados nas raízes de plantas estabelecidas em lavouras nos municípios de Ibiraiaras, São José, Lagoa Vermelha e Vacaria, RS. Os isolamentos foram obtidos a partir de nódulos que foram previamente lavados em água corrente, desinfetados em álcool 70% por 1 minuto e, após, em hipoclorito de sódio (água sanitária a 50%) durante 4 a 5 minutos. Os nódulos foram depois lavados em água estéril e macerados. Uma gota do macerado de nódulo foi distribuída, por riscagem, em placa de Petri contendo meio ágar-manitol e extrato de levedura (AML) corado com vermelho congo, segundo método descrito por Vincent (1975). Foi feito um total de 175 isolamentos e foram conduzidos três experimentos com delineamento completamente ao acaso, com quatro ou seis repetições, em casa de vegetação. Para a comparação entre os tratamentos foi usado o programa de estatística ASSISTAT versão 7.4 beta, e para a comparação entre as médias foi adotado o teste de Scott-Knott devido ao grande número de tratamentos. Foram utilizadas como meio sólido

areia e vermiculita (2:1 v/v) estéril e solução nutritiva. A composição da solução nutritiva foi a seguinte em g/L: K_2HPO_4 0,07, KH_2PO_4 0,08, $MgCl_2$ 0,12, $CaCl_2$ 0,1 e Na_2HPO_4 0,15. Para cada litro desta solução foram acrescentados 10ml de FeEDTA (3,74g de $FeSO_4$ e 2,87g de NaEDTA dissolvidos em 1L de água quente) e 1ml de solução micronutriente da seguinte solução estoque em g/L: H_3BO_3 2,86, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2,08, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,22, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,08 e Na_2MoO_4 0,11. Foram usados copos plásticos de 700ml e foi colocado um volume de 600ml da mistura de areia estéril. No início de cada experimento, cada vaso foi regado com 200ml desta solução nutritiva, e em torno de 4 semanas mais tarde foi dado mais um reforço de 100ml por vaso desta mesma solução. Foram utilizadas três plantas por vaso a partir de sementes desinfetadas com hipoclorito de sódio (água sanitária a 50%) durante 4 a 5 minutos e pré-germinadas. As estirpes com a sinonímia EEL seguida de número foram os isolamentos feitos no Laboratório de Biotecnologia da Epagri/Estação Experimental de Lages, e as de sinonímia SEMIA seguida de número foram estirpes recebidas do Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio – Mircen – da Fundação Estadual de pesquisa Agropecuária – Fepagro –, RS.

Experimento 1. Foram testadas 60 estirpes bacterianas em ervilha da cultivar Marjoret, sendo que duas recomendadas oficialmente para produção de inoculantes, SEMIA 3007 e SEMIA 3012, foram usadas como testemunhas. As variáveis avaliadas foram: produção de massa seca da parte aérea, número e peso de nódulos. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Com base na produção de massa seca da parte aérea, as estirpes quase não variaram entre si, classificando-se em dois grupos apenas. Quanto à nodulação, houve maior variação entre as estirpes. A estirpe EEL 5501 apresentou o maior número e peso de nódulos (Tabela 1). Outra observação a ser ressaltada são as estirpes EEL 4701 e EEL 5201, que

também apresentaram alta capacidade infectiva, com base no número de nódulos produzidos, porém foram completamente ineficientes, igualando-se à testemunha sem inoculação quanto à produção de massa seca da parte aérea. Estas duas estirpes não possuem valor sob o ponto de vista de recomendação para produção de inoculante, mas poderão ser estirpes de alto interesse científico para estudos dos genes “Nod”, responsáveis pela nodulação, e genes “Fix”, responsáveis pela fixação do nitrogênio. Outra constatação foi com relação às estirpes recomendadas para produção de inoculantes, as quais estavam totalmente ineficientes (Tabela 1). A SEMIA 3007 não produziu nodulação, indicando que os repiques originados desta matriz perderam a capacidade infectiva na ervilha ou foram dominados por contaminação com outras bactérias.

Experimento 2. Foram testadas mais 66 estirpes originadas de novos isolamentos e três estirpes como testemunha: a SEMIA 3007 (recomendada para produção de inoculante) e mais duas estirpes do Experimento 1 (EEL 2301 e 2901). Neste experimento foi usada como hospedeira a ervilha cultivar Spence. Como foi observado ineficiência das estirpes SEMIA 3007 e 3012 (recomendadas para produção de inoculantes), foram adquiridos novos repiques do laboratório de origem (Mircen/Fepagro) e realizado teste de eficiência destas duas estirpes nas mesmas condições em casa de vegetação, sendo que apenas da SEMIA 3007 foi possível a recuperação da eficiência. Embora a estirpe SEMIA 3012 não estivesse mais eficiente, foi incluída novamente neste experimento para confirmação deste resultado. Nesta triagem, a comparação entre as estirpes foi feita apenas com base na produção da massa seca da parte aérea como indicativo da eficiência na fixação de nitrogênio. Os resultados estão na Tabela 2. As 70 estirpes testadas se classificaram em quatro grupos de acordo com o teste Scott-Knott, sendo que 10 se enquadraram no grupo superior (EEL▶

Tabela 1. Massa seca (MS) da parte aérea, número e peso de nódulos de ervilha (cultivar Marjoret) inoculada com estirpes de rizóbio em condições de areia e solução nutritiva estéreis. Média de quatro repetições⁽¹⁾

Estirpe	MS da parte aérea	Nódulo	MS de nódulo	Estirpe	MS da parte aérea	Nódulo	MS de nódulo
	g/vaso		Nº		mg/vaso		g/vaso
EEL 2301	1,77a	53,7c	60,5b	EEL 1701	1,36a	58,2c	55,2b
EEL 2901	1,70a	51,7c	54,0b	EEL 3901	1,36a	65,0c	53,2b
EEL 3001	1,65a	51,2c	53,5b	EEL 0101	1,35a	41,7c	60,2b
EEL 4901	1,50a	62,0c	48,7b	EEL 3101	1,35a	85,2b	54,2b
EEL 5001	1,58a	46,0c	80,0b	EEL 0301	1,34a	71,0b	49,7b
EEL 5101	1,56a	81,2b	66,0b	EEL 2401	1,32a	52,7c	54,2b
EEL 4601	1,56a	75,7b	64,0b	EEL 0601	1,31a	46,2c	55,7b
EEL 1601	1,55a	54,2c	59,5b	EEL 2001	1,31a	58,7c	49,7b
EEL 2101	1,53a	73,2b	60,7b	EEL 2801	1,31a	50,2c	48,2b
EEL 2701	1,53a	59,7c	54,2b	EEL 4001	1,31a	47,0c	45,0b
EEL 3401	1,53a	40,0c	52,5b	EEL 0701	1,30a	58,7c	44,2b
EEL 1401	1,52a	49,7c	57,0b	EEL 5501	1,29a	97,7a	166,0a
EEL 5601	1,51a	57,5c	59,0b	EEL 0801	1,28a	45,2c	58,0b
EEL 0201	1,49a	73,5b	56,5b	EEL 3201	1,28a	75,2b	56,5b
EEL 0401	1,49a	72,7b	54,2b	EEL 4201	1,28a	55,2c	48,5b
EEL 2601	1,49a	46,7c	49,7b	EEL 1101	1,27a	65,2c	53,7b
EEL 3501	1,49a	52,5c	40,7b	EEL 5401	1,24a	66,2c	50,7b
EEL 1001	1,47a	55,7c	62,0b	EEL 1901	1,23a	58,0c	45,5b
EEL 4501	1,47a	66,2c	55,0b	SEMIA 60/81	1,22a	73,5b	51,0b
SEMIA 59/81	1,47a	69,2c	54,5b	EEL 1501	1,17b	51,0c	44,5b
EEL 3801	1,45a	53,7c	73,5b	SEMIA 3012	0,62b	16,0d	15,2c
EEL 1801	1,44a	70,5b	55,0b	SEMIA 57/81	0,57b	0,0e	0,0d
EEL 5301	1,43a	62,0c	64,2b	EEL 4701	0,54b	126,2a	53,5b
EEL 2501	1,42a	66,7c	60,5b	SEMIA 3/81	0,54b	7,5d	4,7d
EEL 3701	1,42a	48,0c	47,2b	SEMIA 3007	0,51b	0,0e	0,0d
EEL 0501	1,41a	71,0b	58,0b	Test. s/ inoc.	0,49b	0,0e	0,0d
EEL 0901	1,41a	54,7c	53,2b	EEL 4301	0,48b	0,0e	0,0d
EEL 4401	1,39a	71,0b	61,5b	EEL 5201	0,46b	95,7a	36,7b
EEL 1201	1,38a	57,0c	60,5b	SEMIA 58/81B	0,43b	0,0e	0,0d
EEL 3601	1,38a	58,7c	58,7b	EEL 4801	0,42b	83,5c	28,5b
EEL 4101	1,37a	60,7c	75,5b	CV (%)	21,94	14,4⁽²⁾	12,51⁽²⁾

⁽¹⁾As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott no nível de 5%.

⁽²⁾Para o cálculo da variância os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$.

Nota: CV = coeficiente de variação

Tabela 2. Massa seca (MS) da parte aérea de ervilha (cultivar Spence) inoculada com estirpes de rizóbio em condições de areia e solução nutritiva estéreis. Média de seis repetições⁽¹⁾

Estirpe	MS da parte aérea	Estirpe	MS da parte aérea
	g/vaso		g/vaso
Test. com N	13,21a	EEL 202	6,14d
EEL 3302	10,09b	EEL 1602	6,12d
EEL 2901	9,86b	EEL 4602	6,12d
EEL 6502	9,81b	EEL 802	5,93d
EEL 902	9,31b	EEL 2702	5,93d
EEL 5802	9,30b	EEL 5202	5,93d
EEL 102	9,26b	EEL 402	5,90d
EEL 4702	9,21b	EEL 3402	5,81d
EEL 1302	9,18b	EEL 5602	5,81d
EEL 1002	9,15b	EEL 4902	5,80d
EEL 4502	8,89b	EEL 3202	5,64d
EEL 5902	8,45c	EEL 302	5,61d
EEL 2302	7,86c	EEL 3702	5,56d
SEMIA 3007	7,85c	EEL 1202	5,35d
EEL 6302	7,79c	EEL 3902	5,34d
EEL 2102	7,74c	EEL 502	5,20e
EEL 4302	7,54c	EEL 2802	5,19e
EEL 2301	7,45c	EEL 5302	5,16e
EEL 5402	7,43c	EEL 5002	5,09e
EEL 4802	7,42c	EEL 4102	4,98e
EEL 2202	7,40c	EEL 4202	4,98e
EEL 4402	7,29c	EEL 3102	4,87e
EEL 1102	7,28c	EEL 4002	4,66e
EEL 6002	7,22c	EEL 1502	4,56e
EEL 6102	7,18c	EEL 5102	4,56e
EEL 3502	7,14c	EEL 2502	4,50e
EEL 5702	6,88c	EEL 2902	4,48e
EEL 2402	6,84c	EEL 1902	4,46e
EEL 6402	6,84c	EEL 3002	4,45e
EEL 6602	6,82c	SEMIA 3012	4,43e
EEL 3802	6,53d	EEL 702	4,43e
EEL 6202	6,51d	EEL 1702	4,40e
EEL 1402	6,47d	EEL 1802	3,99e
EEL 3602	6,47d	EEL 602	3,75e
EEL 5502	6,43d	EEL 2602	3,29e
EEL 2002	6,15d	Test. sem N	2,64e

⁽¹⁾As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott no nível de 5%.

Notas: Test. = testemunhas; N = nitrogênio.

3302, 2901, 6502, 902, 5802, 102, 4702, 1302, 1002 e 4502), porém não se igualando à testemunha com nitrogênio, 40 estirpes foram intermediárias e 20, ineficientes. A estirpe EEL 2901, do Experimento 1, foi a segunda estirpe com maior produção de massa seca da parte aérea, confirmando ser uma estirpe com potencial de fixação do nitrogênio. A SEMIA 3012 mais uma vez confirmou que está ineficiente, sugerindo a sua eliminação da recomendação como eficiente, a menos que seja comprovada novamente a sua eficiência pelo seu Centro detentor.

Experimento 3. Foram testadas mais 53 estirpes na ervilha cultivar Spence. Neste experimento foram incluídas a estirpe padrão SEMIA 3007, 3 estirpes do Experimento 1 (EEL 2301, 2901 e 3001) e 1 das melhores do Experimento 2 (EEL 3302). As 48 estirpes restantes foram novos isolamentos. As variáveis avaliadas foram: massa seca da parte aérea, número e peso de nódulos. Os resultados encontram-se na Tabela 3. É conveniente observar que as quatro melhores estirpes dos experimentos anteriores não foram as melhores neste experimento. Assim como no Experimento 1, houve estirpe com alta nodulação porém baixa eficiência, como a estirpe EEL 11202 (Tabela 3).

Os resultados demonstraram que, nas condições em que foram feitos os experimentos, a nodulação (número e peso) não foi o melhor indicador da eficiência na fixação do nitrogênio. Entretanto, é uma informação útil quando se trata de avaliar estirpes em mistura, na qual uma menos eficiente poderá dominar a outra em formação de nódulos e com isso refletir em menor rendimento da cultura.

Os resultados deste trabalho mostraram que poderiam estar sendo produzidos inoculantes ineficientes para os produtores. Os resultados também dão subsídios para recomendar a continuidade dos trabalhos para selecionar mais e melhores estirpes para ervilha. As estirpes que deverão continuar no processo de avaliações em condições de solo em casa de vegetação e a campo são: EEL 2301, 2901, 3001, 5501, 3301, 3302, 6502, 7802, 6802 e 13402. ▶

Tabela 3. Massa seca (MS) da parte aérea, número e peso de nódulos de ervilha (cultivar Spence) inoculada com estirpes de rizóbio em condições de areia e solução nutritiva estéreis. Média de 6 repetições⁽¹⁾

Estirpe	MS da parte aérea	Nódulo	MS de nódulo	Estirpe	MS da parte aérea	Nódulo	MS de nódulo
	g/vaso	Nº	mg/vaso		g/vaso	Nº	mg/vaso
EEL 7802	11,30a	41,0b	26,5c	EEL 13502	9,46a	37,5b	29,2c
Test. + N	10,74a	0,0d	0,0f	EEL 12902	9,40a	56,5a	20,5d
EEL 6802	10,69a	54,8a	31,5c	EEL 7301	9,31a	51,0a	21,0d
EEL 13402	10,61a	47,5b	35,7b	EEL 2901	9,26a	50,3a	45,2b
EEL 3301	10,48a	50,7a	32,0c	EEL 12002	9,22a	37,8b	34,2b
SEMIA 3007	10,34a	67,3a	73,7a	EEL 7302	9,12b	69,0b	35,7b
EEL 7201	10,13a	66,8b	40,0b	EEL 12702	9,11b	58,0a	39,0b
EEL 13102	10,09a	41,2a	35,3b	EEL 2301	9,10b	56,7 ^a	30,2b
EEL 12502	10,07a	52,5a	29,5c	EEL 7001	9,10b	42,5a	42,5c
EEL 13202	9,99a	45,0b	38,5b	EEL 7102	8,99b	44,0b	48,3b
EEL 7402	9,97a	53,7a	43,2b	EEL 7502	8,98b	40,7a	35,0c
EEL 12602	9,89a	52,2a	22,7d	EEL 2201	8,98b	56,7b	30,8b
EEL 13302	9,84a	47,7a	38,0b	EEL 12202	8,97b	41,0b	27,3c
EEL 11102	9,79a	37,8b	36,7b	EEL 11302	8,96b	45,8b	40,5b
EEL 6702	9,76a	64,2a	34,7b	EEL 7101	8,81b	40,7b	31,7c
EEL 7002	9,76a	36,7b	31,3c	EEL 11902	8,76b	37,8b	22,0d
EEL 11702	9,76a	38,3b	27,5c	EEL 6801	8,74b	35,0b	32,3c
EEL 11002	9,74a	49,7a	27,7c	EEL 11802	8,72b	34,5b	36,7b
EEL 12302	9,72a	43,7b	30,2c	EEL 12802	8,68b	39,5b	21,5d
EEL 7602	9,65a	45,2b	30,3c	EEL 6902	8,59b	49,0a	31,5c
EEL 3302	9,64a	43,3b	42,2b	EEL 6901	8,52b	33,3b	27,5c
EEL 11602	9,62a	36,5b	31,5c	EEL 12402	8,41b	44,0b	23,2d
EEL 11402	9,56a	40,8b	33,7b	EEL 12102	8,26b	44,7b	37,5b
EEL 6701	9,54a	39,3b	28,8c	EEL 7202	7,43b	41,0b	41,7b
EEL 7902	9,53a	50,7a	34,3b	EEL 11202	7,01b	60,0a	47,2b
EEL 7702	9,51a	55,3a	36,0b	EEL 13002	4,08c	8,2c	7,2e
EEL 11502	9,48a	39,7b	37,3b	Test.	3,79c	11,2c	4,2e
EEL 3001	9,47a	54,2a	39,2b	CV (%)	15,75	12,35⁽²⁾	11,34⁽²⁾

⁽¹⁾As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott no nível de 5%.

⁽²⁾Para o cálculo da variância os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$.

Notas: Test. = testemunha; N = nitrogênio; CV = coeficiente de variação.

Literatura citada

1. IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>. Acesso em: out. 2004.
2. VINCENT, J.M. *Manual practico de rhizobiologia*. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur, 1975. 200p.

As normas para publicação na revista Agropecuária Catarinense podem ser acessadas pela internet no endereço www.epagri.sc.gov.br. Procure por **Revista Agropecuária** e, a seguir, por **Normas para publicação na revista**.