



Isolamento e seleção de estirpes de rizóbio (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) para lentilha em condições hidropônicas

Aleksander Westphal Muniz¹ e Edegar Brose²

Resumo – A lentilha é uma das leguminosas mais antigas utilizadas na alimentação humana. Devido à baixa nodulação da lentilha oriunda do uso do inoculante comercial foram iniciados trabalhos de isolamento e seleção de estirpes bacterianas de rizóbio para esta espécie. O objetivo do trabalho foi reavaliar estirpes recomendadas oficialmente e testar novas estirpes bacterianas isoladas a partir de nódulos coletados a campo. Foram conduzidos dois experimentos e testadas 39 estirpes de rizóbio isoladas na Epagri/Estação Experimental de Lages. Os resultados permitiram concluir que as estirpes EEL 9002, 9102, 9602, 9702, 9902, 10402, 10502, e 18499 são eficientes e podem ser utilizadas em testes de avaliação em solo, em vasos na casa de vegetação e a campo. **Termos para indexação:** lentilha, nodulação, fixação do N.

Isolation and selection of rhizobia strains (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) for lentil in hydroponic conditions

Abstract – The lentil is one of the oldest legumes used in human feeding. Due to the low nodulation of lentils that derive from the use of commercial inoculant, works has been done in the isolation and selection of bacterial strains of rhizobium for this species. The purpose of the work was to reevaluate officially recommended strains and test new bacterial strains isolated from nodules collected the field. Two experiments were conducted and 39 strains of isolated *rhizobium* were tested in the Estação Experimental de Lages, Epagri, SC. The results allowed to conclude that the strains EEL 9002, 9102, 9602, 9702, 9902, 10402, 10502, and 18499 are efficient and can be used in evaluation tests of soil in the greenhouse and in the field.

Index terms: lentil, nodulation, N fixation.

A lentilha é uma das leguminosas mais antigas utilizadas na alimentação humana. Esta cultura apresenta como vantagem a capacidade de fixar o nitrogênio simbioticamente pela associação com bactérias radiculares do gênero *Rhizobium*, que diminuem os impactos ambientais negativos da adubação nitrogenada.

O cultivo de lentilha no Estado do Rio Grande do Sul apresentou

baixa nodulação com o uso de inoculante comercial (Yoky Alimentos, 1999). Esse problema ocorreu devido às recomendações de estirpes para produção de inoculante de lentilha terem sido realizadas há muitos anos. Nesses testes não foram realizadas as avaliações de eficiência consideradas atualmente pela Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes

Microbianos de Interesse Agrícola – Relare. De acordo com trabalhos realizados por Shah et al. (2000), foi demonstrado que estirpes locais de lentilha como a Lc26 aumentaram o rendimento em 393kg/ha quando comparadas com cultivos sem inoculação. Concluíram também que esta diferença pagou o investimento do produtor na compra de inoculante.

Dentre poucos trabalhos com ▶

Aceito para publicação em 17/7/08.

¹Eng. agr., M.Sc., Epagri/Estação Experimental de Lages, C.P. 181, 88502-970 Lages, SC, fone: (49) 3224-4400, e-mail: aleks@epagri.sc.gov.br.

²Eng. agr., Ph.D., Rua Papagaio, 185/316, 88215-000 Bombinhas, SC, e-mail: edemarbrose@gmail.com

seleção de estirpes em lentilha reportados na literatura, há o de Bremer et al. (1990) que selecionaram 209 estirpes em condições controladas, das quais 14 foram testadas em condições de campo, onde foram constatados aumentos de até 155% no rendimento com a inoculação da lentilha, e o nitrogênio total fixado variou de zero a 105kg/ha. Os autores concluíram que as variáveis massa seca total da planta e nitrogênio total apresentam, nas condições controladas, correlações positivas com elas mesmas quando avaliadas a campo.

O objetivo deste trabalho foi reavaliar as estirpes atualmente recomendadas para produção de inoculantes para lentilha e iniciar um programa de isolamento e seleção de novas estirpes de rizóbio para esta cultura.

Para reavaliar as estirpes recomendadas e iniciar um programa de isolamento de novas estirpes de rizóbio para lentilha foram isoladas 143 estirpes de rizóbio no Laboratório de Biotecnologia da Epagri/Estação Experimental de Lages, SC. O isolamento da bactéria foi realizado a partir de nódulos coletados em cultivos nos municípios de São João e Ibiraiaras, RS, no período entre 1999 e 2002. No laboratório os nódulos obtidos foram lavados em água corrente, desinfetados por 1 minuto em álcool 70%, e imersos por 5 minutos em água sanitária comercial. Em seguida, os nódulos foram lavados cinco vezes com água estéril e macerados. Uma gota deste macerado foi colocada em placa de Petri contendo meio sólido de ágar-manitol-extrato de levedura (AML) com vermelho congo (Vincent, 1975). Os isolamentos foram testados nas plantas hospedeiras de lentilha em condições de casa de vegetação, em vasos com areia e vermiculita estéril (2:1 v/v) e solução nutritiva de Hoagland (Taiz & Zeiger, 2004). A composição da solução nutritiva foi modificada nos tratamentos inoculados através da redução de nitrogênio. Em uma seleção prévia aos dois experimentos, cada vaso foi regado com 200ml desta solução nutritiva e, após quatro semanas, foram adicionados mais

100ml por vaso desta mesma solução. Para a inoculação das plantas, as bactérias foram desenvolvidas no mesmo meio AML, sem vermelho congo, em tubos a uma temperatura de 28°C. Depois do crescimento, cada cultura foi suspensa em água estéril. Desta suspensão foi inoculado 1ml/vaso contendo três plantas já germinadas. Os 143 isolamentos realizados foram depositados na coleção de bactérias diazotróficas do Laboratório de Biotecnologia. Destes, 104 foram testados previamente com relação à eficiência na produção de massa seca da parte aérea com seleção de sete estirpes (EEL 8600, 9400, 17599, 17999 e 18499, 20999 e 23399). Das estirpes selecionadas previamente apenas a EEL 18499 foi utilizada nos experimentos 1 e 2. Nesses experimentos as variáveis avaliadas foram a massa seca da parte aérea da planta, número e massa seca dos nódulos. Os experimentos foram conduzidos com delineamento completamente casualizado com seis repetições. A variável avaliada no experimento 1 foi a massa seca da parte aérea. Já no experimento 2 foram avaliadas a massa seca da parte aérea, número e massa seca dos nódulos. Os

resultados obtidos foram analisados estatisticamente com o auxílio do programa Assistat. No experimento 2, para análise de variância e separação de médias, os dados foram transformados para $y = \sqrt{x + 1}$.

Experimento 1: Foram testadas neste experimento 17 estirpes. Deste total de estirpes, 9 eram novos isolamentos, 2 eram recomendadas para produção de inoculantes no Brasil (SEMIA 3025 e 3026), 3 eram recomendadas para ervilha e lentilha nos Estados Unidos da América (USA 212-7, 212-9 e 213-5), e a estirpe EEL 18499 da coleção que se mostrou eficiente em ensaio prévio ao Experimento 1 e 2 (EEL 2301 e 2901) isoladas e com eficiência para a cultura da ervilha. A estirpe EEL 18499 foi escolhida ao acaso entre as estirpes eficientes da coleção microbiana. Como tratamento adicional foram acrescentadas duas testemunhas sem inoculação: sem nitrogênio e com nitrogênio (400mg de uréia/vaso, divididos em quatro doses semanais). Os resultados demonstraram que a estirpe EEL 18499 foi a mais eficiente na produção de massa seca na parte aérea, superando inclusi-

Tabela 1. Massa seca da parte aérea de lentilha inoculada com estirpes de rizóbio em casa de vegetação e condições hidropônicas. Médias de seis repetições⁽¹⁾

Estirpe	Massa seca da parte aérea	Estirpe	Massa seca da parte aérea
g/vaso.....	g/vaso.....
EEL 18499	2,80 a	EEL 6201	1,40 c
Testemunha (com nitrogênio)	2,40 b	EEL 5801	1,39 c
USA 212-7	2,12 b	EEL 6301	1,33 c
EEL 6401	1,72 c	EEL 6101	1,30 c
EEL 5701	1,66 c	USA 213-5	1,18 c
SEMIA 3026	1,55 c	EEL 5901	1,03 c
EEL 6501	1,53 c	Test. (sem nitrogênio)	0,95 d
EEL 6001	1,47 c	SEMIA 3025	0,94 d
EEL 2301	1,44 c	USA 212-9	0,73 d
		EEL 2901	0,62
CV (%)			24,74

⁽¹⁾As médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5%.
CV = coeficiente de variação.

ve a testemunha com nitrogênio (Tabela 1). As estirpes padrão SEMIA 3026, juntamente a outros dois isolamentos EEL 6401 e 5701, se enquadraram numa terceira categoria, indicando que se podem obter estirpes mais eficientes, a exemplo da EEL 18499 e USA 212-7 (Tabela 1). Os resultados também demonstraram a ineficiência das estirpes SEMIA 3025, USA 212-9 e EEL 2901 com relação à massa seca. O baixo desempenho da estirpe EEL 2901 pode estar relacionado à especificidade hospedeira entre esta estirpe e a lentilha, uma vez que a mesma é eficiente em ervilha.

Experimento 2: Neste experimento foram testadas 34 estirpes, sendo 30 novos isolamentos e 3 estirpes padrões, recomendadas para produção de inoculantes. Como uma destas estirpes padrões (SEMIA 3025) mostrou-se ineficiente no experimento 1, foi introduzido novo repique oriundo do Laboratório de Fixação Biológica do Nitrogênio – Mircen – da Fepagro, RS. A estirpe EEL 18499, a mais eficiente no experimento 1, foi novamente usada. Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram o surgimento de sete novas estirpes eficientes na produção de massa seca na parte aérea (EEL 9002, 9102, 9602, 9702, 9902, 10402 e 10502), além da confirmação da eficiência da EEL 18499, e a recuperação da estirpe padrão SEMIA 3025. Já a estirpe SEMIA 344 foi ineficiente, o que requer uma análise mais criteriosa, devendo esta estirpe ser testada novamente para sua manutenção ou eliminação da recomendação oficial. Das estirpes testadas, 20 apresentaram maior número de nódulos/vaso (EEL 8002, 8102, 8202, 8302, 8402, 8502, 8602, 8702, 8802, 8902, 9002, 9102, 9202, 9302, 9502, 9702, 10002, 10102, 10302, 10502). A produção de massa seca de nódulos/vaso não apresentou diferenças para 33 estirpes (EEL 8002, 8102, 8202, 8302, 8402, 8502, 8602, 8702, 8802, 8902, 9002, 9102, 9202, 9302, 9402, 9502, 9602, 9702, 9802, 9902, 10002, 10102, 10302, 10402, 10502, 10602, 10702, 10802, 10902, 18499, SEMIA 3025, SEMIA 3026), que fo-

Tabela 2. *Massa seca (MS) da parte aérea, número e peso de nódulos de lentilha inoculado com estirpes de rizóbio em casa de vegetação e condições hidropônicas. Médias de seis repetições⁽¹⁾*

Estirpe	MS da parte aéreag/vaso.....	Nódulos/vason°.....	MS de nódulosmg/vaso.....
Testemunha (com nitrogênio)	6,26a	2,33d	1,00c
EEL 10502	5,40b	67,33a	29,83a
EEL 9602	5,36b	53,33b	37,33a
EEL 18499	5,30b	55,50b	39,83a
SEMIA 3025	5,27b	50,83b	34,67a
EEL 10402	5,20b	54,00b	37,17a
EEL 9902	5,10b	51,33b	32,17a
EEL 9102	5,05b	70,17a	39,33a
EEL 9702	5,04b	62,33a	43,83a
EEL 9002	4,97b	73,17a	41,17a
EEL 8102	4,80c	73,83a	47,67a
EEL 10302	4,80c	63,00a	36,17a
EEL 8802	4,79c	80,67a	45,50a
EEL1 0202	4,78c	59,50b	36,50a
SEMIA 3026	4,75c	47,00b	30,33a
EEL 8502	4,67c	71,67a	37,50a
EEL 10702	4,62c	56,00b	36,67a
EEL 8402	4,58c	84,50a	40,83a
EEL 8902	4,51c	73,00a	37,67a
EEL 10102	4,51c	64,50a	41,50a
EEL 8602	4,51c	74,00a	39,17a
EEL 8302	4,50c	77,33a	44,33a
EEL 8702	4,48c	68,67a	37,50a
EEL 10602	4,46c	40,67b	28,67a
EEL 9802	4,42c	55,33b	36,17a
EEL 8002	4,37c	63,33a	30,50a
EEL 9302	4,36c	62,00a	35,50a
EEL 10902	4,36c	50,67b	34,33a
EEL 9402	4,34c	49,00b	34,50a
EEL 8202	4,24c	76,17a	41,50a
EEL 9202	4,16c	73,83a	39,67a
EEL 10002	4,15c	63,33a	35,33a
EEL 9502	4,10c	69,83a	37,67a
EEL 10802	3,53d	57,67b	31,83a
SEMIA 344	2,38e	8,50d	5,00c
Testemunha (sem nitrogênio)	2,34e	15,00c	7,83b
CV(%)	15,46	22,87	20,51

⁽¹⁾Para o cálculo da variância, os dados foram transformados para $Y = \sqrt{x+1}$.

⁽²⁾As médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5%.

CV = coeficiente de variação.

ram superiores em relação à SEMIA 344 e às testemunhas com e sem nitrogênio. A ineficiência dessa estirpe foi comprovada em função da sua baixa produção de matéria seca da parte aérea e nodulação.

Os resultados desses experimentos mostraram que em condições mais controladas e em meios hidropônicos a nodulação (número e peso) nem sempre poderá ser considerada como parâmetro de eficiência da estirpe em fixar o nitrogênio simbioticamente. Esses dados refletem os obtidos nos trabalhos de seleção estirpes de rizóbio para ervilha em condições similares (Brose & Muniz, 2008). A eficiência da fixação do nitrogênio está relacionada com a atividade da nitrogenase na bactéria e não com a quantidade ou o peso de nódulos formados na planta (Burriss, 1999). É importante lembrar, entretanto, que esta afirmação só é válida nestas condições e comparando estirpes com

alta diversidade na eficiência. Quando se trata de diferentes estirpes com eficiência semelhante frente a outros fatores adversos, a nodulação poderá se tornar relevante.

De acordo com os resultados, pode-se concluir que as estirpes EEL 9002, 9102, 9602, 9702, 9902, 10402, 10502 e 18499 são eficientes e podem ser utilizadas em testes de avaliação em solo em casa de vegetação e a campo. E ainda que a estirpe SEMIA 344, embora ineficiente, conforme experimento 2, deve ser testada novamente para verificar seu potencial na produção de inoculantes.

Literatura citada

1. BREMER, E.; KESSELL, C. Van; NELSON, L. et al. Selection of *Rhizobium leguminosarum* strains for lentil (*Lens culinaris*) under growth room condition and field conditions. *Plant and Soil*, v.121, n.1, p.47-56, 1990.
2. BROSE, E.; MUNIZ, A.W. Isolamento e seleção em condições estéreis de estirpes de rizóbio para ervilha. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v.21, n.1, p.92-96, 2008.
3. BURRIS, R.H. Advances in biological nitrogen fixation. *Journal of Industrial of Microbiology & Biotechnology*, v.22, p.381-393, 1999.
4. SHAH, N.H.; HAFEEZ, F.Y.; ARSHAD, M. et al. Response of lentil to *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains at different levels of nitrogen and phosphorus. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v.40, n.1, p.93-98, 2000.
5. TAIZ, L.; ZEIGER, E. Assimilação de nutrientes minerais. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.285-308.
6. VINCENT, J.M. *Manual practico de rhizobiologia*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1975. 200p.
7. YOKI ALIMENTOS. Contato pessoal com a empresa em Nova Prata, RS. 1999. ■



Governo do Estado de Santa Catarina
Secretaria de Estado da Agricultura e Desenvolvimento Rural
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A.



Assine a revista Agropecuária Catarinense – RAC – e tenha informações precisas e seguras para o seu agronegócio.

Preço da assinatura

Um ano: R\$ 22,00

Dois anos: R\$ 42,00

Três anos: R\$ 60,00

Periodicidade: quadrimestral

Circulação: março, julho e novembro

Como ser assinante da Agropecuária Catarinense?

É fácil. Basta preencher o cupom abaixo e escolher sua forma preferencial de pagamento.

Cheque nominal à Epagri

Depósito na conta Epagri nº 85020-9 do Banco do Brasil, Agência 3.582-3

É importante enviar, via fax, comprovante de depósito bancário à Epagri.

Nota: O código identificador solicitado pelo banco é o CPF ou CNPJ do remetente.

Revista Agropecuária Catarinense – RAC

Caixa Postal 502, 88034-901 Florianópolis, SC
Fones: (48) 3239-5595 e 3239-5535, fax: (48) 3239-5597
E-mail: assinatura@epagri.sc.gov.br



Nome: _____
Endereço: _____
Município: _____ CEP: _____ Estado: _____
Bairro: _____ Caixa Postal: _____ Fone: _____
CPF/CNPJ: _____ E-mail: _____
Atividade principal: _____
Data: _____ Assinatura: _____