

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DOUTORADO EM MANEJO DO SOLO**

FERNANDO BONAFÉ SEI

**DIVERSIDADE DE RIZOBACTÉRIAS E COINOCULAÇÃO COM FUNGOS
MICORRÍZICOS NA NUTRIÇÃO FOSFATADA E EXPRESSÃO GÊNICA NO
FEIJOEIRO**

**LAGES-SC
2012**

FERNANDO BONAFÉ SEI

**DIVERSIDADE DE RIZOBACTÉRIAS E COINOCULAÇÃO COM FUNGOS
MICORRÍZICOS NA NUTRIÇÃO FOSFATADA E EXPRESSÃO GÊNICA NO
FEIJOEIRO**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Manejo do solo, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Manejo do Solo.

Orientador: Dr. Osmar Klauberg Filho

Co-orientador: Dr. Julio César Pires do Santos

LAGES-SC

2012

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14^a Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Sei, Fernando Bonafé
Diversidade de rizobactérias e coinoculação com fungos micorrízicos na
nutrição fosfatada e expressão gênica no feijoeiro / Fernando Bonafé Sei;
orientador: Osmar Klauberg Filho. – Lages, 2012.
116f.

Inclui referências.
Tese (doutorado) – Centro de Ciências Agroveterinárias /
UDESC.

1. *Rhizobium*. 2. *Pseudomonas*. 3. *Glomus clarum*. 4. Fósforo.
I. Título.

CDD – 631.46

FERNANDO BONAFÉ SEI

**DIVERSIDADE DE RIZOBACTÉRIAS E COINOCULAÇÃO COM FUNGOS
MICORRÍZICOS NA NUTRIÇÃO FOSFATADA E EXPRESSÃO GÊNICA NO
FEIJOEIRO**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Manejo do solo, do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Doutor em Manejo do Solo.

Banca Examinadora:

Orientador:

Dr. Osmar Klauberg Filho
Universidade do Estado de Santa Catarina

Co-orientador:

Dr. Julio César Pires do Santos
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

Dra. Diva de Souza Andrade
Instituto Agronômico do Paraná

Membro:

Dr. Murilo Dalla Costa
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

LAGES, 26/03/2012

A todos as pessoas que de alguma forma contribuíram e acreditaram na realização deste trabalho. A minha esposa Adriana, minha filha Maria Fernanda e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e acreditaram na minha capacidade e potencial.

Agradeço em especial ao Professor Dr. Osmar Klauberg Filho pelos anos de orientação, amizade, companheirismo e por nunca duvidar da concretização e finalização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Julio César Pires do Santos, pela co-orientação, amizade e apoio nos momentos de dificuldade.

A Professora Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho pela co-orientação do trabalho, supervisão e realização das análises de expressão gênica.

A Pesquisadora Dra. Diva de Souza Andrade pelo apoio e a realização das análises de caracterização fisiológica e genética de estirpes de rizobactérias de plantas de feijoeiro.

Ao Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), em especial ao Laboratório de microbiologia do solo e toda a sua equipe, pelo apoio para realização das análises de caracterização fisiológica e genética de estirpes de rizobactérias.

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelo apoio para a realização das análises de expressão gênica, em especial ao Laboratório de Fisiologia do desenvolvimento e genética vegetal e ao Dr. Rubéns Onofre Nodari.

A Embrapa Agrobiologia pelo empréstimo das estirpes de *Azospirillum* utilizadas como referência nos trabalhos de caracterização de estirpes de rizobactérias.

A Epagri de Lages pela estocagem de material vegetal em ultra-freezer para as análises de expressão gênica.

A Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) em especial ao centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), que proporcionou a oportunidade do curso de Doutorado em Manejo do solo.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante os dois primeiros anos do Curso de Doutorado em Manejo do Solo.

A empresa Turfal indústria e comércio de produtos biológicos e agronômicos Ltda (Novozymes BioAg Produtos para Agricultura Ltda), pela parceria no projeto de pesquisa e envio das amostras de inoculante para Feijão “LeguMax” utilizadas nos ensaios.

A toda equipe do Laboratório de Biologia e Fauna do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina, em especial a Dayse C. Schemes que atuou como bolsista de iniciação científica neste trabalho e a Anelize Nunes Neves que trabalhou com as estirpes deste estudo em seu trabalho de conclusão de curso realizado no IAPAR.

A minha família e em especial a minha esposa Adriana Souza Xavier, pelo incentivo, apoio e confiança no meu trabalho.

Agradeço a Deus por me dar fé e força para continuar os trabalhos nos momentos de maior dificuldade.

RESUMO

SEI, Fernando Bonafé. **Diversidade de rizobactérias e coinoculação com fungos micorrízicos na nutrição fosfatada e expressão gênica no feijoeiro.** 116 f. Tese (Doutorado em Manejo do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. Lages, SC. 2012.

Atualmente a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*) ocupa uma área de mais de 4 milhões de ha no Brasil, sendo cultivada em diversos sistemas de manejo e grau tecnológico. O estado de Santa Catarina tem com característica a agricultura familiar em pequenas propriedades, onde a cultura do feijoeiro é conduzida em pequenas áreas para subsistência e com baixa tecnologia. Nestas condições é normal o uso de genótipos crioulos de feijoeiro, onde a reprodução das sementes é realizada pelo próprio produtor e o uso de tecnologias como a inoculação com rizóbios e a aplicação de fertilizantes é raramente realizada de forma a obter o máximo potencial produtivo da cultura. A caracterização de acessos crioulos de feijoeiro associada ao uso eficiente de microrganismos fixadores de nitrogênio (N) e associações com FMAs pode ser de grande valor, já que apresentam maior probabilidade de conter alelos para adaptação local, resistência a doenças e tolerância as principais adversidades edafoclimáticas. Os objetivos deste estudo foram avaliar a ocorrência e a diversidade de rizobactérias em raízes de feijoeiro cultivados em pequenas propriedades, no Oeste e Meio-oeste do estado de Santa Catarina e avaliar a resposta na nutrição e expressão gênica de genótipos crioulos de feijoeiro submetidos à inoculação com estirpes divergentes de rizobactérias e FMA (*Glomus clarum* nicol. & schenck). A análise de ocorrência e caracterização fisiológica e genética de rizobactérias em raízes de feijoeiro mostrou uma alta densidade de rizobactérias, com o isolamento e caracterização fisiológica das estirpes foi observado o potencial de produção de auxina e fixação biológica de nitrogênio. A identificação das estirpes demonstrou a presença de rizobactérias do gênero *Pseudomonas* sp.; *Rhizobium* sp.; *Pseudomonas moraviensis* e *Stenotrophomonas maltophilia*. O seqüenciamento das estirpes permitiu constatar um predomínio do gênero *Pseudomonas* sp.: 13 de um total de 15 estirpes identificadas. Na avaliação do efeito dos genótipos de feijoeiro, doses de fósforo e inoculação com *Glomus clarum* na nutrição e expressão gênica, os resultados demonstram que a dose de P proporcionou efeito na massa seca da parte aérea, sendo o valor máximo de massa seca observado com a dose de 400 mg de P kg⁻¹. O efeito do

genótipo foi observado no teor de P e P acumulado, sendo que o genótipo crioulo BAF55 foi superior ao genótipo comercial BAF115. As doses de P proporcionaram efeito na colonização micorrízica nas duas épocas de coleta (28 e 48 dias após a semeadura). Na coleta aos 28 dias, no genótipo comercial BAF115 com inoculação de *G. clarum* e dose de 100 mg P kg⁻¹ houve elevação de 123% na colonização micorrízica em comparação com o tratamento sem aplicação de P. No genótipo crioulo BAF55 nas condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos foi possível observar que o tratamento sem aplicação de P apresentou os menores valores de colonização micorrízica. Na época de coleta aos 48 dias, no genótipo BAF55 a inoculação com *G. clarum* aumentou a colonização em relação à condição de FMAs nativos. A análise da expressão genética demonstrou que existe efeito dos genótipos analisados, doses de P e inoculação com *G. clarum* no gene PVPT. Foi observado na expressão gênica do gene PVPT que o genótipo crioulo BAF55 respondeu tanto com a inoculação com *G. clarum* quanto com a população de FMAs nativas, enquanto que o genótipo comercial BAF115 (Valente) respondeu somente no tratamento com FMAs nativos do solo. Em ambos os genótipos foi possível observar a resposta da expressão genética ocorreu na dose de 100 mg de P kg⁻¹, sendo que esta resposta está associada aos FMAs nativos do solo e não inoculação com *G. clarum*. No estudo com coinoculação foi observado efeito positivo da inoculação com rizobactérias e *G. clarum* na massa seca, P e N acumulado da parte aérea em plantas de feijoeiro. O melhor tratamento observado foi a coinoculação de *G. clarum* e a estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis*, que obteve os maiores valores de massa seca, P e N acumulado na parte aérea e na massa seca dos nódulos. A estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis* apresentou melhor desempenho que a estirpe Ai27 nos parâmetros analisados neste ensaio.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Glomus clarum*, fósforo.

ABSTRACT

SEI, Fernando Bonafé. **Diversity of rhizobacteria and co-inoculation with mycorrhizal fungi and phosphorus nutrition on gene expression in common bean.** 116 f. Thesis (Doctorate in Soil Management) – Santa Catarina State University. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. Lages, SC. 2012.

Currently the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) occupies an area of over 4 million ha in Brazil, being cultivated in various management systems and technological level. The state of Santa Catarina has to feature family farms into small holdings, where the bean crop is conducted in small plots for subsistence and low technology. Under these conditions it is normal to use Creole bean genotypes, where the reproduction of seeds is carried by the producer and the use of technologies such as rhizobial inoculation and fertilizer application is rarely performed in order to achieve maximum crop yield potential. The characterization of landraces of common bean associated with the efficient use of nitrogen-fixing microorganisms (N) and mycorrhizal associations can be of great value, since most likely to contain alleles for local adaptation, disease resistance and tolerance to major climatic adversities. The objectives of this study were to evaluate the occurrence and diversity of rhizobacteria on roots of bean plants grown on small farms in West and Mid-western state of Santa Catarina and evaluate the response in nutrition and gene expression of bean genotypes submitted to inoculation with divergent strains of rhizobacteria and AMF (*Glomus clarum* Nicol. & Schenck). The analysis of occurrence and genetic and physiological characterization of rhizobacteria in bean roots showed a high density of rhizobacteria and the isolation and physiological characterization of strains was observed in the potential auxin production and biological nitrogen fixation. The identification of the strains showed the presence of the rhizobacteria *Pseudomonas* sp. *Rhizobium* sp. *Pseudomonas moraviensis* and *Stenotrophomonas maltophilia*. The sequencing of the strains allowed us to observe that there is a predominance of *Pseudomonas* sp.: 13 out of 15 strains identified. In assessing the effect of bean genotypes, phosphorus and inoculation with *Glomus clarum* nutrition and gene expression, the results show that the dose effect of P provided in shoot dry weight, the maximum value of dry mass observed with 400 mg P kg⁻¹. The effect of genotype was observed in P and P accumulated in the harvest at 28 days after sowing, and the genotype BAF55 was superior to genotype commercial BAF115. The P present effect on mycorrhizal

colonization in two harvests. In the harvest at 28 days after sowing, the genotype inoculated with commercial BAF115 *G. clarum* and 100 mg P kg⁻¹ was 123% increase in root colonization in comparison with the treatment without application of P. In genotype BAF55 conditions of inoculation with *G. clarum* and indigenous AMF was observed that the treatment without P application showed the lowest values of mycorrhizal colonization. At the time of harvest to 48 days after sowing, the genotype BAF55 inoculation with *G. clarum* increased colonization in relation to the status of indigenous AMF. The analysis of gene expression PVPT gene demonstrated that there is an effect of the genotypes studied, rates of P and inoculation with *G. clarum*. Was observed in gene expression of the gene PVPT that genotype BAF55 responded with both inoculation with *G. clarum* as with the native AMF population, while the genotype trade BAF115 (Valente) answered only in the AMF treatment with native soil. In both genotypes was possible to observe the response of gene expression occurred in a dose of 100 mg P kg⁻¹, and this response is associated with the native soil and mycorrhizal inoculation with non *G. clarum*. In the study with co-inoculation observed positive effect of inoculation with rhizobacteria and *G. clarum* dry matter yield, P and N uptake of shoots in bean plants. The best treatment was observed co-inoculation *G. clarum* and strain of *Pseudomonas moraviensis* Fe55, which obtained the highest values of dry matter, N and P accumulated in shoots and dry weight of nodules. A strain Fe55 of *Pseudomonas moraviensis* performed better than strain Ai27 the parameters analyzed in this trial.

KEY WORDS: *Rhizobium*. *Pseudomonas*. *G. clarum*. Phosphorus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Imagem de satélite dos pontos de coleta na região Meio-oeste e Oeste do estado de Santa Catarina (GOOGLE, 2010).....33
- Figura 2.** Análise Cluster baseada no BOX A1R-PCR produtos usando o UPGMA algoritmo e o coeficiente de Jaccard.....46
- Figura 3.** Imagem do gel dos perfis de BOX-PCR de 21 estirpes de rizobactérias oriundos de plantas de feijoeiro.....46
- Figura 4.** A árvore do 16S rRNA gene seqüências geradas pelo método de Neighbour Joining mostrando a posição de estirpes de rizosfera de raízes de feijoeiro comum.....47
- Figura 5.** Efeito dos genótipos de feijoeiro na massa seca da parte aérea (g Pl⁻¹). Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....67
- Figura 6.** Efeito dos genótipos de feijoeiro no fósforo acumulado na parte aérea (mg Pl⁻¹). Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....67
- Figura 7.** Efeito das doses de fósforo adicionadas ao solo na massa seca da parte aérea (g Pl⁻¹). Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....68
- Figura 8.** Efeito das doses de P na massa seca da parte aérea (g Pl⁻¹) na época de colheita aos 28 dias após o plantio. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....81
- Figura 9.** Efeito dos genótipos de feijoeiro no teor de P (%) na parte aérea na época de colheita aos 28 dias após o plantio. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....81
- Figura 10.** Efeito dos genótipos de feijoeiro no P acumulado na parte aérea (mg Pl⁻¹) na época de colheita aos 28 dias após o plantio. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....82
- Figura 11.** Efeito das doses de P na massa seca da parte aérea (g Pl⁻¹) época de colheita aos 48 dias após o plantio. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....87
- Figura 12.** Efeito das doses de P e da inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos na percentagem de colonização micorrízica no genótipo comercial BAF115 na época de colheita aos 48 dias após o plantio.....92

Figura 13. Efeito das doses de P e da inoculação com <i>G. clarum</i> e FMAs nativos na massa seca (g) da parte aérea do genótipo comercial BAF115 na época de colheita aos 48 dias após o plantio.....	92
Figura 14. Efeito das doses de P e da inoculação com <i>G. clarum</i> e FMAs nativos na percentagem de colonização micorrízica do genótipo crioulo BAF55 na época de colheita aos 48 dias após o plantio.	93
Figura 15. Efeito das doses de P e da inoculação com <i>G. clarum</i> e FMAs nativos no massa seca (g) da parte aérea do genótipo comercial BAF55 na época de colheita aos 48 dias após o plantio.	93
Figura 16. Foto de Gel de agarose demonstrando a integridade do cDNA obtido pela RT-PCR.....	94
Figura 16. Relação entre PVPT/ACT e doses de P no genótipo comercial BAF115 nas condições de inoculação com <i>G. clarum</i> e FMAs nativos.	97
Figura 17. Relação entre PVPT/ACT e doses de P no genótipo comercial BAF55 nas condições de inoculação com <i>G. clarum</i> e FMAs nativos.....	97
Figura 18. Relação entre PVPAP3/ACT e doses de P no genótipo comercial BAF115 nas condições de inoculação com <i>G. clarum</i> e FMAs nativos.....	98
Figura 19. Relação entre PVPAP3/ACT e doses de P no genótipo comercial BAF55 nas condições de inoculação com <i>G. clarum</i> e FMAs nativos.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização e coordenadas geográficas dos pontos de coleta de solo e raízes na região Meio-oeste e Oeste do estado de Santa Catarina.....	33
Tabela 2. Caracterização química e física do solo dos pontos de amostragem.....	34
Tabela 3. Origem e identificação das estirpes de rizobactérias diazotróficas endofíticas de raízes de feijoeiro selecionadas para caracterização fisiológica em laboratório.....	36
Tabela 4. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas em raízes de feijoeiro em Santa Catarina utilizando-se os meios semi-específicos NFB (para <i>A. lipoferum</i> e <i>A. brasiliense</i>), e LGI (para <i>A. amazonense</i>).....	43
Tabela 5. Produção de ácido indolacético (AIA), nitrogênio total (N total) e proteína por Bradford de estirpes em meios NFB e LGI em mg L ⁻¹	45
Tabela 6. Identificação das estirpes baseado nas seqüências de similares do 16S rRNA encontrados no GenBank (NCBI).....	48
Tabela 7. Resultado da análise de variância para a massa seca, teor de N, N acumulado e NMP, para os fatores de variação genótipo e inoculação com estirpes de rizobactérias.....	57
Tabela 8. Massa seca (g Pl ⁻¹), teor de N (%), N acumulado (mg Pl ⁻¹) e NMP (nº células g ⁻¹ de raiz) do genótipo de feijoeiro comercial (BAF115) e crioulo (BAF55).....	59
Tabela 9. Resultado da análise de variância para as características massa seca, teor de P, P acumulado na parte aérea, peso dos grãos, colonização micorrízica total, para os fatores Genótipo, Dose de P e inoculação com <i>G. clarum</i>	66
Tabela 10. Teores de P (%) na parte aérea dos genótipos de feijoeiro BAF115, BAF42 e BAF55 em função da inoculação com <i>G. clarum</i> e de doses de P aplicadas no solo.....	69
Tabela 11. Fósforo acumulado (mg Pl ⁻¹) na parte aérea dos genótipos de feijoeiro BAF115, BAF42 e BAF55 em função da inoculação com <i>G. clarum</i> e de doses de P adicionadas ao solo.....	70
Tabela 12. Efeito das doses de P e inoculação com <i>G. clarum</i> na colonização micorrízica (%) nas raízes dos genótipos de feijoeiro BAF115, BAF55 e BAF42.....	71
Tabela 13. Resultado da análise de variância dos dados da primeira coleta (28 dias) para produção de massa seca da parte aérea, teor de P na parte aérea, P acumulado e colonização micorrízica em plantas de feijoeiro para os fatores genótipo, inoculação com <i>G. clarum</i> e doses de P.....	80

Tabela 14. Teor de P na parte aérea (%) de genótipos de feijoeiro BAF115 e BAF55 inoculados com <i>G. clarum</i> em diferentes doses de P adicionadas ao solo na época de colheita aos 28 dias após o plantio.....	83
Tabela 15. Fósforo acumulado na parte aérea (mg por planta) de genótipos de feijoeiro BAF115 e BAF55 inoculados com <i>G. clarum</i> em diferentes doses de P adicionadas ao solo na época de colheita aos 28 dias após o plantio.....	84
Tabela 16. Efeito das doses de P e inoculação com <i>G. clarum</i> na colonização micorrízica (%) das raízes de feijoeiro dos genótipos BAF115 e BAF55 na época de colheita aos 28 dias após o plantio.....	85
Tabela 17. Resultado da análise de variância dos dados da segunda coleta (48 dias) para produção de massa seca da parte aérea, teor de P na parte aérea, P acumulado e colonização micorrízica em plantas de feijoeiro para os fatores genótipo, inoculação com <i>G. clarum</i> e doses de P.....	86
Tabela 18. Teor de P na parte aérea (%) de genótipos de feijoeiro BAF115 e BAF55 inoculados com <i>G. clarum</i> em diferentes doses de P adicionadas ao solo na época de colheita aos 48 dias após o plantio.....	88
Tabela 19. Fósforo acumulado na parte aérea (mg por planta) de genótipos de feijoeiro BAF115 e BAF55 inoculados com <i>G. clarum</i> em diferentes doses de P adicionadas ao solo na época de colheita aos 48 dias após o plantio.....	89
Tabela 20. Efeito das doses de P e inoculação com <i>G. clarum</i> na colonização micorrízica das raízes de feijoeiro dos genótipos BAF115 e BAF55 na época de colheita aos 48 dias após o plantio.....	90
Tabela 21. Valores da expressão gênica do gene PVPT e PVPAP3 em relação à Actina (ACT), para os fatores Dose de P e inoculação com <i>G. clarum</i> para o genótipo comercial BAF115 (Valente).....	99
Tabela 22. Valores da expressão gênica do gene PVPT e PVPAP3 em relação à Actina (ACT), para os fatores Dose de P e inoculação com <i>G. clarum</i> para o genótipo crioulo BAF55.....	99
Tabela 23. Resultado da análise de variância para massa seca da parte aérea (g Pl ⁻¹), teor de P (%) e P acumulado (mg Pl ⁻¹), teor de N (%) e N acumulado (mg Pl ⁻¹) em função dos tratamentos aplicados.....	108
Tabela 24. Produção de massa seca e P acumulados na parte aérea do genótipo comercial BAF115 de feijoeiro.....	109
Tabela 25. Resultados da análise de variância para comprimento de raiz (cm), Número de nódulos por planta e massa seca dos nódulos (mg)	109
Tabela 26. Número e massa seca (mg) de nódulos de rizóbio e comprimento de raiz (cm) de feijoeiro submetidos aos tratamentos de coinoculação de <i>G. clarum</i> e estirpes de rizobactérias.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT - Actina

AIA - Ácido Indol-Acético

AS - Ácido salicílico

BDA – Batata dextrose ágar

CAT - Catalase

CAV – Centro de Ciências Agroveterinárias

DNA – Ácido desoxirribonucléico

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

FMA – Fungo Micorrízico Arbuscular

IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná

MET – micélio externo total

MIPS - Myo-inositol-3-phosphate synthase

MO – Matéria Orgânica

NMP – Número Mais Provável

RNA – Ácido ribonucléico

RPM – Rotações por minuto

UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

PGPR - Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal).

PCR – Polymerase Chain Reaction (reação da polimerase em cadeia).

Pl - Planta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. A cultura do feijoeiro.....	21
2.2. Microrganismos do Solo.....	23
2.3. Referências Bibliográficas.....	25
3. CAPITULO 1 - Diversidade fisiológica e genética de rizobactérias isoladas de feijoeiros (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cultivados em pequenas propriedades do estado de Santa Catarina.....	29
 3.1. INTRODUÇÃO.....	30
 3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.2.1. Amostragem das raízes de feijoeiro.....	32
3.2.2. Caracterização das áreas de coletas.....	33
3.2.3. Estimativa do número mais provável de rizobactérias diazotróficas em raízes de feijoeiro.....	34
3.2.4. Diversidade fisiológica de estirpes de rizobactérias de raízes de feijoeiro.....	35
3.2.4.1. Testes de alcalinização e produção de catalase.....	36
3.2.4.2. Produção de ácido indolacético (AIA) <i>in vitro</i>	37
3.2.4.3. Avaliação da FBN <i>in vitro</i>	37
3.2.4.4. Teor de proteínas total.....	38
3.2.5. Diversidade genética de estirpes de rizobactérias de raízes de feijoeiro.....	39
3.2.5.1. Extração de DNA genômico total.....	39
3.2.5.2. Amplificação do PCR com oligonucleotídio específico BOX.....	40
3.2.5.3. Amplificação da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA.....	40
3.2.5.4. Seqüenciamento de produtos PCR de 16S rRNA gene.....	41
 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.3.1. Ocorrência de rizobactérias diazotróficas em raízes de feijoeiro.....	42
3.3.2. Diversidade fisiológica de estirpes de rizobactérias de raízes de feijoeiro.....	43
3.3.3. Diversidade genética de estirpes de rizobactérias de raízes de feijoeiro.....	45

3. 4. CONCLUSÕES.....	49
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
4. CAPÍTULO 2 - Efeito da inoculação de rizobactérias diazotróficas endofíticas na nutrição de genótipos crioulo e comercial de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	54
4.1. INTRODUÇÃO.....	55
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.4. CONCLUSÃO.....	59
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
5. CAPÍTULO 3 - Efeito da inoculação de <i>Glomus clarum</i> (Nicol. & Schenck) no crescimento e nutrição fosfatada de genótipos crioulo e comercial de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	62
5.1. INTRODUÇÃO.....	63
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.4. CONCLUSÃO.....	72
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
6. CAPÍTULO 4 - Nutrição fosfatada e expressão gênica em genótipos crioulo e comercial de feijoeiro inoculados com <i>Glomus clarum</i>	74
6.1. INTRODUÇÃO.....	76
6.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
6.3.1. Efeito da primeira época de coleta (28 dias após a semeadura).....	80
6.3.2. Efeito da segunda época de coleta (48 dias após a semeadura)	85
6.4. CONCLUSÃO.....	99
6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
7. CAPÍTULO 5 - Efeito da coinoculação de rizobactérias, rizóbio e <i>Glomus clarum</i> no crescimento e nutrição nitrogenada e fosfatada do feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	105

7.1. INTRODUÇÃO.....	106
7.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	107
7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
7.4. CONCLUSÃO.....	111
7.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	114

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente a cultura do feijoeiro ocupa uma área de mais de 4 milhões de ha no Brasil, sendo cultivada em safra (1º cultivo), safrinha (2º cultivo) e entre safra (3º cultivo), em diversos sistemas de manejo e graus tecnológicos. A diversidade no perfil dos produtores de feijão faz com que a cultura receba diferentes manejos e tecnologias empregadas proporcionando grandes diferenças de produtividade, sendo que os objetivos desta cultura para os produtores vão desde a subsistência até a alta lucratividade. Neste contexto, no estado de Santa Catarina, a cadeia produtiva do feijão tem importante participação, principalmente como fonte de renda para a agricultura familiar. Segundo estimativa do CEPA (2008) a agricultura familiar em Santa Catarina representa um universo de mais de 90 % da população rural, sendo responsável por 67 % da produção do feijão do estado, nestas condições é normal o uso de genótipos crioulos de feijoeiro, na qual a produção das sementes é realizada pelo próprio produtor e o uso de tecnologias como a inoculação com rizóbios e a aplicação de fertilizantes é raramente realizada de forma a obter o máximo potencial produtivo da cultura.

A inoculação com rizóbios, a adubação nitrogenada, correção da fertilidade e pH do solo, aplicação de fungicidas, inseticidas, herbicidas, uso de sementes de alta qualidade e de irrigação são algumas das técnicas agronômicas disponíveis que podem ser utilizadas no cultivo do feijoeiro com reflexos diretos sobre a produtividade. Atualmente muitos resultados de pesquisa demonstram a alta capacidade produtiva da cultura, que pode ultrapassar os 3.000 kg ha⁻¹ utilizando-se somente inoculação com rizóbios e sementes de genótipos crioulos. Os recursos biotecnológicos existentes para as culturas são extensos e podem ser utilizados para melhoria da nutrição e aumento da produtividade, como é o caso da fixação biológica do nitrogênio e do uso de bactérias rizosféricas na promoção do crescimento vegetal e no controle biológico de doenças e pragas. O uso destas e outras biotecnologias de forma integrada e conjunta, como a coinoculação de fungos micorrízicos arbusculares e rizóbios ou o uso de outras rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, pode incrementar a eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio e a nutrição mineral fosfatada na cultura do feijoeiro. Tais tecnologias podem aumentar a produtividade da cultura com um baixo investimento financeiro, sendo desta forma acessível aos pequenos produtores.

O conhecimento e estudo da diversidade dos microrganismos presentes no solo e na rizosfera tem papel fundamental para o entendimento das relações com as plantas e o meio ambiente. Dessa forma a especificidade das associações e interações entre os organismos que habitam o solo e a rizosfera é chave para o sucesso da inoculação e maximização dos benefícios para a produção vegetal. O estudo da interação entre genótipos das plantas, cepas de rizóbios, espécies de fungos micorrízicos e rizobactérias promotoras do crescimento vegetal deve ser realizado para que seja possível entender o funcionamento e planejar o uso destas biotecnologias a campo de forma correta.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a ocorrência e diversidade de rizobactérias em raízes de feijoeiro em pequenas propriedades do Oeste e Meio-oeste do estado de Santa Catarina e avaliar o potencial das estirpes de rizobactérias para uso como promotoras do crescimento vegetal e avaliar a resposta na nutrição e expressão gênica de genótipos crioulos de feijoeiro submetidos à inoculação com estirpes divergentes de rizobactérias e fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* (nicol. & schenck).

A tese está dividida em cinco capítulos, sendo o primeiro capítulo dedicado ao estudo de ocorrência e caracterização fisiológica e genética de estirpes de rizobactérias isoladas de raízes de feijoeiro. No segundo capítulo é apresentado um estudo da avaliação do efeito na nutrição de genótipos de feijoeiro da inoculação com estirpes de rizobactérias. O terceiro capítulo apresenta os resultados da avaliação na nutrição de genótipos crioulos e comerciais de feijoeiro submetidos a diferentes disponibilidades de P e inoculação com *G. Clarum*. No quarto capítulo é apresentado o estudo da expressão gênica e nutrição de genótipos de feijoeiro inoculados com *G. clarum* e conduzidos sob diferentes disponibilidades de P. No quinto e último capítulo é apresentado o estudo do efeito da interação entre *Rhizobium*, rizobactérias e FMA (*G. clarum*) na nutrição do feijoeiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura do feijoeiro

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) é uma das culturas mais difundidas no mundo, representando metade dos grãos de leguminosas consumidos (BROUGHTON et al., 2003). O feijoeiro é largamente consumido e participa da alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas na América Latina, no leste e sul da África. É originário do continente americano, nas regiões entre México e a Guatemala e na zona dos Andes (ZIMMERMANN & TEXEIRA, 1996). Essa leguminosa apresenta de 20 a 33% de proteína nos grãos e é considerado um alimento perfeito, pois apresenta aproximadamente o dobro do teor protéico da maioria dos cereais. O grão de feijão é rico em fibras e carboidratos, além de ser uma importante fonte de vitaminas hidrossolúveis, como a tiamina, a riboflavina, a niacina e a folacina (COSTA et al., 2000). Na safra 2010/2011 a área plantada com a cultura do feijoeiro no Brasil foi de mais de 4 milhões de ha, considerando três safras, ou épocas de colheita, sendo que para o estado de Santa Catarina a estimativa foi de 104 mil ha (CONAB, 2012). No cenário socioeconômico do estado de Santa Catarina, a cadeia produtiva do feijão tem importante participação, principalmente como fonte de renda para a agricultura familiar. Estima-se que a agricultura familiar em Santa Catarina representa um universo de mais de 90% da população rural, sendo responsável por 67% da produção do feijão do estado (CEPA, 2008).

Entre os sistemas biológicos envolvendo plantas e microrganismos, a simbiose leguminosas-rizóbios é a de maior expressão econômica. Em razão da importância econômica e social do feijoeiro no Brasil e da potencialidade e necessidade de incrementar sua produtividade (FRANCO et al. 2002). A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio no feijoeiro é uma tecnologia alternativa de baixo custo econômico e grande vantagem ambiental pouco explorada, outro importante componente da biota do solo que pode ser utilizado são os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) que formam associação mutualística com a maioria das plantas de interesse agrícola, com efeito, biofertilizante destacado em solos ácidos por sua contribuição na absorção de P (BASHAN & HOLGUIN, 1997; SCHALLMACH et al., 2000).

Os solos brasileiros, em geral, apresentam uma população abundante de rizóbios capazes de nodular e fixar N₂ em simbiose com o feijoeiro, em estudos avaliando a biodiversidade de rizóbios simbiontes do feijoeiro em Santa Catarina, observou-se que a diversidade genética intra-específica de rizóbios é elevada, com 91% dos isolados apresentando perfis únicos de DNA analisados por rep-PCR. Sendo que a composição de espécies de rizóbios consistiu de 17,1% de *Rhizobium tropici*, 35,9% de *R. etli*, 32,5% de *R. leguminosarum*, 1,7% de *R. giardinii* e 12,8% de perfis distintos, podendo representar novas espécies. No mesmo trabalho foi constatada correlação entre as espécies de rizóbios e características do solo: *R. tropici* ocorreu preferencialmente em solos mais ácidos, enquanto *R. leguminosarum* e *R. etli* apresentaram maior ocorrência em solos com pH mais elevado (STOCCO et al., 2008).

A inoculação com cepas de rizóbios selecionadas e recomendadas para cultura do feijoeiro aumenta a nodulação e a produtividade da cultura, mesmo em solos com alta população de rizóbios nativos (HUNGRIA et al., 2003). Em estudo para avaliar a resposta do feijoeiro à inoculação com rizóbio e ao parcelamento de fertilizante nitrogenado os autores observaram que a adubação com 20 kg ha⁻¹ de N no plantio, acrescida de inoculante com a estirpe de *R. tropici* CIAT 899, possibilitou a obtenção de rendimento de grãos na cultura de feijoeiro equivalente à aplicação de até 160 kg ha⁻¹ de N, evidenciando a sua importância para obtenção de maior rentabilidade na cultura do feijoeiro (PELEGREN et al., 2009).

O P é um nutriente limitante e as plantas têm enfrentado durante toda a evolução, desde a transição do ambiente aquático para o ambiente terrestre. Houve avanços significativos na identificação de como as plantas enfrentaram os desafios de aquisição e conservação do fosfato. No entanto, as respostas de riqueza de espécies de plantas e produção vegetal em condições limitantes de P só podem ser compreendidas quando as interações entre esta limitação com outros múltiplos recursos abióticos e interações bióticas são levados em consideração (CRAMER, 2010). Em estudos sobre a absorção e utilização do P pelas culturas da soja, feijoeiro e por plantas daninhas, Procópio et al. (2005) observaram que o maior teor de P nos tecidos vegetais foi constatado nas plantas de feijoeiro, e que estes foram em média três vezes maior que o teor observado para a soja, independente da quantidade de P aplicada no solo. Os mesmos autores concluíram que com o aumento na adição de P ao solo, a eficiência de utilização quando absorvido diminui para as plantas de soja e feijão (PROCÓPIO et al., 2005). As respostas da senescência foliar ao suprimento de P podem constituir estratégias adaptativas para o crescimento vegetal sob condições limitantes do nutriente. Resultados de estudos indicam que o suprimento de P no solo não afeta o estádio de

máximo número de folhas e o início da senescência foliar de plantas de feijoeiro; contudo, o estádio de máxima deposição de folhas senescentes ocorre mais cedo durante o ciclo de crescimento com o aumento do suprimento de P no solo (ARAÚJO et al., 2007). Os genótipos de feijoeiro apresentam diferenças quanto à capacidade e eficiência na absorção e utilização do P. Diferenças morfológicas podem ser observadas como alterações no sistema radicular em condições de P limitado; porém, apesar da análise detalhada de mecanismos adaptativos de deficiência de P em ambos os níveis genéticos e fisiológicos, não se sabe muito sobre a regulação molecular de respostas deficiência e limitação de P em feijoeiro (TIAN et al., 2007).

2.2. Microrganismos do Solo

Bactérias são organismos relativamente simples, microscópicos, cujo material genético não está envolvido por uma membrana nuclear (células procarióticas) e compreendem o grupo mais diverso e abundante dentre os organismos na terra (WHITMAN et al., 1998). Possuem importância indiscutível na sustentabilidade da biosfera e tem um papel preponderante nos ciclos biogeoquímicos (VIDEIRA et al., 2007). Nas plantas hospedeiras, os microrganismos são capazes de colonizar superfícies das raízes e folhas ou o interior de tecidos de plantas. Entre as bactérias associativas a espécies vegetais, as bactérias fixadoras de nitrogênio são consideradas como um dos grupos mais importantes na agricultura tropical pela sua associação com plantas leguminosas e não leguminosas (VIDEIRA et al., 2007). Vários fatores como temperatura, acidez do solo, teor de nutrientes e cultivar, interferem na eficiência simbiótica das estirpes de rizóbios em condições de campo. A fixação biológica de N₂ utilizando a inoculação de estirpes eficientes de *Rhizobium* em cultivar nodulante de feijoeiro ou seu cultivo em solos com população nativa eficiente pode possibilitar a suplementação ou até mesmo a não utilização de nitrogênio em cobertura na cultura do feijoeiro, sem perdas no rendimento da produtividade (MORAES et al. 2010).

Bactérias do gênero *Azospirillum* spp. convertem nitrogênio atmosférico em amônia sob condições microaerófilas e baixos níveis de nitrogênio, pela ação do complexo nitrogenase (STEENHOUDT et al., 2000). Quando benéficas, as bactérias que colonizam o sistema radicular e promove o crescimento vegetal são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em inglês plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), além do fato de fixarem N atmosférico. Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. são consideradas PGPR devido à sua capacidade de estimular o crescimento das plantas pela

produção de fitormônios, redução do potencial de membrana das raízes, síntese de enzimas, solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico. Indiretamente, promovem o crescimento vegetal reduzindo ou prevenindo a ação de microrganismos patogênicos, devido à produção de antibióticos ou sideróforos (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999). A capacidade de sintetizar auxinas é largamente observada em microrganismo do solo e associados a plantas. Estimativas apontam para 80% das bactérias isoladas da rizosfera com capacidade de produzir auxinas reguladoras de crescimento vegetal. A presença de auxinas determina aumento do comprimento da raiz e do número de pêlos e raízes laterais, alterações morfológicas da raiz, sendo conhecida por estimular tanto respostas rápidas como respostas lentas nas plantas. O mais importante fitormônio produzido por *Azospirillum* é a auxina ácido 3-indolacético (AIA) (DOBBELAERE et al., 2003; KUSS, 2006).

A atividade biológica do solo é um dos principais fatores que afetam a disponibilidade de P aos vegetais. Além do papel na mineralização do P orgânico, fungos e bactérias liberam ácidos orgânicos, resultantes do seu metabolismo, que alteram o pH do solo e auxiliam na solubilização de fosfatos de baixa solubilidade (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002; NAHAS, 1999). Em estudo sobre a diversidade de microrganismos do solo produtores de fosfatases encontrou-se número expressivo de bactérias ou de fungos produtores das fosfatases ácida ou alcalina, constituindo mais de 50% de bactérias ou de fungos totais. As bactérias e os fungos produtores de fosfatase alcalina são influenciados pela adubação fosfatada, aumentando quando adubadas com superfosfato. Apenas uma porcentagem inferior a 2% do total de microrganismos produtores das fosfatases apresentou alta atividade enzimática (NAHAS, 2002).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) apresentam um forte efeito sinérgico com as rizobactérias, com aumentos significativos na colonização e desenvolvimento da planta. No caso das bactérias fixadoras de nitrogênio, o efeito é consequência de uma melhor nutrição de P pelas plantas micorrizadas, o que acarreta maior e melhor nodulação e funcionamento da nitrogenase. Essa interação é maior quando existem condições de escassez de N e P (SILVEIRA, 1998). Mudanças na comunidade de FMAs podem acarretar alterações na composição da comunidade de plantas e vice-versa. Deste modo, o manejo agrícola pode atuar como pressão de seleção das populações de FMAs (SILVEIRA, 1998).

Compostos orgânicos como açúcares e ácidos, podem inibir ou estimular o crescimento micelial de FMAs. Ácidos orgânicos, como oxalacético, pirúvico, acético, cítrico e tartárico estimulam, enquanto aspáctico, succínico e málico, reduzem a germinação e o crescimento da hifa de FMAs. Alguns aminoácidos, em particular cistina, lisina e glicina

também estimulam o crescimento de FMAs, porém a maioria deles é inibitória ou pouco influencia no crescimento (SILVEIRA, 1998). O manejo e práticas que promovam distúrbios no solo, como aração e cobertura vegetal, afetam a densidade de esporos micorrízicos no solo e a colonização micorrízica em plantas de feijoeiro cultivados após estas práticas (OLIVEIRA & SANDERS, 1999).

Algumas plantas com sistema radicular pouco ramificado e escasso em pêlos absorventes apresentam acentuado micotrofismo, ou seja, dependem da associação com fungos micorrízicos para absorverem nutrientes e garantirem o crescimento (SILVEIRA, 1998). Em estudo avaliando a dependência micorrízica de mudas de mangaba (*Hancornia speciosa*) em doses crescentes de P, foi observado que as plantas inoculadas com dos fungos micorrízicos nativos produziram mais biomassa seca de parte aérea e raízes e apresentaram maior concentração e acúmulo de P na parte aérea. A maior dependência micorrízica relativa ocorreu com a inoculação de fungos micorrízicos nativos e as plantas com inoculação micorrízica não responderam à adição de P em doses acima de 50 mg kg⁻¹ (CARDOSO FILHO et al., 2008).

O sucesso da inoculação do feijoeiro com bactérias fixadoras de nitrogênio depende da aplicação correta do inoculante nas sementes. O tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas tem efeito negativo na sobrevivência das bactérias na semente e pode promover uma redução da nodulação, com conseqüente efeito negativo na produtividade. Os fungicidas disponíveis no mercado possuem diferenças na intensidade dos efeitos negativos sobre as bactérias e processo de fixação biológica do nitrogênio, desta forma os produtores devem evitar o uso de fungicidas altamente tóxicos e realizar o tratamento de sementes de forma correta, seguindo as recomendações dos fabricantes (ARAÚJO & ARAÚJO, 2006). Fatores ambientais afetam a diversidade de micro-organismos capazes de formar simbiose com o feijoeiro: a acidez do solo, temperatura e déficit hídrico assim como o manejo do solo influenciam no processo de fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA & VARGAS, 2000; STOCCO et al., 2008). Um processo de seleção de cepas de rizóbios que leve em consideração as características do solo e fatores climáticos pode representar um caminho para a utilização de cepas com maior eficiência e que sejam mais adaptadas ao ambiente.

2.3. Referências Bibliográficas

ARAÚJO, A.S.F. & ARAÚJO, R.S.; Sobrevivência e nodulação do *Rhizobium tropici* em sementes de feijão tratadas com fungicidas. *Ciência Rural*, v.36, n.3, mai-jun, 2006.

- ARAÚJO, A.P.; KUBOTA, F.Y. & TEIXEIRA, M.G.; Leaf senescence of common bean plants as affected by soil phosphorus supply. **R. Bras. Ci. Solo**, 31:499-506, 2007.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Can. J. Microbiol.**, n. 43, p. 103-121, 1997.
- BROUGHTON, W. G.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.
- CARDOSO FILHO, J.A.; LEMOS, E.E.P.; SANTOS, T.M.C.; CAETANO, L.C. & NOGUEIRA, M.A.; Mycorrhizal dependency of mangaba tree under increasing phosphorus levels. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v.43, n.7, p.887-892, jul. 2008.
- CEPA (Centro de Socioeconômica e Planejamento Agrícola - Epagri), Santa Catarina, Disponível em <<http://cepa.epagri.sc.gov.br>>. Acesso em 10 de jan. de 2008.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>> Séries históricas – Feijão. Acessado em 10 de janeiro de 2012.
- COSTA, H.S.; RIOS-RUIZ, W.F.; LAMBAIS, M.R.; Salicylic acid inhibits arbuscular mycorrhizae formation and changes chitinase and b-1,3-glucanase expression in bean roots. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 57, n.1, 2000.
- CRAMER, M.D.; Phosphate as a limiting resource: introduction. **Plant Soil**, 334:1–10, 2010.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.
- FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C. & TSAI, S.M.; Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1145-1150, ago. 2002.
- GARCIA, M.R.L.; MELLO, L.M.M. & CASSIOLATO, A.M.R. Variáveis microbiológicas e produtividade do feijoeiro sob diferentes manejos do solo e calagem. **Pesq. agropec. bras.** vol.39, no.10, Brasília. 2004.
- HUNGRIA, M. & VARGAS, M.A.T.; Environmental factors affecting N₂ Fxation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, N.65. 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J & MENDES, I.C.; Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biol Fertil Soils**, 2003.
- KUSS, A.V.; Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. (**Tese de doutorado**), Santa Maria – RS. 2006.

MORAES, W.B.; MARTINS FILHO, S.; GARCIA, G.O.; CAETANO, S.P.; MORAES, W.B. & COSMI, F.C.; Avaliação da fixação biológica do nitrogênio em genótipos de feijoeiros tolerantes a seca. **IDESIA** (Chile) Volumen 28, N°1, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002.

NAHAS, E.; Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 3, 267-275, 2002.

NAHAS, E. Solubilização microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, U.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Ufla, 1999. p. 467-486.

OLIVEIRA, A.A.R. & SANDERS, F.E.; Effect of management practices on mycorrhizal infection, growth and dry matter partitioning in field-grown bean. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.34, n.7, p.1247-1254, jul. 1999.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F.M.; OTSUBO, I.M.N. & OTSUBO, A.A.; Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **R. Bras. Ci. Solo**, 33:219-226, 2009.

PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J.B.; PIRES, F.R.; SILVA, A.A.; MENDONÇA, E.S. Absorção e utilização do fósforo pelas culturas da soja e do feijão e por plantas daninhas, **R. Bras. Ci. Solo**. 29:911-921, 2005.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances** v. 17, p. 319 – 339, 1999.

SCHALLMACH, E.; MINZ, D.; JURKEVITCH, E. Culture-independent detection of changes in root-associated bacterial populations of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) following nitrogen depletion. **Microb Ecol**, n. 40, p. 309-316, 2000.

SILVEIRA, A.P.D.; Ecología de fungos micorrízicos arbusculares. **Ecología microbiana**. Embrapa. Jaguariúna, 1998.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 24, p.487 - 506, 2000.

STOCO, P.; SANTOS, J.C.P.; VARGAS, V.P. & HUNGRIA, M.; Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiontes do feijoeiro (*phaseolus vulgaris l.*) em santa catarina. **R. Bras. Ci. Solo**, 32:1107-1120, 2008.

TIAN, J.; VENKATACHALAM, P.; LIAO, H.; YAN, X. & RAGHOTHAMA, K.; Molecular cloning and characterization of phosphorus starvation responsive genes in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). **Planta**, 227:151–165. 2007.

VIDEIRA, S. S.; ARAUJO, J.L.S., BALDANI, V.L.D., Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, **Documento, 234**. 2007.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Procariotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the united State of American**, Washington, v. 95, p. 6578-6583, 1998

ZIMMERMANN, M. J. de O.; TEIXEIRA, M. G. Origem e evolução. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAPOS, 1996.

3. CAPITULO 1 - Diversidade fisiológica e genética de rizobactérias isoladas de feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados em pequenas propriedades do estado de Santa Catarina.

RESUMO: A fixação biológica de nitrogênio é realizada por representantes de diversos grupos filogenéticos bacterianos. Estas bactérias podem viver livres em diversos ecossistemas, estabelecer simbioses ou estar associados às plantas, sendo neste último caso denominados de diazotróficas associativas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência e caracterizar a diversidade fisiológica e genética de rizobactérias das raízes de genótipos de feijoeiros cultivados em pequenas propriedades da região Meio-Oeste e Oeste do estado de Santa Catarina. Os resultados mostraram uma alta densidade de rizobactérias nas raízes de feijoeiro amostradas com valores que variaram entre $3,85 \times 10^5$ a $1,36 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca, com o isolamento e caracterização fisiológica das estirpes foi possível observar o potencial na produção de auxina e fixação biológica de nitrogênio, nos testes realizados *in vitro* as estirpes Fe34 e Fe22 se destacaram na produção de auxinas com valores de 33,72 e 30,47 mg de AIA L^{-1} respectivamente. Para a FBN as estirpes Fe22 e Fe27 apresentaram os melhores valores de 33,25 e 27,85 mg de N L^{-1} , respectivamente. A identificação das estirpes de rizobactérias de raízes de feijoeiro demonstram a presença de rizobactérias do gênero *Pseudomonas* sp.; *Rhizobium* sp.; *Pseudomonas moraviensis* e *Stenotrophomonas maltophilia*. O seqüenciamento das estirpes permitiu observar que existe um predomínio do gênero *Pseudomonas* sp.: 13 de um total de 15 estirpes.

PALAVRAS-CHAVE: *Phaseolus vulgaris*, Rizobactérias, Diversidade genética, *Pseudomonas*.

ABSTRACT: The biological nitrogen fixation is carried out by representatives of different phylogenetic groups of bacteria. These bacteria may be safe in ecosystems, establish symbioses or plants to be associated, in the latter case called diazotrophic. The aim of this study was to evaluate the occurrence and characterize the physiological and genetic diversity of rhizobacteria from the roots of common bean genotypes grown in small farms of the Midwest and West of the state of Santa Catarina. The results showed a high density of

rhizobacteria in bean roots sampled with values ranging from 3.85×10^5 to 1.36×10^8 cells g⁻¹ fresh weight, with the isolation and physiological characterization of the strains was possible to observe the potential in auxin production and biological nitrogen fixation, in tests *in vitro* strains Fe34 and Fe22 highlighted in the production of auxin with values of 33.72 and 30.47 mg AIA L⁻¹, respectively. For FBN strains Fe22 and Fe27 showed the best values of 33.25 and 27.85 mg N L⁻¹, respectively. The identification of strains of rhizobacteria from roots of bean plants demonstrated the presence of the rhizobacteria *Pseudomonas* sp. *Rhizobium* sp. *Pseudomonas Moraviensis* and *Stenotrophomonas maltophilia*. The sequencing of the strains allowed us to observe that there is a predominance of *Pseudomonas* sp.: 13 out of 15 strains

KEYWORDS: *Phaseolus vulgaris*, Rhizobacteria, Genetic diversity, *Pseudomonas*.

3.1. INTRODUÇÃO

A biota do solo e seus processos oferecem várias alternativas para o desenvolvimento de biotecnologias capazes de aumentar a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, reduzindo a aplicação de fertilizantes químicos (DÖBEREINER, 1990). Na rizosfera das plantas ou endofiticamente são encontrados diversos grupos filogenéticos bacterianos, com capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), neste caso são denominados diazotróficos, de produção de auxinas e outros promotores de crescimento. Estas bactérias podem viver livres em diversos ecossistemas, estabelecer simbioses ou estar associados às plantas, sendo neste ultimo caso denominados de diazotróficas associativas. As bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o crescimento vegetal não só pelo fornecimento de nitrogênio, mas também por outros mecanismos como produção de fito-hormônio, solubilização de fosfatos, antagonismo a fito-patógeno, entre outros (MOREIRA et al., 2010). A colonização endofítica de *Azospirillum* é vantajosa porque essas bactérias são capazes de colonizar o interior da planta sem invadir os tecidos vasculares ou o interior das células, contribuindo para o desenvolvimento do vegetal por meio da FBN e de mecanismos de promoção de crescimento, sem causar nenhum sintoma de doença (BALDANI & BALDANI, 2005; RODRIGUES, 2004). A produção de fito-hormônio pelas rizobactérias promotoras de crescimento pode potencializar o efeito positivo das micorrizas e aumentar a nodulação por bactérias fixadoras de nitrogênio; além disso, a regulação hormonal das plantas também pode ser afetada pelas das rizobactérias (DODD et al., 2010).

A identificação desses microrganismos é feita tradicionalmente *in vitro*, com base nas características morfológicas e fisiológicas sob condição de cultivo. Entretanto, os resultados

obtidos nem sempre são conclusivos, principalmente quando ocorrem novos gêneros e/ou espécies. Desse modo, ao longo dos tempos, diversas técnicas de biologia molecular vêm sendo desenvolvidas no intuito de classificar e identificar, com rapidez, simplicidade e precisão, diferentes espécies bacterianas, assim como avaliar a contribuição direta e/ou indireta dos microrganismos para as plantas (DOBBELAERE et al., 2003). A variabilidade genética de microrganismos pode ser detectada por análise do fenótipo ou por marcadores moleculares. A primeira, considerada clássica, baseia-se na caracterização morfológica ou bioquímica, restringindo os estudos em populações. As técnicas moleculares, por sua vez, fornecem ferramentas para evidenciar e entender melhor diversos aspectos relacionados diretamente ou indiretamente ao DNA. Desta forma, a análise dos ácidos nucléicos vem sendo amplamente utilizada na diferenciação de indivíduos e no esclarecimento filogenético dos organismos estudados (FERREIRA, 2000). Considerando que várias bactérias associativas ou de vida livre podem ser isoladas a partir de meios semi-sólidos livres de N e que apenas as caracterizações fenotípicas e fisiológicas desses microrganismos não são suficientes para a identificação completa de uma espécie, é importante a utilização de técnicas mais acuradas de análise a nível molecular que auxiliem na identificação desses organismos e que, aliadas às demais caracterizações tradicionais, possibilitem o estudo da sua biodiversidade (KIRCHHOF et al., 1997).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular que permitem a caracterização de microrganismos a partir do DNA e do RNA proporcionou avanços nos estudos de ecologia microbiana e abriram as portas para um novo campo interdisciplinar atualmente conhecido como Ecologia Molecular Microbiana. A extração do DNA possibilita a obtenção de várias informações genéticas sobre uma espécie, enquanto os métodos de extração do RNA auxiliam o estudo da atividade de uma determinada comunidade microbiana (ROSADO et al., 1997). As metodologias moleculares com base no DNA são mais específicas, rápidas e sensíveis e são utilizadas sozinhas ou em combinação com outras ferramentas. Essas técnicas moleculares, principalmente a reação de polimerização em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) vêm causando enorme impacto na pesquisa científica, sendo a reação de PCR a de maior aplicabilidade nas diferentes áreas da agricultura (GUIMARÃES, & SÁ, 2002). Juntamente com os estudos que envolvem o DNA, como polimorfismos de DNA, a análise da região 16S do RNA ribossômico, cujos genes são os rDNAs, tem sido adotada como ferramenta para identificação de gêneros bacterianos existentes em determinados ambientes devido ao seu alto grau de conservação e também por gerar grande quantidade de informações úteis para análises filogenéticas (REIS JÚNIOR et al., 2002).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência e caracterizar a diversidade fisiológica e genética de rizobactérias das raízes de genótipos de feijoeiros utilizados em pequenas propriedades da Região Meio-oeste e Oeste do estado de SC.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Amostragem das raízes de feijoeiro

Para o estudo da ocorrência e diversidade de rizobactérias em raízes de feijoeiro foram selecionadas aleatoriamente 11 áreas em 10 municípios das regiões Meio-oeste e Oeste Catarinense (Figura 1), com plantios de genótipos crioulos e comerciais de feijoeiro. A amostragem foi realizada entre os dias 03 e 04 de abril de 2008, em pequenas propriedades rurais onde o feijoeiro é cultivado para consumo de subsistência e com emprego de baixas tecnologias e investimentos. As áreas foram georreferenciadas e as informações estão dispostas na Tabela 1.

Em cada área foram coletadas raízes e solo de oito plantas selecionadas de forma aleatória. As plantas de feijoeiro se apresentavam no inicio do florescimento no momento da coleta. As amostras de raízes e de solo foram acondicionadas em caixa térmicas e transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Fauna do Solo de Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), para os procedimentos seguintes.

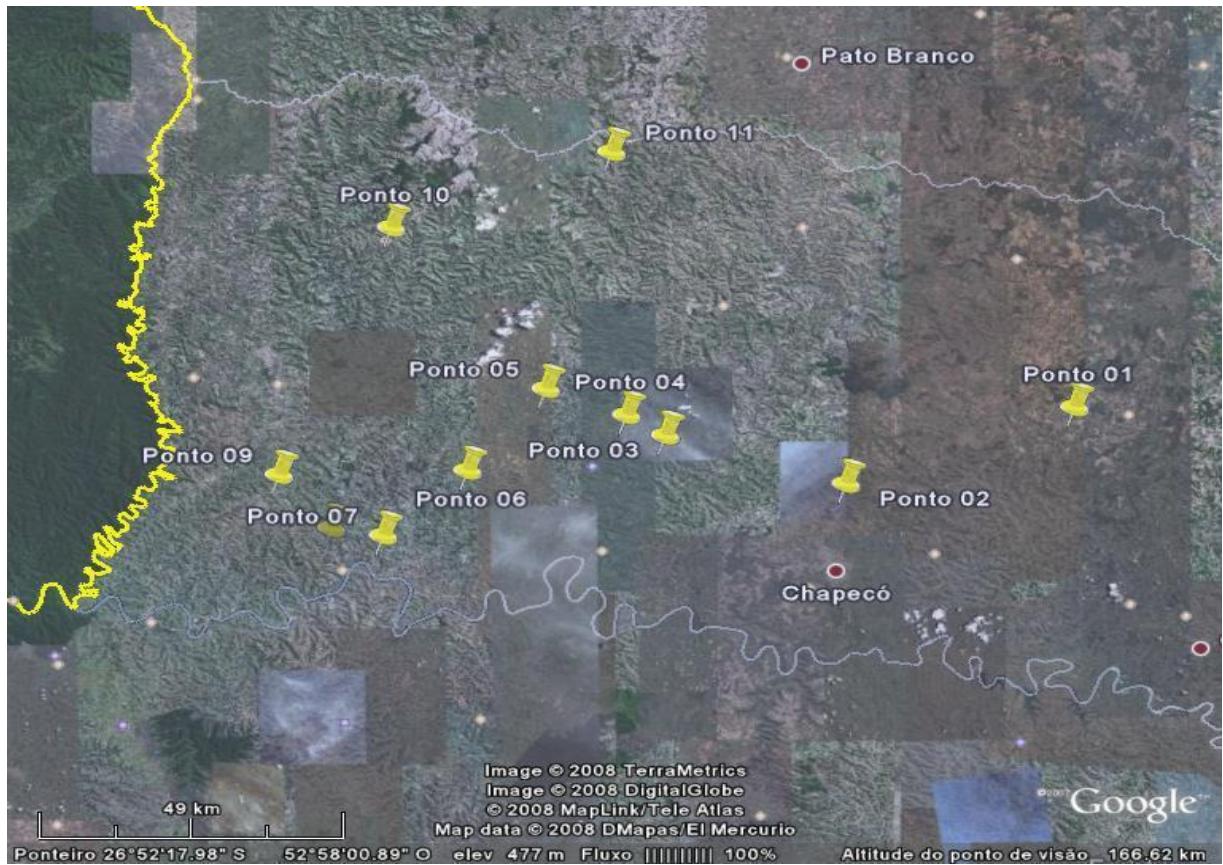


Figura 1. Imagem de satélite dos pontos de coleta na região Meio-oeste e Oeste do estado de Santa Catarina (GOOGLE, 2010).

Tabela 1. Localização e coordenadas geográficas dos pontos de coleta de solo e raízes na região Meio-oeste e Oeste do estado de Santa Catarina.

Área	Local de Origem	Altitude	Coordenadas	
			S	W
1	Faxinal dos Guedes	1008 m	26° 51' 19,9"	52° 14' 54,5"
2	Cordilheira Alta	744 m	26° 59' 18,7"	52° 36' 39,3"
3	Pinhalzinho (1)	464 m	26° 54' 20,2"	52° 53' 55,6"
4	Pinhalzinho (2)	547 m	26° 52' 14,3"	52° 57' 38,1"
5	Saudades	477 m	26° 49' 31,8"	53° 05' 20,4"
6	Caibi	419 m	26° 57' 58,4"	53° 12' 51,2"
7	Riqueza	289 m	27° 04' 41,9"	53° 20' 58,4"
8	Mondaí	218 m	27° 03' 54,9"	53° 25' 56,6"
9	Iporã	561 m	26° 58' 21,9"	53° 30' 55,9"
10	Anchieta	679 m	26° 32' 48,6"	53° 20' 04,6"
11	Campo Erê	690 m	26° 25' 03,7"	52° 59' 04,4"

3.2.2. Caracterização das áreas de coletas

Parte das amostras de solo foi seca a sombra, peneiradas em malha de 2 mm e submetidas análise das seguintes características físicas e químicas: teor de argila, teor de

matéria orgânica (MO), pH, Índice SMP, teores de nitrogênio total (Nt) fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca), magnésio (Mg), alumínio (Al) e a CTC efetiva do solo, conforme Tedesco et al. (1995). O teor de P disponível no solo foi determinado pelo método do extrator duplo ácido (Mehlich) e por colorimetria, o teor de K disponível no solo foi determinado no fotômetro de chama, os teores de Ca e Mg foram determinados por espectrofotometria de absorção (TEDESCO et al., 1995).

Tabela 2. Caracterização química e física do solo dos pontos de amostragem.

Local de Origem	pH-H ₂ O	Índice SMP	cmolc dm ⁻³				MO	Argila	%			mg dm ⁻³		
			Ca	Mg	Al	H+Al			P	Na	K			
Faxinal dos Guedes	4,7	5,4	3,77	1,60	1,16	8,70	7,39	6,6	35	23,3	13	335		
Cordilheira Alta	4,8	5,5	14,62	9,81	1,38	7,70	26,91	3,0	18	77,5	16	432		
Pinhalzinho (1)	5,0	5,6	2,64	4,00	0,58	6,90	7,88	3,7	20	33,5	12	257		
Pinhalzinho (2)	6,0	6,6	7,82	3,75	0,00	2,20	13,18	8,3	25	42,7	15	629		
Saudade	4,8	5,3	9,44	4,69	2,02	9,70	16,96	4,2	34	13,5	11	317		
Caibi	5,4	5,5	9,17	2,49	0,28	7,70	12,31	3,2	15	4,9	14	146		
Riqueza	5,4	5,7	4,99	2,55	0,31	6,20	9,03	7,4	21	3,6	13	462		
Mondaí	5,6	6,0	6,49	5,40	0,00	4,40	12,22	3,4	34	5,6	28	128		
Iporã	5,5	6,5	5,81	2,99	0,00	2,50	9,50	3,6	18	11,5	10	272		
Anchieta	6,1	6,5	16,35	6,37	0,00	2,50	23,85	2,9	15	15,6	33	441		
Campo Erê	5,7	6,3	14,53	9,00	0,00	3,10	24,51	2,6	24	32,2	20	384		

3.2.3. Estimativa do número mais provável de rizobactérias diazotróficas em raízes de feijoeiro

Para o isolamento e avaliação da ocorrência de rizobactérias endofíticas, 10 g de raízes lavadas em água destilada, foram desinfetadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio (1%) por 30 segundos, e lavadas novamente com água destilada. Em seguida as raízes foram trituradas em 90 mL de solução de sacarose (4%) por um minuto, utilizando um liquidificador do tipo “mixer”. A seguir foram realizadas diluições decimais seriadas de 10⁻¹ até 10⁻⁷ das quais três replicatas de 100 µL das diluições 10⁻² a 10⁻⁷ foram inoculados em frascos contendo 5 mL de meio NFb e LGI semi-sólido (DÖBEREINER et. al., 1995). Os frascos foram incubados em incubador tipo BOD a 32 °C por quatro a sete dias até a formação de película aerotáxica. Foram considerados como positivos os frascos com a

película aerotáxica característica de rizobactérias diazotróficas. Calculou-se então o número mais provável (NMP) de bactérias por grama de raízes utilizando a tabela de McCrady (DÖBEREINER et. al., 1995). Os resultados dos testes de NMP para os meios LGI e NFb foram submetidos a análise de variância pelo teste “F” e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Os frascos que apresentaram a película aerotáxica típica do crescimento de diazotróficos micro-areofílicos foram utilizados para o isolamento e obtenção de culturas puras de rizobactérias. Para isto, as bactérias nas películas foram replicadas para placas de Petri contendo os meios semi-específicos LGI e NFb sólidos e incubadas a 32 °C por dez dias. As colônias bacterianas observadas nas placas foram submetidas novamente ao crescimento em meio semi-sólido LGI e NFb para confirmar a capacidade de formar película aerotáxica. Os frascos que apresentaram formação de películas foram por fim submetidos a novo crescimento em meio sólido LGI e NFb e as colônias obtidas por meio de estriamento foram purificadas pelo crescimento em placas de Petri com meio batata (BDA) duas vezes. Como as bactérias diazotróficas, especialmente as do gênero *Azospirillum*, são gram-negativas, as estirpes obtidas foram caracterizados bioquimicamente pelo teste de coloração Gram, seguindo o protocolo sugerido por Yano et al. (1991).

As placas com estirpes gram-negativas tiveram suas colônias transferidas para tubos de ensaio com tampa rosqueável (uma colônia por tubo) contendo meio batata (BDA) inclinado, em triplicatas, e incubado por três dias. Para estocagem, as culturas foram cobertas com meio batata (VIDEIRA et al., 2007) mais glicerol (50%), e então os tubos foram vedados, identificados e armazenados em refrigerador.

As estirpes obtidas foram incluídas na Coleção de Bactérias Diazotróficas Promotoras de Crescimento do CAV/UDESC, que está integrada à “Rede Centro-Sul para a manutenção, bio-prospecção e caracterização da biodiversidade de coleção de culturas e de genes de bactérias de importância agroindustrial: diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas”, sob coordenação da Embrapa Soja.

3.2.4. Diversidade fisiológica de estirpes de rizobactérias de raízes de feijoeiro

A partir do estudo de ocorrência foi possível obter 69 estirpes de rizobactérias endofíticas diazotróficas de 10 áreas de plantio de feijoeiro. Durante o processo de isolamento e obtenção de culturas puras não foi possível obter estirpes da área de Caibi. As estirpes receberam a nomenclatura “Fe” indicando a origem em plantas de Feijoeiro, seguido de uma

numeração que indica a seqüência da obtenção de estirpes dos testes de ocorrência e inclusão no banco de bactérias diazotróficas do Laboratório de biologia e fauna do solo do Centro de Ciência Agroveterinárias da UDESC. Destas 10 áreas de plantio duas a três estirpes de rizobactérias endofíticas foram selecionadas para caracterização fisiológica em laboratório (Tabela 3).

Tabela 3. Origem e identificação das estirpes de rizobactérias diazotróficas endofíticas de raízes de feijoeiro selecionadas para caracterização fisiológica em laboratório.

Local de Origem	Estirpes	Meio cultivo
Anchieta	Fe 27 e Fe 57	NFb e LGI
Campo Erê	Fe 10, Fe 25 e Fe 53	LGI, NFb e LGI
Cordilheira Alta	Fe 29 e Fe 34	NFb e LGI
Faxinal dos Guedes	Fe 22 e Fe 35	NFb e LGI
Iporã	Fe 12 e Fe 55	NFb e LGI
Mondaí	Fe 05 e Fe 32	LGI e NFb
Pinhalzinho (1)	Fe 26 e Fe 46	NFb e LGI
Pinhalzinho (2)	Fe 03 e Fe 66	LGI e NFb
Riqueza	Fe 17 e Fe 68	LGI e NFb
Saudade	Fe 08 e Fe 51	NFb e LGI

Parte da caracterização fisiológica e toda a caracterização genética das estirpes deste estudo foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), sob coordenação da Dra. Diva de Souza Andrade.

Para as caracterizações foram utilizadas como estirpes referência os microrganismos *Azospirillum lipoferum* (BR11080) e *Azospirillum brasiliense* (BR11001), estirpes e caracterizados pela EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, RJ.

3.2.4.1. Testes de alcalinização e produção de catalase

As estirpes de rizobactérias endofíticas do feijoeiro foram inoculados em 5 mL de meio de cultura semi-sólido NFb contendo 5 g de ácido málico; 5 mL (solução 10%) de fosfato de potássio; 2 mL (solução 10%) de sulfato de magnésio; 1 mL (solução 10%) de cloreto de sódio; 2 mL (solução 1%) de cloreto de cálcio; 2 mL (solução 0,5% em 0,2N de KOH); 4 mL (solução 1,64%) de FeEDTA; 2 mL de solução de micronutriente pra meio de cultura; 3,5 g L⁻¹ de Agar em 1000 mL de água com o pH ajustado para 6,5 a 6,8 (BALDANI & DÖBEREINER, 1980), após sete dias em estufa a 28 °C registrou-se a mudança ou não da coloração do meio de cultura para avaliação da alteração de pH, sendo a coloração amarela: reação ácida; sem alteração da cor (verde): reação neutra e coloração azul: reação alcalina. No

mesmo tubo, avaliaram-se as estirpes quanto à produção de catalase, colocando-se uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% sobre as amostras de cultura e esfregada com auxílio de um bastão de vidro, sendo a produção de bolhas uma reação positiva.

3.2.4.2. Produção de ácido indolacético (AIA) *in vitro*

A avaliação da capacidade de produção de AIA *in vitro* pelas estirpes foi realizada com base na metodologia proposta por Asghar et al. (2002). As estirpes bacterianas foram inoculadas em meio de cultura DYGS líquido e mantidas em agitação orbital a 105 rpm a 28 °C. Após 48 horas as culturas foram padronizadas para uma densidade óptica de 0,5 em um comprimento de onda de 625nm. Em seguida alíquotas de 1 mL das suspensões bacterianas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,85% estéril e centrifugada novamente, repetindo-se o processo de lavagem das células por três vezes. Inoculou-se 1 mL da suspensão de células em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura Tris-YMRT modificado, contendo 10 g de manitol; 0,15 de cloreto de cálcio; 0,25 g de sulfato de magnésio; 1,21 g de tris (hidroximetil) amino metano; 0,2 g de extrato de levedura; 1,0 g de ácido casamino em 1.000 mL de água destilada com o pH ajustado para 6,8 na presença de 0,3nM de triptofano adicionado ao meio de cultura após autoclavagem e com filtro esterilizado (2 µm). Os tratamentos foram distribuídos ao acaso com três repetições e prova em branco. Avaliou-se a produção de AIA após dez dias de incubação a 28 °C no escuro segundo Gordon & Weber (1951), modificado por Minamisawa et al., (1992) o método consiste na adição de duas parte de cloreto de ferro III ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,01M), diluído em 35% de ácido perclórico ($HClO_4$) para uma parte da cultura de bactérias e após 25 minutos em ambiente escuro faz-se a leitura em espectrofotômetro para um comprimento de onda de 530 nm. A quantificação da AIA foi obtida através de uma curva padrão com concentrações de 0 a 200 µM de AIA determinada a partir de uma solução estoque de 5000 µM de AIA.

3.2.4.3. Avaliação da FBN *in vitro*

A avaliação da capacidade de FBN *in vitro* seguiu metodologia descrita por Soares et al. (2006). As estirpes foram inoculadas em meio de cultura DYGS líquido contendo, 2 g de glicose; 2 g de ácido málico; 1,5 g de peptona bacteriológica; 2 g de extrato de levedura; 0,5 g de fosfato de potássio; 0,5 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de ácido glutâmico em 1.000 mL

de água destilada, com o pH ajustado para 6,8 (RODRIGUEZ NETO et al., 1986) sob agitação orbital a 105 rpm a 28 °C. Após o crescimento por dois dias no escuro as suspensões bacterianas foram padronizadas para uma densidade óptica de 0,5 em um comprimento de onda de 600 nm (aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹). Em seguida, alíquotas de 600 µL da suspensão foram inoculadas em frascos contendo 10 mL de meio NFB e LGI semi-sólidos em triplicatas e incubados a 28 °C por cinco dias. Após o crescimento bacteriano, procedeu-se à ruptura das células para liberação do conteúdo aquecendo os tubos em microondas por 1 minuto por frasco. Da solução resultante (meio + conteúdo celular) foram vertidos 9,5 mL em tubos para digestão pelo método semi-micro Kjeldhal (TEDESCO et al., 1995). Para digestão, adicionaram-se a cada tubo contendo as células lisadas 0,7 g de mistura de digestão (100 g Na₂SO₄ + 10 g CuSO₄.5H₂O), 1 mL de H₂O₂ e 2 mL de H₂SO₄, nesta ordem. Os tubos foram aquecidos em bloco digestor overnight a 180 °C, sendo a temperatura então elevada gradualmente para 360 °C e mantida até que a mistura apresentasse a cor verde palha. Ao atingir a cor e com o resfriamento dos tubos, completou-se o volume com água destilada para 10 mL. Como controle, utilizou-se meio de cultura não inoculado. Em seguida foi corrigido o pH entre 3 e 4 com soluções de hidróxido de sódio (NaOH 1M e 6M) e ácido clorídrico (HCl 1M e 6M) e posteriormente o volume ajustado para 30 mL.

Avaliou-se a concentração de nitrogênio total (N), segundo a técnica da espectrofometria com azul de salicílico, que consiste em pipetar em tubos de ensaio 1 mL da amostra digerida; 6 mL de água destilada; 1 mL de solução de ácido salicílico 5%; 1 mL de solução de nitroprussiato de sódio 0,1% e 1 mL de solução de hipoclorito de sódio 0,15%. Após 60 minutos faz-se a leitura em espectrofotômetro para um comprimento de onda de 697 nm.

A quantificação do N foi obtida através de uma curva padrão com concentrações de 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 ppm de N determinada a partir de uma solução estoque de 100 ppm de N. Por meio de correlações do N no meio de cultivo se estima a FBN das estirpes.

3.2.4.4. Teor de proteínas total

A determinação do teor de proteínas nas células bacterianas foi realizada segundo Bradford (1976). Para isto, as estirpes foram inoculados em meio de cultura DYGS líquido e mantidos em agitação orbital a 105 rpm a 28 °C por dois dias. Após o crescimento, as culturas foram padronizadas para uma densidade óptica de 0,5 em um comprimento de onda de 595 nm (aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹). Em seguida foram inoculados em frascos contendo 10

mL de meio NFB semi-sólido (BALDANI & DÖBEREINER, 1980) incubados a 28 °C por cinco dias. Após o crescimento bacteriano, procedeu-se à ruptura das células para liberação do conteúdo aquecendo os tubos em microondas por 1 minuto por frasco. Da solução resultante (meio + conteúdo celular), alíquotas de 200 µL de cada amostra de meio NFb com bactérias crescidas e lisadas foram adicionadas em 2 mL de solução de Comassie Blue G-250. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm.

3.2.5. Diversidade genética de estirpes de rizobactérias de raízes de feijoeiro

3.2.5.1. Extração de DNA genômico total

As estirpes estudadas foram crescidas em tubos de ensaio com 5 mL de meio de cultura líquido DYGS(RODRIGUEZ NETO et al., 1986) e mantidos em agitação orbital de 105 rpm a 28 °C. Após crescimento, 1,5 mL das suspensões bacterianas foram transferidas para tubos tipo “eppendorfs” e centrifugadas a 14.000 rpm durante 2 minutos e lavadas uma vez com água destilada autoclavada. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 567 µL de TE50 (solução Tris/HCl 50 mM pH 7,4 + 10 mM de EDTA pH 8,0). Após a adição de 30 µL de SDS 10 %, e de 3 µL proteinase K (20 mg mL⁻¹ de água, mantida a -18 °C), as amostras foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Após esse período, as amostras foram homogeneizadas por agitação vigorosa em vórtex para retirar a viscosidade. Foram acrescentadas soluções de 100 µL NaCl 5 M e 80 µL de solução CTBA/NaCl (4,1g NaCl e 10 g de CTAB em 100mL de água), agitou-se vigorosamente e incubou-se por 10 minutos a 65 °C. Foi adicionado nas amostras 500 µL de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (25:24:1), agitou-se no vórtex e centrifugou-se a 14.000 rpm durante 10 minutos, recolhendo-se 500 µL do sobrenadante após adição de 500 µL de Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), os nódulos foram agitados no vórtex e centrifugados por 6 minutos a 14.000 rpm, em seguida transferiu-se 400 µL do sobrenadante para novos tubos “eppendorfs” e adicionou-se 360 µL de isopropanol para precipitação do DNA. Lentamente inverteu-se o eppendorf para precipitar e tornar visível o DNA. As amostras foram armazenadas por uma noite no freezer à -18 °C.

As amostras foram retiradas do freezer, deixadas por 10 minutos em temperatura ambiente; centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 800 µL de etanol gelado a 70 % para lavar o DNA precipitado, retirando o excesso de sais. As amostras foram novamente centrifugadas e, após secagem em temperatura ambiente, os precipitados foram ressuspensos em 120 µL de TE 10:1 (10 mM Tris-HCl;

1mM EDTA, pH 8.0). As soluções de NaCl, Tris-HCl, EDTA Na2, SDS, e TE usadas na extração do DNA foram previamente autoclavadas.

As amostras de DNA foram corridas em gel de agarose de 8 x 20 cm a 0,9 % em tampão TBE 1X (10,8 mL de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4,0 mL de EDTA, 0,5 M, pH 8,0), durante 30 minutos a 90 V. A seguir, foi realizada a coloração com brometo de etídio (1 mg mL⁻¹ de estoque, 0,00005% de concentração final) durante 20 minutos e visualizada em transluminador emitindo luz ultra-violeta de comprimento curto. Pode-se, então, confirmar a concentração e a pureza das amostras de DNA extraído (AUSUBEL et al., 1987).

3.2.5.2. Amplificação do PCR com oligonucleotídio específico BOX

Uma alíquota de DNA extraído de cada estirpe foi submetida à amplificação de regiões repetitivas do DNA com o “primer” BOX-A1R (5’CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3’) (VERSALOVIC et al 1994). Foram, então, utilizado 5 µL de água (mili Q esterilizada); 6 µL de DNTPs [1,5mM de solução para cada um dos quatro nucleotídeos (C, G, T e A)]; 2,5 µL de tampão 10 X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3); 1,2 µL de MgCl₂ 50 mM; 1,5 µL de cada “primer” (50 pmol µL⁻¹); 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹) e 1 µL de DNA (50 ng), tendo um volume final de 18,9 µL. O programa para o PCR BOX consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 7 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 53 °C por 1 minuto e extensão a 65 °C por 8 minutos; 1 ciclo final de extensão a 65 °C por 16 minutos; mantendo-se a 4 °C. Os fragmentos do produto da amplificação foram separados em um gel de agarose (20 x 20 cm) a 1,5%, e foram utilizados 4 µL do padrão de peso molecular de 1 kb (plus DNA Ladder TM-Gibco- Life Technologies). A eletroforese foi feita sob corrente elétrica de 100 V por 6 horas. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador com lâmpada ultravioleta (VERSALOVIC et al.,1994).

3.2.5.3. Amplificação da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA

A amplificação pela PCR foi feito depois de verificação da pureza do DNA com BOXA1R primer específico (50-CTACGGCAAG GCGACGCTGACG-30, InvitrogenTM, Life Technologies) (VERSALOVIC et al., 1994). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em um gel de agarose 1,5 % em 100 V, por 6 horas. Géis foram corados com brometo de etídeo, visualizado sob luz UV e fotografado com uma

Kodak Digital Ciência 120 apparatus. A análise de cluster for realizada com o BOX A1R-PCR produtos amplificados usando Bionumerics programa (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica), com o algoritmo UPGMA (não ponderada método par-grupo com média aritmética) e o coeficiente de Jaccard (J) (SNEATH E SOKAL, 1973). Foram utilizadas duas cepas de referência, *Azospirillum lipoferum* (BR11080) e *A. brasiliense* (BR11001).

3.2.5.4. Seqüenciamento de produtos PCR de 16S rRNA gene

Estirpes representativas de alguns tratamentos foram selecionadas para seqüenciamento direto dos produtos de PCR. Para a amplificação da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA do DNA de cada estirpe bacteriano foi amplificado com os primers universais fD1 e rD1 e os produtos de PCR foram purificados com PureLinkTM, Invitrogen. A concentração das amostras de DNA foi verificada por espectrofotômetro de densidade óptica (NanoDrop ® ND-1000 UV-Vis), ajustado para 35 ng DNA μL^{-1} e mantidos a -20 °C. As reações de PCR foram realizadas em placas de PCR com 96 poços microplacas. Os produtos purificados de PCR de cada estirpe (70 ng por reação) recebeu uma mistura de 4 uL de Big Dye ® (Terminator v3.1, a Applied Biosystems), e 3,2 pmol de cada primer. Cinco reações de PCR foram realizadas com os seguintes primers: fD1, Y2, (CHEN et al., 2000; WEISBURG et al, 1991) 362f, 786f e 1203f (MENNA et al, 2006.) Para obter a seqüência completa do gene 16S rRNA. O mesmo programa foi utilizado com todos os primers, como segue: desnaturação a 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 s, 50 °C por 4 segundos, e extensão a 60 °C por 4 minutos; mergulhar a 4 ° C. Após a amplificação, alíquotas de 20 mL de cada amostra foram adicionadas a 80 mL de isopropanol (80%) em temperatura ambiente. A placa foi selada, homogeneizado e centrifugado a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi invertida sobre papel absorvente para secar. Após a secagem, o pellet recebeu 100 mL de etanol 70 % recém-preparados, a placa foi selada, e o homogeneizado foi centrifugado novamente a 4000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. A placa foi invertida em papel absorvente e centrifugados a 200 rpm por 10 s. O pellet foi seco a 95 °C por 30 segundos, ressuspenso em 10 μL formamida, em 1 mM EDTA, e apresentada em seqüenciamento ABI 3031xl (Applied Biosystems). Análise das seqüências de qualidade obtidas para cada estirpe foi montada em contigs utilizando os programas phred (EWING & GREEN, 1998; EWING et al, 1998) phrap (www.phrap.org) e Consed (GORDON et al, 1998) confirmado em direções 3' e 5' foram submetidas ao banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para buscar alinhamentos significativos.

Usando a versão do software clustal 1,83 (THOMPSON et al., 1997) as seqüências foram submetidas a alinhamentos. Uma árvore não enraizadas foi gerada usando a versão do programa MEGA 5 (KUMAR et al., 2004) com o algoritmo de Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987). Limites de confiança nós de árvore foram avaliados a partir da análise bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 2000 amostras de acordo com Hedges (1992).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Ocorrência de rizobactérias diazotróficas em raízes de feijoeiro

A ocorrência de bactérias endofíticas em 11 áreas de plantio no estado de Santa Catarina é apresentada na tabela 3 e foi determinada pelo número mais provável de propágulos (NMP) em raízes de plantas de feijoeiro. Em todas as áreas estudadas foram observadas populações de bactérias endofíticas nas raízes de feijoeiro. Apesar dos meios utilizados serem considerados seletivos para bactérias do gênero *Azospirillum*, não é possível afirmar que estas populações sejam todas de bactérias deste gênero, por esse motivo os resultados serão apresentados como estirpes de rizobactérias em meio de cultivo LGI e NFb.

Os resultados de densidade de rizobactérias em raízes de feijoeiro variaram de $3,85 \times 10^5$ a $9,50 \times 10^7$ células g^{-1} de matéria fresca para o meio de cultivo LGI e de $1,53 \times 10^6$ a $1,36 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca para o meio de cultivo NFb. Estes valores podem ser considerados altos quando comparamos com as estimativas observadas por Reis Junior et al (2004) das populações de *A. amazonense*, obtidas a partir de amostras de raízes de três espécies de *Brachiaria* avaliadas, que variaram de 10^3 a 10^7 células g^{-1} de raízes.

Com base no NMP em meio semi-específico LGI, observaram-se as maiores populações de rizobactérias endofíticas nas áreas localizadas nos municípios de Cordilheira Alta, Pinhalzinho (1), Riqueza e Iporã com valores que variaram de $6,68 \times 10^7$ a $9,50 \times 10^7$ de células g^{-1} de raiz (Tabela 3). Quando utilizado o meio NFb e as maiores populações de bactérias foram observadas nos municípios de Faxinal dos Guedes, Cordilheira Alta, Pinhalzinho (1 e 2) e Riqueza com valores que variaram de $7,20 \times 10^7$ a $1,36 \times 10^8$ de células g^{-1} de raiz. O NMP de bactérias endofíticas observado quando se utilizou meio NFb foi, em média, superior aos observados em meio LGI.

As diferenças encontradas para a densidade de bactérias em relação às áreas amostradas podem ser atribuídas às diferenças de solo, de clima e genótipo de plantas de feijoeiro das áreas amostradas. Pode-se observar que as áreas onde foram observados os

maiores valores de densidade de rizobactérias apresentaram altos teores de P e potássio no solo. O teor de matéria orgânica foi expressivo nos pontos de Faxinal dos Guedes e Pinhalzinho (2), onde é possível observar os maiores valores de densidade de rizobactérias no meio NFB (Tabela 2 e 4). A ocorrência de rizobactérias tem sido verificada em solos com pH abaixo de 4,5 sendo *A. amazonense* a espécie com maior adaptabilidade a ambientes ácidos (MAGALHÃES et al. 1983; SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Tabela 4. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas em raízes de feijoeiro em Santa Catarina utilizando-se os meios semi-específicos NFB (para *A. lipoferum* e *A. brasiliense*), e LGI (para *A. amazonense*).

Local de Origem	Meio LGI	Meio NFB
	nº de células g ⁻¹ de matéria fresca	
Anchieta	3,85 x 10 ⁵ d	1,87 x 10 ⁶ cd
Caibi	9,25 x 10 ⁴ e	4,25 x 10 ⁶ bcd
Campo Erê	1,08 x 10 ⁶ cd	1,53 x 10 ⁶ d
Cordilheira Alta	6,68 x 10 ⁷ b	1,24 x 10 ⁸ a
Faxinal dos Guedes	7,24 x 10 ⁵ d	1,36 x 10 ⁸ a
Iporã	9,50 x 10 ⁷ a	3,68 x 10 ⁶ bcd
Mondaí	2,80 x 10 ⁶ c	7,00 x 10 ⁷ bc
Pinhalzinho (1)	6,82 x 10 ⁷ ab	7,20 x 10 ⁷ ab
Pinhalzinho (2)	6,05 x 10 ⁵ d	1,32 x 10 ⁸ a
Riqueza	7,37 x 10 ⁷ ab	7,05 x 10 ⁷ bc
Saudades	8,80 x 10 ⁵ d	3,87 x 10 ⁶ bcd
Média	2,8 x 10 ⁷ A	5,65 x 10 ⁷ B

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

3.3.2. Diversidade fisiológica de estirpes de rizobactérias de raízes de feijoeiro

Os resultados observados para os testes fisiológicos de alteração de pH (alcalinização), catalase e coloração de Gram nas estirpes de rizobactérias. Todas as estirpes selecionadas apresentaram o mesmo comportamento para os testes de alcalinização e catalase, reagindo de forma positiva. Quanto ao teste de coloração de Gram as rizobactérias isoladas e testadas apresentaram reação negativa, o que era esperado com a utilização dos meios semi-sólidos LGI e NFB, indicados para o isolamento específico de bactérias diazotróficas endofíticas.

Os resultados das avaliações de produção de ácido indolacético (AIA), fixação biológica de nitrogênio *in vitro* e teor de proteínas totais pelo método de Bradford das estirpes obtidos em meio NFB e LGI, podem ser observados na Tabela 5. Os resultados de produção de AIA demonstram que existem diferenças entre estirpes, sendo que as estirpes Fe34, Fe22,

Fe5 e Fe55 se destacaram na produção com valores de 33,72; 30,47; 28,94 e 24,56 mg de AIA L⁻¹ respectivamente. No geral dos 21 estirpes testados apenas 4 apresentaram valores menores que o observado na estirpe BR 11001 utilizada de referência neste testes e que apresentou valor de 15 mg de AIA L⁻¹.

Os valores de produção de AIA observados por Radwan (1999) apresentaram variabilidade entre espécies de *Azospirillum* (19,2 a 432 µM). Os valores de produção de AIA em meio de cultura observados em rizobactérias isoladas em meio NFB e LGI em raízes de arroz irrigado em Santa Catarina variaram entre 5,67 e 119,72 µg AIA mL⁻¹ (CARDOSO, 2008). A quantidade de AIA produzida por estirpes de *A. amazonense* observado por Reis Junior et al. (2004) variou de 35 a 110 µM. Pedrinho et al. (2010) observaram valor médio de produção de AIA de 13 µg mL⁻¹ em estirpes de *Herbaspirillum* spp. Os valores observados por Mascarua-Esparza et al. (1988) variaram de 28,54 a 97,03 µM em estirpes de *A. lipoferum*.

Em avaliação de FBN de estirpes de rizobactérias de arroz, *A. lipoferum* e *A. brasiliense* apresentaram-se como os melhores fixadores de nitrogênio, os valores de N-total em meio de cultura apresentaram grande faixa de variação de 5,56 a 46,82 µg mL⁻¹ (KUSS, 2006). Pedraza et al. (2004) testaram várias estirpes de *Azospirillum* spp e verificaram que todos produziram AIA, variando de 0,475 a 1,83 µg mg⁻¹ proteína em meio de cultura sem triptofano e 1,03 a 38,28 µg mg⁻¹ proteína quando adicionado triptofano ao meio de cultura. A avaliação da produção de AIA *in vitro* de estirpes de rizobactérias isoladas de sorgo mostrou que os valores variaram de 0,70 a 10,70 µg mL⁻¹ (BERGAMASCHI, 2006).

A produção de nitrogênio das estirpes obtida em meio de cultura específica com o teste de fixação biológica do nitrogênio *in vitro* apresentou diferenças, sendo que as estirpes Fe22, Fe27, Fe5 e Fe57 se destacaram com valores de 33,25; 27,85; 25,98 e 24,38 mg de N L⁻¹ respectivamente, quando comparadas com o valor da estirpe de referência BR 11080 que obteve o valor de 20,19 mg de N L⁻¹ (Tabela 5). As rizobactérias isoladas em meio NFB e LGI em raízes de arroz irrigado em Santa Catarina apresentaram alta capacidade de fixação de N total em meio de cultura, com os valores de 22,81, 22,45 e 21,26 µg N mL⁻¹ para as estirpes SC0059, SC0057 e SC0014 respectivamente (CARDOSO, 2008). Em avaliação de FBN *in vitro* de estirpes de rizobactérias de arroz, as estirpes de *A. lipoferum* e *A. brasiliense* apresentaram-se como os melhores fixadores de nitrogênio; os valores de N-total em meio de cultura apresentaram grande faixa de variação de 5,56 a 46,82 µg mL⁻¹ (KUSS, 2006).

Os resultados do teste de proteínas pelo método de Bradford demonstraram que da mesma forma que para a produção de AIA e fixação de N, houve diferenças entre as estirpes. Do total de 21 estirpes avaliadas todas apresentaram resultados superiores aos observados nas duas estirpes de referência BR 11001 e BR 11080, o destaque para produção de proteínas foram para as estirpes Fe17, Fe34, Fe3 e Fe46, com os valores de 168,5; 163,5; 156,5 e 147,0 mg L⁻¹ respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Produção de ácido indolacético (AIA), nitrogênio total (N total) e proteína por Bradford de estirpes em meios NFb e LGI em mg L⁻¹.

Estirpes	AIA (mg L ⁻¹)	N total (mg L ⁻¹)	Proteína (mg L ⁻¹)
BR 11001	15,00	14,14	16,00
BR 11080	13,33	20,19	20,00
Fe 3	16,89	12,32	156,50
Fe 5	28,94	25,98	93,50
Fe 8	17,58	10,45	119,50
Fe 10	15,53	18,97	76,00
Fe 12	16,83	22,39	106,00
Fe 17	18,14	3,66	168,50
Fe 22	30,47	33,25	114,00
Fe 25	19,83	23,95	74,50
Fe 26	20,39	3,83	122,00
Fe 27	19,14	27,85	20,50
Fe 29	14,56	22,57	67,50
Fe 32	17,72	19,99	38,50
Fe 34	33,72	18,16	163,50
Fe 35	17,75	4,33	126,50
Fe 46	21,31	17,11	147,00
Fe 51	22,56	10,15	68,00
Fe 53	14,58	11,49	114,00
Fe 55	24,56	17,97	114,00
Fe 57	20,33	24,38	139,00
Fe 66	10,19	1,86	118,00
Fe 68	12,83	15,22	145,50

3.3.3. Diversidade genética de estirpes de rizobactérias de raízes de feijoeiro

A análise de Cluster com base em produtos BOX A1R-PCR utilizando algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard pode ser observado na Figura 2. As amplificações do DNA por BOX-PCR mostraram a diversidade genética entre as estirpes de rizobactérias de plantas de feijoeiro, sendo que apenas as estirpes Fe53 (Campo Erê) e Fe55 (Iporã) mostraram uma similaridade genética de 100%.

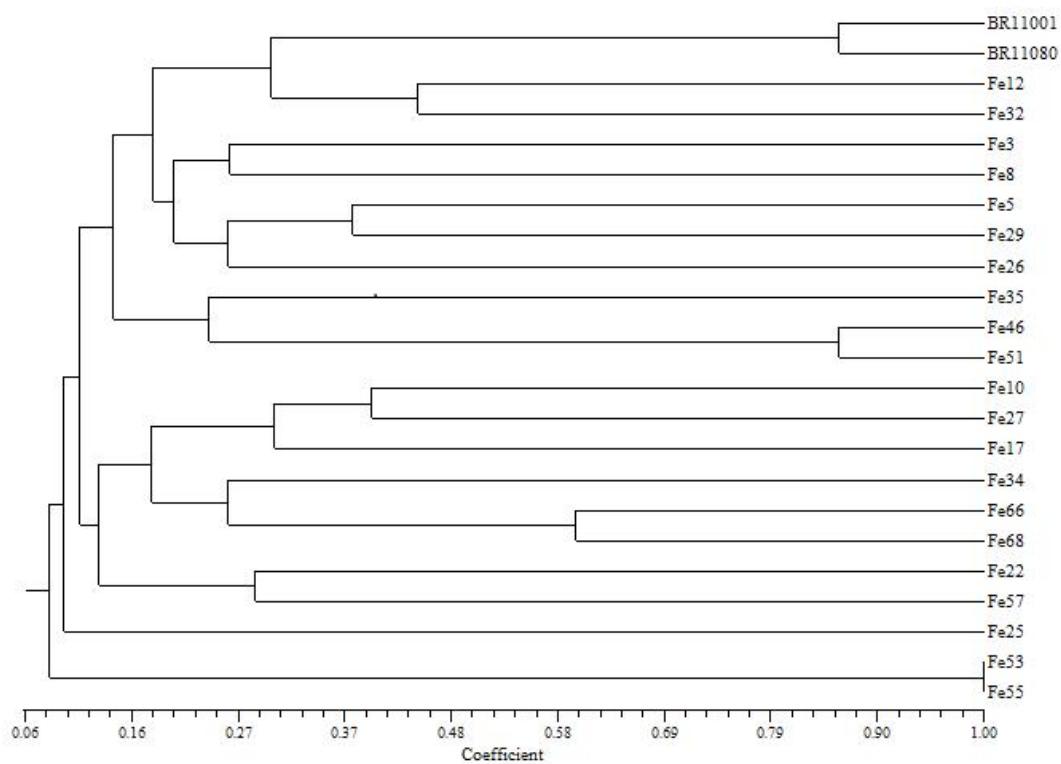


Figura 2. Análise Cluster baseada no BOX A1R-PCR produtos usando o UPGMA algoritmo e o coeficiente de Jaccard.

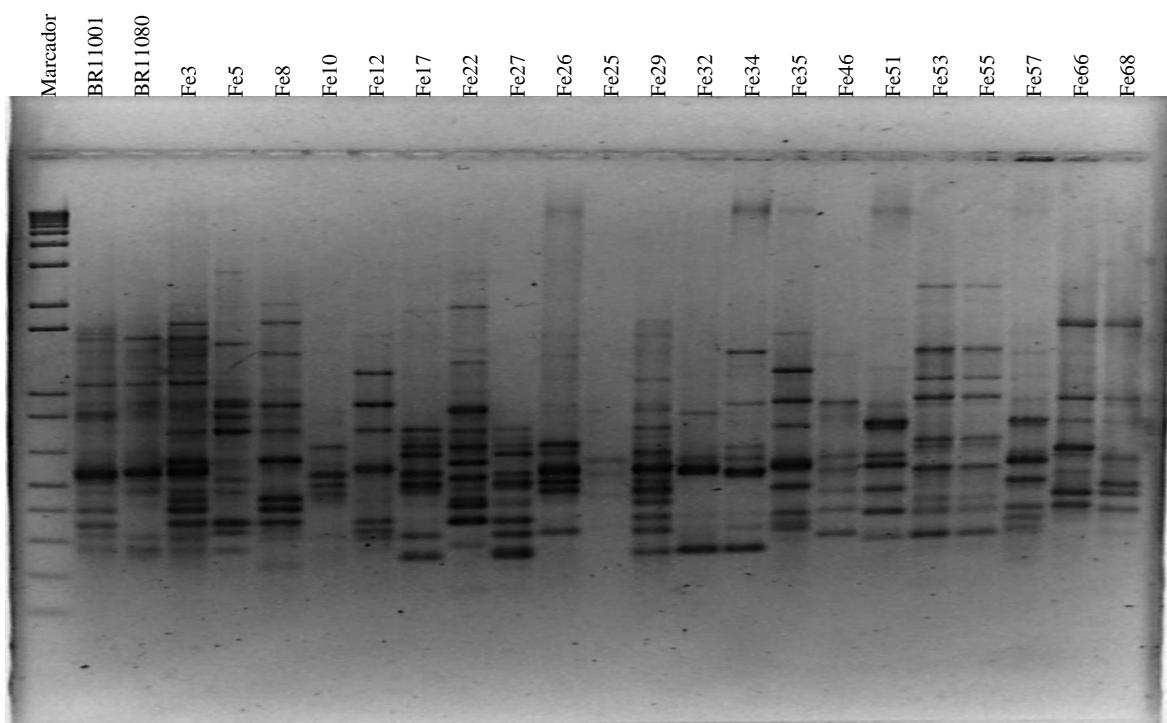


Figura 3. Imagem do gel dos perfis de BOX-PCR de 21 estirpes de rizobactérias oriundos de plantas de feijoeiro.

A árvore do 16S rRNA gene seqüências geradas pelo método de Neighbour Joining mostrando a posição de algumas das estirpes de rizosfera de raízes de feijoeiro comum apresentada na Figura 3. As estirpes Fe55, Fe66, Fe26, Fe25, Fe3 e Fe5 receberam a seguinte nomenclatura no laboratório do IAPAR, 4568, 4570, 4559, 4558, 4549 e 4550, respectivamente. Estas estirpes foram todas identificadas como *Pseudomonas moraviensis*.

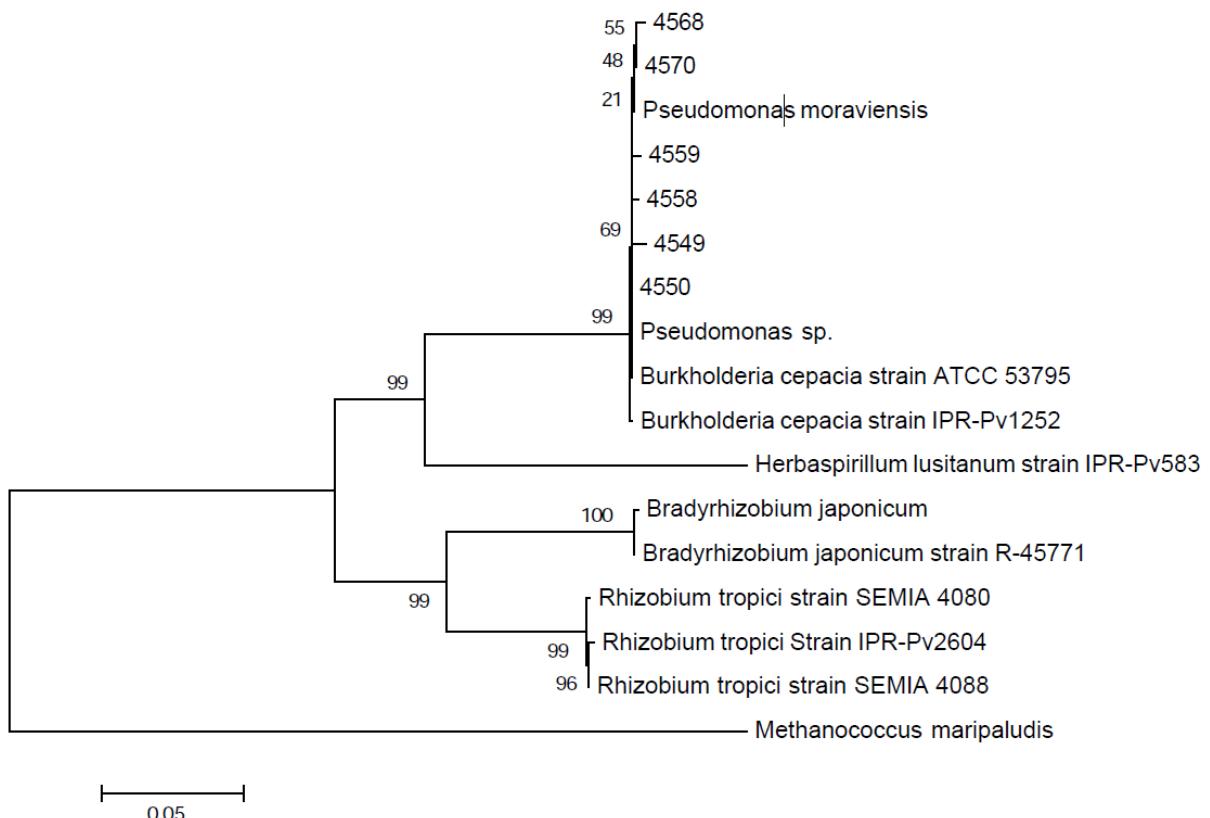


Figura 4. A árvore do 16S rRNA gene seqüências geradas pelo método de Neighbour Joining mostrando a posição de estirpes de rizosfera de raízes de feijoeiro comum.

A identificação das espécies foi feita com base na similaridade das seqüências encontradas no GenBank (NCBI) (Tabela 6). Os resultados demonstram a presença de rizobactérias do gênero *Pseudomonas* sp.; *Rhizobium* sp.; *Pseudomonas moraviensis* e *Stenotrophomonas maltophilia*. O seqüenciamento das estirpes permitiu observar que existe um predomínio do gênero *Pseudomonas* sp.: 13 de um total de 15 estirpes. Outras análises de seqüenciamento genético serão realizadas com as outras estirpes deste estudo que não foram identificados, assim como análise complementar das estirpes já identificadas para comprovar os resultados aqui apresentados.

Em estudo da diversidade de bactérias endofíticas na cultura do feijoeiro, constataram a presença de 50 espécies de bactérias de 24 diferentes gêneros (*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Nocardiooides*, *Paracoccus*, *Phyllobacterium* e *Sphingomonas*); no mesmo trabalho, a solubilização de P foi observada em bactérias isolada de feijoeiro dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Streptomyces* (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2010). Valverde et al. (2003) em estudos com a cultura do feijoeiro isolou de raízes uma nova espécie de rizobactéria, *Herbaspirillum lusitanum*.

Dos gêneros de bactérias isoladas de raízes de milho em estudo realizado por Pedrinho et al. (2010) o gênero *Bacillus*, *Burkholderia* e *Azospirillum* foram os mais freqüentes, totalizando 68% das estirpes identificadas, seguidos de *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Bosea*. Em estudos com 143 estirpes provenientes de 47 espécies nativas de *Mimosa* foi observado que 98% das estirpes pertencem o gênero *Burkholderia* (BONTEMPS et al., 2010) e Luvizotto et al. (2010) observaram a presença de espécies de *Burkholderia* em associação com plantas de cana-de-açúcar. Begamaschi (2006) observou a presença de rizobactérias dos gêneros *Burkholderia*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em isolamento de raízes e colmos de sorgo e constatou diferenças quanto a diversidade de rizobactérias entre os genótipos utilizados no isolamento.

Tabela 6. Identificação das estirpes baseado nas seqüências de similares do 16S rRNA encontrados no GenBank (NCBI).

Legenda UDESC	Legenda IAPAR	Espécies	Similaridade (%)	Nº de acesso
Fe 3	4549	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	99	HQ242745.1
Fe 5	4550	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	99	HQ242745.1
Fe 8	4551	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	AY880843.1
Fe 10	4553	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	DQ898312.2
Fe 12	4555	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	98	HQ242745.1
Fe 17	4556	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	JF683300.1
Fe 22	4557	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	98	HQ242745.1
Fe 25	4558	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	99	HQ242745.1
Fe 26	4559	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	99	HQ242745.1
Fe 27	4560	<i>Rhizobium</i> sp.	89	EU529842.1
Fe 32	4562	<i>Pseudomonas</i> sp.	90	AB689747.1
Fe 55	4568	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	99	HQ242745.1
Fe 66	4570	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	99	HQ242745.1
Fe 34	4563	<i>Pseudomonas</i> sp.	79	EU934229.1
Fe 57	4569	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	87	GQ360071.1

3.4. CONCLUSÕES

Em todas as áreas com plantio do feijoeiro observou-se a presença de rizobactérias diazotróficas endofíticas. A análise do NMP nas raízes apresentou valores que variaram de $3,85 \times 10^5$ a $9,50 \times 10^7$ células g^{-1} de matéria fresca para o meio de cultivo LGI e de $1,53 \times 10^6$ a $1,36 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca para o meio de cultivo NFB.

Neste estudo foram obtidas 68 estirpes de rizobactérias que foram incluídos na coleção de Bactérias Diazotróficas Promotoras de Crescimento do CAV/UDESC. Vinte e uma estirpes foram selecionadas para caracterização da diversidade fisiológica e apresentaram diferenças quanto à produção de auxinas e fixação biológica do nitrogênio, indicando alta diversidade fisiológica. As estirpes Fe34 e Fe22 se destacaram na produção de auxinas com valores de 33,72 e 30,47 mg de AIA L^{-1} respectivamente. Para a FBN as estirpes Fe22 e Fe27 apresentaram os melhores valores de 33,25 e 27,85 mg de N L^{-1} , respectivamente.

Vinte e uma estirpes foram avaliadas quanto à diversidade genética. A identificação das estirpes demonstrou uma baixa diversidade de espécies, o que pode ser explicado por um possível favorecimento desta espécie pelos meios de cultivo utilizados para isolamento. Os resultados demonstram a presença de rizobactérias das espécies *Pseudomonas* sp.; *Rhizobium* sp.; *Pseudomonas moraviensis* e *Stenotrophomonas maltophilia*. O seqüenciamento das estirpes permitiu observar que existe um predomínio da espécie *Pseudomonas* sp., sendo que das 15 estirpes que foram identificadas baseado nas seqüências de similares do 16S rRNA, 13 foram desta espécie.

Com o isolamento e caracterização de rizobactérias de raízes de feijoeiro é possível concluir que existe a presença das mesmas espécies de rizobactérias em locais diferentes do estado de Santa Catarina com cultivo de feijoeiro e que estas espécies apresentam potencial para uso como promotoras de crescimento baseado nos testes realizados.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G. & SMITH, J.A.; Current Protocols in Molecular Biology. **Wiley**, New York. 1987.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.

BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host-plants specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-434, 1980.

BERGAMASCHI, C.; Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo. **Dissertação de Mestrado**. Porto Alegre – RS. 2006.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; SIMON, M.F.; REIS JUNIOR, F.B.; GROSS, E.; LAWTON, R.C.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M.F.; FARIA, S.M.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. & YOUNG, J.P.W.; Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, 19, 44–52. 2010.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1 –2, p. 248-254, 1976.

CARDOSO, I.C.M. Ocorrência e diversidade de bactérias endofíticas do gênero *azospirillum* na cultura do arroz irrigado em Santa Catarina. **Dissertação de Mestrado**. Lages - SC. 2008.

CHEN, L.S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F.O. & HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Appl. Environ. Microbiol.**, 66:5099-5103, 2000.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica do nitrogênio no Brasil. São Paulo: **Estudos avançados**, v. 4, n. 8, p. 144-152. 1990.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.D.L.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosa**. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995.

DODD, I.C.; ZINOVKINA, N.Y.; SAFRONOVA, V.I. & BELIMOV, A.A.; Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, n.157. 2010.

EWING, B. & GREEN, P.; Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, 8:186–194.1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C. & GREEN, P.; Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res** 8:175–185, 1998.

FELSENSTEIN, J.; Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39:783–791. 1985.

FERREIRA, M.A.J.F. Sistema reprodutivo e potencial para o melhoramento genético de uma população de melancia *Citrullus lanatus* Piracicaba: ESALQ, **Tese doutorado**. 2000.

GOOGLE, Imagens disponíveis em <<http://www.google.com>> Acesso em 14 de Setembro de 2010.

GORDON, D.; ABAJIAN, C. & GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res** 8:195–202. 1998.

GORDON, S.A. & WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indolacetic acid. **Plant Physiology**, n. 26, p. 192-195, 1951.

GUIMARÃES, P. M. & SÁ, M. de F. G. de. O uso de PCR na diagnose e caracterização de microrganismos. In: MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L. et al. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos**. Jaguariúna: EmbrapaMeio Ambiente, 2002. 743 p., p. 129-147.

HEDGES, S.B.; The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap p-value in phylogenetic studies. **Mol Biol Evol**, 9:366–369. 1992.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S. & CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Appl Soil Ecol**. 32(2):210–220. 2006.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbialecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Bio. Biochem.**, v. 29, n. 5/6, p. 853-862, 1997.

KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M.; MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform**, 5:150–163. 2004.

KUSS, A.V.; Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. **Tese de doutorado**, Santa Maria – RS. 2006.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL, M.A.; ORMENO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, J. & MARTÍNEZ-ROMERO, E.; *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, n.33, 2010.

LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAUJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINE, A.A.; Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World J Microbiol Biotechnol**, 26:1829–1836. 2010.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **An Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MASCARUA-ESPARZA, M.A.; VILLA-GONZALLEZ, R. & CABALLERO-MELADO, J. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. **Plant Soil**, 106:91-95, 1988.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N. & MARTÍNEZ- ROMERO, E.; Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Syst Appl Microbiol**, 29(4):315–332. 2006.

MINAMISAWA, K.; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMI, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. **Appl Environ Microbiol**, 58(9): 2832-2839, 1992.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A. & CARVALHO, F.; Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, 1(2): 74-99, 2010.

PEDRAZA, R. O.; RAMÍREZ-MATA, A.; XIQUI, M. L.; BACA, B. E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, n. 233, p. 15 – 21, 2004.

PEDRINHO, E.A.N.; GALDIANO JÚNIOR, R.F.; CAMPANHARO, J.C.; ALVES, L.M.C. & LEMOS, E.G.M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**. vol.69, no.4. Campinas. 2010.

RADWAN, T. EL-SAYED EL-DESOK. Improvement of quality of some crop plants by applying new concepts in biotechnology with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Tese de Doutorado**. Cairo University, 1999

REIS JÚNIOR, F. B. dos; MENDES, I. de C.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, dez. 2002. 33 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 51).

REIS JUNIOR, F.B. dos; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S. & REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados A *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **R. Bras. Ci. Solo**, 28:103-113, 2004

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR. O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* PV. Citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

RODRIGUES, E.P.; Caracterização fisiológica de estirpes de *Azospirillum amazonense* e avaliação dos efeitos da inoculação em plantas de arroz inundado. **Dissertação**. (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ. 2004.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 135-147, 1997.

SAITOU, N & NEI, M.; The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, 4 (4): 406-425. 1987.

SIQUEIRA, J. O. & FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas.** Brasília: MEC, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236 p.

SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R.; **The Principles and Practice of Numerical Classification. Numerical Taxonomy.** San Francisco: W. H. Freeman. 1973.

SOARES, R.A.; ROESCH, L. F. R.; ZANATTA, G. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with *at* (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Appl Soil Ecol**, v. 33, p. 221-234, 2006.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. Análises de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Boletim Técnico de Solos**, 5. 1995.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research, Oxford**, v.25, n.19, p.4876-4882, 1997.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A. & IGUAL, J.M.; *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, 1979–1983, 2003.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VIDEIRA , S. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L D.. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômica de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. **Documentos**, 234, 2007. 74 p.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A. & LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, 173:697-703, 1991.

YANO, D. M. Y.; ATTILI, D. S.; GATTI, M. S. V. et al. **Técnicas de microbiologia em controle de qualidade.** Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1991.

4. CAPÍTULO 2 - Efeito da inoculação de rizobactérias diazotróficas endofíticas na nutrição de genótipos crioulo e comercial de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L).

RESUMO: Estudos mostram que a diversidade de bactérias diazotróficas isoladas de raízes de feijoeiro é alta, sugerindo que pode existir uma interação positiva entre as rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e os rizóbios que formam nódulos com a cultura do feijoeiro. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta da inoculação de estirpes divergentes de rizobactérias na nutrição de dois genótipos de feijoeiro. Foi realizado um ensaio em casa de vegetação com a inoculação de rizobactérias em dois genótipos de feijoeiro (BAF115 e BAF55). As plantas foram colhidas 28 dias após o plantio e foram analisadas a massa seca, teor de N, N acumulado e a densidade de rizobactérias nas raízes. Não houve efeito da inoculação com rizobactérias no NMP, na massa seca das plantas, no teor de N e N acumulado na parte aérea das plantas de feijoeiro. Não foram observadas diferenças entre os genótipos de feijoeiro crioulo e comercial utilizadas no ensaio. A época de coleta aos 28 dias não possibilitou resposta da planta a inoculação com rizobactérias.

PALAVRAS-CHAVE: Promoção de crescimento vegetal, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, Nutrição.

ABSTRACT: Studies show that the diversity of diazotrophic bacteria isolated from roots of bean is high, suggesting that there may be a positive interaction between the plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia that form nodules with black bean. The aim of this study was to evaluate the response to inoculation of different strains of rhizobacteria in the nutrition of two bean genotypes. We conducted a test in the greenhouse by inoculation of rhizobacteria in two genotypes of bean (BAF115 and BAF55). Plants were harvested 28 days after planting and analyzed dry mass, N content, N uptake and the density of rhizobacteria on roots. No significant effects of inoculation with rhizobacteria in NMP, dry weight of plants in N content and N accumulated in shoots of bean plants. No differences were observed among the bean genotypes used in Creole and commercial testing. The collection time at 28 days did not allow plant response to inoculation with rhizobacteria.

KEYWORDS: Plant growth Promotion, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, Nutrition.

4.1. INTRODUÇÃO

As bactérias diazotróficas de vida livre e as associativas são oriundas do solo e vivem harmonicamente com as plantas, utilizando para sua nutrição os exsudatos de suas raízes, o que caracteriza uma simbiose mutualística. Nesta associação não ocorre, aparentemente, a formação e uma estrutura especializada em fixação do nitrogênio. Os produtos da fotossíntese são liberados pela planta, sendo absorvidos pelas bactérias que habitam a rizosfera e estas, por sua vez, fixam o nitrogênio para seu metabolismo e liberam após a morte das células o NH_4^+ para as plantas (VIDEIRA et al., 2007). Bactérias diazotróficas associativas podem se dividir em dois grupos de acordo com a proposição de Baldani et al. (1997) as bactérias endofíticas facultativas (podem colonizar tanto a rizosfera como o interior das raízes) e as bactérias endofíticas obrigatórias (colonizam o interior das raízes). A relação de simbiose ocorre quando planta e microrganismos estabelecem uma interação positiva, na qual a planta fornece nutrientes para o crescimento das bactérias e estas por sua vez fornecem nitrogênio para a planta. A simbiose pode ser detectada pela colonização das bactérias, na epiderme e córtex da raiz, ou sistematicamente, colonizando toda a planta (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). As mudanças morfológicas das raízes, estimuladas pela colonização de *Azospirillum*, por exemplo, podem melhorar a absorção de água e nutrientes pelas plantas (KUSS, 2006).

A coinoculação de sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) e *Paenibacillus polymyxa* proporcionaram uma tendência de aumento nas concentrações de cálcio, P e ferro na parte aérea das plantas de caupi. Tanto o caupi inoculado e co-inoculado com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. Apresentaram os melhores resultados (SILVA et al., 2006). Freitas & Vildoso (2004) em estudo com rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas, concluiu que os isolados bacterianos de *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* e outras bactérias rizosféricas podem agir como promotores do crescimento de plantas cítricas. As *Pseudomonas fluorescens* têm seu desenvolvimento influenciado por fatores como o tipo de substrato e o ambiente em que se desenvolvem, bem como pela rizosfera em que estão estabelecidas; além disso, têm comportamento instável quanto à promoção do crescimento de plantas cítricas (FREITAS & VILDOSO, 2004).

Valverde et al. (2003) em estudos com a cultura do feijoeiro apresentou a descrição de uma nova espécie de rizobactéria isolada de nódulos de feijoeiro coabitando com o rizóbio, o *Herbaspirillum lusitanum* (VALVERDE et al., 2003; RADWAN, et al., 2004). A inoculação

do feijoeiro com *Azospirillum brasilense* promoveu a formação de pelos radiculares e um aumento significativo na nodulação por *Rhizobium* inoculado, além de estimular o aumento da secreção de flavonóides pelas plantas de feijoeiro (BURDMAN et al., 1996). A coinoculação de *Azospirillum* e *Rhizobium* aumentou o peso e número de nódulos, assim como o total de nitrogênio fixado em plantas de feijoeiro, em comparação com a inoculação isolada de *Rhizobium* (BURDMAN et al., 1997).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inoculação de estirpes divergentes de rizobactérias isoladas de raízes de feijoeiro (Fe27 de *Rhizobium* sp. e Fe34 de *Pseudomonas* sp.) ou oriundas de outros isolamentos (SEMIA 4088, Ai27 e Ai32) na nutrição de dois genótipos de feijoeiro.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no CAV/UDESC em Lages – SC em ensaio com arranjo fatorial 2x5, sendo utilizados dois genótipos de feijoeiro a cultivar comercial BAF 115 – (Valente) e uma variedade crioula BAF 55 e cinco tratamentos de inoculação: quatro estirpes divergentes de rizobactérias, duas isoladas de feijoeiro (Fe27 de *Rhizobium* sp. e Fe34 de *Pseudomonas* sp.) que foram identificadas e selecionadas no estudo apresentado no primeiro capítulo, utilizando como critério de seleção os valores apresentados nos testes de produção de AIA e FBN, e duas estirpes de arroz irrigado (Ai27 e Ai32) e um tratamento controle inoculado apenas com *Rhizobium tropici*, SEMIA 4088 (estirpe H12 – Embrapa Soja/Embrapa Cerrados) do inoculante comercial “LeguMax” para feijão da empresa Turfal. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação no período de 10/02/2010 a 09/03/2010. O delineamento experimental foi inteiramente casualizados com cinco repetições. As plantas foram crescidas em vasos com 6 kg de mistura de Nitossolo: areia (2:1; v/v), para evitar a compactação e melhorar a aeração. O solo foi coletado no município de Capão Alto - SC, nas coordenadas 27°53'50,73"S e 50°25'44,04"O, apresentava as seguintes características teor de argila de 77% e 3,7% de matéria orgânica, pH natural de 4,7, teor de P de 0,9 mg dm⁻³, teor de K de 85 mg dm⁻³ e CTC efetiva de 4,7 cmol_c dm⁻³. O solo foi peneirado e o seu pH foi corrigido para 5,8.

O inóculo utilizado no ensaio foi produzido no Laboratório de Microbiologia e Fauna do Solo do CAV/ UDESC e foi aplicado utilizando uma pipeta automática e dispersão sob as sementes no vaso. A concentração obtida do inóculo utilizado foi de 1 x 10⁹ UFC mL⁻¹ de cultura, sendo utilizado um volume 1,4 mL de meio, totalizando 1,4 x 10⁹ UFC por semente.

As doses de P e K foram o dobro da recomendação da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC, visando satisfazer a necessidade das plantas conduzidas em vasos. Foi realizado um desbaste, após a germinação das sementes, mantendo apenas uma planta por vaso.

Após 28 dias do plantio foram coletadas a parte aérea das plantas para a determinação da massa seca, e o teores de nitrogênio total segundo Tedesco et al. (1995). O N acumulado foi calculado com os dados de massa seca e teor de N. Também foi realizada a avaliação da ocorrência de rizobactérias pela determinação do número mais provável de propágulos (NMP) destas no interior das raízes conforme descrito por Döbereiner et. al., (1995).

Os dados de massa seca, teor de N, N acumulado e NMP foram submetidos à análise de variância de acordo com as fontes de variação genótipo e inoculação.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fatorial dos resultados demonstrou que não existe efeito significativo dos genótipos de feijoeiro crioulo e comercial e da inoculação com estirpes de rizobactérias na massa seca, teor de N, N acumulado e NMP (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado da análise de variância para a massa seca, teor de N, N acumulado e NMP, para os fatores de variação genótipo e inoculação com estirpes de rizobactérias.

Fator de Variação	Massa seca	N	N acumulado	NMP
Genótipos	ns	ns	ns	ns
Estirpes	ns	ns	ns	ns
Genótipos*Estirpes	ns	ns	ns	ns

ns – Não significativo pelo teste F.

Não foram constatadas diferenças estatísticas nas variáveis analisadas, porém podemos observar algumas tendências como os teores de N do tecido da parte aérea que foram maiores com a inoculação das estirpes Fe34, Fe27 e com a inoculação padrão utilizando a SEMIA 4088 de *Rhizobium tropici*, comparando com a inoculação da estirpe Ai27 (Tabela 8). Os melhores resultados com a inoculação das estirpes “Fe” pode ser atribuído a uma maior especificidade da rizobactéria a espécie vegetal utilizada no ensaio, uma vez que foram isoladas de tecidos radiculares de feijoeiro.

Foi possível observar que a inoculação com a SEMIA 4088 de *R. tropici* apresentou valores elevados de massa seca e o maior valor de N acumulado, apesar de não haver diferenças estatísticas; a inoculação com rizobactérias pode ser promissora no incremento de teor de N nos tecidos vegetais, porém esse efeito não apresentou reflexo no incremento de massa seca e do N acumulado. A simples inoculação e presença das rizobactérias nas raízes não garantem um efeito benéfico à planta. A inoculação com a SEMIA 4088 de *R. tropici*, nas condições deste trabalho, não apresentou diferenças as demais rizobactérias, embora tenha a sua eficiência comprovada e é recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para produção de inoculantes no Brasil (MAPA, 2011).

Não foi observado efeito significativo da inoculação de rizobactérias no NMP das raízes das plantas de feijoeiro, os valores mais elevados foram encontrados na inoculação com as estirpes Fe34 e Fe27. A interação de rizobactérias com plantas como a que ocorre com a espécie *Azospirillum* spp. não é simbiótica e sim associativa, portanto a presença dessas bactérias em altas concentrações nas raízes e até no interior das plantas nem sempre quer dizer que elas estejam contribuindo significativamente com a nutrição nitrogenada do vegetal por meio da FBN (JAMES, 2000). Em estudo com a inoculação de *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* e *Azospirillum lipoferum* em plantas de milho foi constatado incrementos na massa de raízes e parte aérea, porém houve diferenças de resposta entre os dois genótipos de milho e as espécies de bactérias inoculadas (MEHNAZ & LAZAROVITS, 2006). Moutia et al (2010) observaram diferenças nas respostas de genótipos de cana-de-açúcar na produção de massa seca com a inoculação de *Azospirillum*, sendo que um dos genótipos testados apresentou resposta negativa quando submetido a inoculação com *Azospirillum* e a estresse hídrico.

Hungria et al (2010) observaram incrementos de 27% e 31% na produtividade de milho e trigo com a inoculação das cepas Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasiliense*. German et al (2000) observaram efeitos da inoculação de *A. brasiliense* na morfologia da raízes de feijoeiro, a inoculação promoveu aumento na massa e comprimento de raízes porém houve redução no diâmetro das raízes com a inoculação de *Azospirillum*. A coinoculação de *Rhizobium tropici* e *Paenibacillus polymyxa* em plantas de feijoeiro proporcionou incremento no desenvolvimento vegetal e conteúdo de nitrogênio e quando comparado com a inoculação isolada de *Rhizobium tropici* (FIGUEIREDO et al., 2008). Dardanelli et al (2008) observaram efeito positivo da coinoculação de *Azospirillum* e *Rhizobium* no desenvolvimento de raízes, fixação de N e produção de flavonóides em plantas de feijoeiro.

Tabela 8. Massa seca (g PI⁻¹), teor de N (%), N acumulado (mg PI⁻¹) e NMP (nº células g⁻¹ de raiz) do genótipo de feijoeiro comercial (BAF115) e crioulo (BAF55).

Genótipo	Inoculação	Massa seca (g PI ⁻¹)	N (%)	N acumulado (mg PI ⁻¹)	NMP (nº células g ⁻¹ de raiz)
BAF 115	SEMIA 4088	2,11	3,04	64,26	1,38x10 ⁶
BAF 115	Ai32	1,82	2,65	48,34	7,66x10 ⁶
BAF 115	Ai27	2,13	2,39	47,87	1,32x10 ⁷
BAF 115	Fe34	1,49	3,26	47,05	3,50x10 ⁷
BAF 115	Fe27	1,77	3,15	52,36	3,29x10 ⁷
BAF 55	SEMIA 4088	1,42	3,22	46,02	2,08x10 ⁶
BAF 55	Ai32	1,73	3,01	51,57	7,66x10 ⁶
BAF 55	Ai27	1,29	3,02	43,09	1,07x10 ⁷
BAF 55	Fe34	1,58	3,16	49,45	3,43x10 ⁷
BAF 55	Fe27	1,86	3,12	58,39	1,48x10 ⁶
Médias		1,72	3,01	50,84	1,46x10 ⁷

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Ai – Estirpes de origem em raízes de arroz. Fe – Estirpes de origem em raízes de feijoeiro.

4.4. CONCLUSÃO

Não houve efeito da inoculação com rizobactérias no NMP, na massa seca das plantas, no teor de N e N acumulado na parte aérea das plantas de feijoeiro. Não foram observadas diferenças entre os genótipos de feijoeiro crioulo e comercial utilizadas no ensaio.

A época de coleta aos 28 dias não possibilitou resposta da planta a inoculação com rizobactérias.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.911-922, 1997.

BURDMAN, S.; KIGEL, J. & OKON, Y.; Effects of *Azospirillum Brasilense* on Nodulation and Growth of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Bid. Biochem.** Vol. 29, No. 516, pp. 923-929, 1997.

BURDMAN, S.; VOLPIN, H.; KIGEL, J.; KAPULNIK, Y. & OKON, Y.; Promotion of *nod* Gene Inducers and Nodulation in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Roots Inoculated with *Azospirillum brasiliense* Cd. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 3030–3033, Aug. 1996.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004.

DARDANELLI, M.S.; CORDOBA, F.J.F.; ESPUNY, M.R.; CARVAJAL, M.A.R.; DIAZ, M.E.S.; SERRANO, A.M.G.; OKON, Y. & MEGIAS, M.; Effect of *Azospirillum brasiliense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology & Biochemistry**, n.40, 2008.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.D.L.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosa**. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995.

FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; MARTINEZ, C.R. & CHANWAY, C.P.; Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied soil ecology**, 40, 182 – 188, 2008.

FREITAS, S.S. & VILDOSO, C.I.A.; Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **R. Bras. Ci. Solo**, 28:987-994, 2004.

GERMAN, M.A.; BURDMAN, S.; OKON, Y. & KIGEL, J.; Effects of *Azospirillum brasiliense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. **Biol Fertil Soils**, 32:259–264, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M. & PEDROSA, F.O.; Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasiliense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, 331:413–425, 2010.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field crops research**, n. 65, p. 197-209, 2000.

KUSS, A.V.; Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. (**Tese de doutorado**), Santa Maria – RS. 2006.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA nº 13**, de 24/03/2011. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro/registro_de_produtos>, Acessado em dezembro de 2011.

MEHNAZ, S. & LAZAROVITS, G.; Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions. **Microbial Ecology**. Volume 51, 326–335. 2006.

MOREIRA, F.S.M. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 626p. 2002.

MOUTIA, J.F.Y.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S. & VANDERLEYDEN, J.; Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant Soil**, 337:233–242, 2010.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K. E REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesq. agropec. bras.** vol.39, no.10, Brasília. 2004.

SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F. e FIGUEIREDO, M.V.B.; Co-inoculação de sementes de caupi com *bradyrhizobium* e *paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 36 (2): 95-99. 2006.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. Análises de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Boletim Técnico de Solos**, 5. 1995.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A. & IGUAL, J.M.; *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, 1979–1983, 2003.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Eds. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC p. 524, 1997.

VIDEIRA, S. S.; ARAUJO, J.L.S., BALDANI, V.L.D., Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, **Documento**, 234. 2007.

5. CAPÍTULO 3 - Efeito da inoculação de *Glomus clarum* (Nicol. & Schenck) no crescimento e nutrição fosfatada de genótipos crioulo e comercial de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

RESUMO: A capacidade de absorção e utilização de P é diferenciada entre genótipos da mesma espécie vegetal. A eficiência de absorção de P está relacionada à capacidade de absorção de maiores quantidades de P com um mínimo investimento em crescimento radicular. A distinta capacidade de absorção de P entre genótipos pode ser causada pela morfologia do sistema radicular e eficiência da simbiose com micorrizas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de *Glomus clarum* no crescimento e nutrição fosfatada de diferentes genótipos de feijoeiro. As doses de P proporcionaram efeitos no teor de P, conteúdo de P e massa seca da parte aérea das plantas de feijoeiro. Para a massa seca da parte aérea a dose de P mais elevada de 75 mg de P kg⁻¹ promoveu o incremento máximo. Os genótipos proporcionaram efeitos na massa seca e P acumulado da parte aérea das plantas de feijoeiro, sendo o genótipo comercial BAF115 (Valente) superior aos genótipos crioulos BAF55 e BAF42. A colonização micorrízica foi regulada pelos fatores dose de P, genótipo e inoculação, a elevação da dose de P não afetou a colonização por *G. clarum* de no genótipo BAF115, enquanto o aumento da dose de P implicou em diminuição da colonização de 37% na dose 0 de P para 20% na dose 75 mg de P kg⁻¹. No genótipo crioulo BAF55 quando comparamos as condições de FMAs nativos e inoculação com *G. clarum* foi observado uma diferença a favor da inoculação *G. clarum*, a colonização micorrízica aumentou de 6,17% com a inoculação de *G. clarum*. No genótipo crioulo BAF42 na condição de inoculação com *G. clarum* a maior colonização foi encontrada no tratamento sem aplicação de P com o valor de 35,97%.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos micorrízicos arbusculares, nutrição, fósforo, genótipo vegetal.

ABSTRACT: The ability to absorb and use of P is different between genotypes of the same plant species. The efficiency of absorption of P is related to the ability to absorb larger amounts of P with a minimum investment in root growth. The distinctive ability of P uptake

among genotypes can be caused by root system morphology and efficiency of the symbiosis with mycorrhiza. The aim of this study was to evaluate the effect of inoculation with *Glomus clarum* on growth and phosphorus nutrition of different bean genotypes. The P rates provided effects in P, P content and dry mass of shoots of bean plants. For the dry mass of shoots the highest P dose of 75 mg P kg⁻¹ produced the maximum increase. The genotypes yielded effects on dry matter and P accumulated in shoots of bean plants, with genotype trade BAF115 (Valente) above the genotype BAF55 and BAF42. The mycorrhizal colonization was governed by factors P rate, genotype and inoculation, the increase in P dose did not affect colonization by *G. clarum* of the genotype BAF115 while increasing the P resulted in reduction of colonization of 37% at a dose of P 0 to 20% at a dose of 75 mg P kg⁻¹. In BAF55 genotype when comparing the conditions of indigenous AMF and inoculation with *G. clarum* observed a difference in favor of inoculation *G. clarum*, mycorrhizal colonization increased from 6.17% when inoculated with *G. clarum*. In genotype BAF42 on condition of inoculation with *G. clarum* the major colonization was found without the application of the treatment with the P value of 35.97%.

KEY WORDS: Arbuscular mycorrhizal fungi, nutrition, phosphorus, plant genotype.

5.1. INTRODUÇÃO

O fósforo (P), assim como o nitrogênio (N), é um elemento essencial aos organismos vivos por fazer parte dos componentes estruturais das células, de coenzimas e compostos atuantes no processo de armazenamento e transferência de energia. O P é um elemento de ciclo biogeoquímico cujas transformações químicas resultam das interações solo-planta-microrganismo. Esse elemento está presente no solo sob as formas orgânicas e inorgânicas, e é absorvido pelas raízes das plantas na forma de fosfato (PO₄⁻). Uma vez na solução do solo, o íon PO₄⁻ está sujeito à adsorção pelos colóides do solo e se complexa a outros cátions como o cálcio, ferro e alumínio, ficando cada vez menos disponível aos vegetais (NAHAS, 1999). O P acelera a formação de raízes, aumenta o teor de carboidratos e ajuda na fixação simbiótica de nitrogênio, devido ao seu papel na síntese de proteínas; a falta do nutriente se reflete diretamente no menor crescimento da planta (MALAVOLTA at al. 1997). A capacidade de absorção e utilização de P é diferenciada entre genótipos da mesma espécie vegetal, como observado na cultura do feijoeiro (OLIVEIRA et al., 1987). A eficiência de absorção de P está relacionada à capacidade de absorção de maiores quantidades de P com um mínimo

investimento em crescimento radicular, e a eficiência de utilização é a capacidade relativa de produção de biomassa para cada unidade de P acumulado (ELLIOTT & LÄUCHLI, 1985).

A distinta capacidade de absorção de P entre genótipos pode ser causada pela morfologia do sistema radicular e eficiência da simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (SMITH et al., 1992). Entre as características consideradas favoráveis em um genótipo de feijoeiro eficiente na utilização de P, incluem-se a translocação de P das raízes para os tecidos em crescimento, a remobilização de nutrientes das folhas senescentes antes de sua abscisão e um desenvolvimento reprodutivo adequado para que a maior quantidade possível de P seja utilizada na produção de grãos (YOUNGDAHL, 1990).

Os aumentos na taxa de absorção do P propiciados pelas FMAs podem ser atribuídos ao aumento do volume de solo explorado pelas hifas extra-radiculares do fungo arbuscular; pequeno diâmetro da hifa, o que a permite explorar espaços do volume do solo inatingíveis pela raiz; maiores taxas de influxo por unidade de superfície; a formação de polifosfatos, moléculas orgânicas ricas em P sintetizadas pelos FMAs, as quais acarretam a diminuição da concentração de P no interior das hifas, com o concomitante acúmulo de P em condições de alta disponibilidade deste elemento, com a remobilização do nutriente em condições de estresse, permitindo, assim, um fluxo contínuo ao hospedeiro, e a produção de enzimas fosfatases, que catalisam a liberação de P dos complexos orgânicos, permitindo absorção na forma iônica pelas plantas nas unidades arbusculares (MARSCHNER & DELL, 1994; BERBARA et al., 2006).

A importância das micorrizas na nutrição fosfatada e crescimento de leguminosas foi mostrada por Bressan et al. (2001) avaliaram os efeitos da inoculação de FMAs no crescimento, produção de grãos e teores de nutrientes na cultura da soja e sorgo, em condições controladas. Os aumentos observados na massa seca da parte aérea para o sorgo foram da ordem de 55%, 33% e 6%, com a inoculação de *Glomus etunicatum*, o *Gigaspora margarita* e *G. clarum*, respectivamente. Também foram observados aumentos na produção de grãos de 31% e 21% com *G. etunicatum* e *Gigaspora margarita* para o sorgo. O fungo *Glomus etunicatum* foi à espécie micorrízica mais eficiente na produção de massa seca e na produção de grãos para soja e sorgo. A inoculação de fungos micorrízicos, aumentou as concentrações foliares de N, P, K, Zn e Cu.

Este trabalho teve como objetivo de avaliar o efeito da inoculação de genótipos crioulos (BAF 55 e BAF42) e comercial (BAF115 – Valente) de feijoeiro com *G. clarum* e doses de fósforo na produtividade, nutrição fosfatada e micorrização.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foi conduzido no CAV/UDESC em Lages – SC um ensaio em arranjo fatorial (3x5x2), utilizando-se três genótipos de feijoeiro, sendo um genótipo comercial (BAF 115 – Valente) e dois crioulos, um com baixa eficiência (BAF 55) e um com uma alta eficiência na acumulação de fitato (BAF 42); cinco doses de P adicionada ao solo (0, 15, 25, 50, e 75 mg dm⁻³ de P); e com as condições de inoculação com *Glomus clarum* e FMAs nativos do solo. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação no período entre a semeadura (17/12/2008) e a colheita (09/03/2009). Uma semana após a geminação foi realizado um desbaste mantendo apenas uma planta por vaso. Os tratamentos foram distribuídos em delineamento completamente casualizados com cinco repetições.

Todos os genótipos apresentavam o mesmo teor de P total nos grãos (0,5%) antes da semeadura. Além do diferencial no acúmulo de P, os genótipos foram selecionados para outras características agronômicas de qualidade tecnológica e nutricional das sementes. As plantas foram crescidas contento em vasos de 10 kg, uma mistura de solo e substrato (4:1; v/v). O solo utilizado foi um Nitossolo, coletado no município de Capão Alto - SC, nas coordenadas 27°53'50,73"S e 50°25'44,04"O, com teor de argila de 79 % e 0,9 % de matéria orgânica, com pH natural de 4,9, teor de P de 0,9 mg dm⁻³, teor de K de 89 mg dm⁻³ e CTC efetiva de 5,4 cmol_c dm⁻³. O solo foi peneirado e o seu pH foi corrigido para 5,8. Todos os tratamentos foram inoculados com rizóbio utilizando-se o inoculante para feijão da empresa Turfal com a SEMIA 4088 de *Rhizobium tropici*.

A adubação fosfatada foi realizada antes da semeadura utilizando uma solução de fosfato de potássio. O teor de potássio também foi corrigido utilizando uma solução de cloreto de potássio. A inoculação foi realizada utilizando 5 gramas de solo-inóculo contendo esporos, hifas e raízes de plantas hospedeiras colonizadas com isolado de *G. clarum*, (19,4 esporos g⁻¹) distribuindo no terço superior do vaso.

Por ocasião da colheita foi determinada a produtividade de grãos e foram coletadas a parte aérea das plantas para a determinação de matéria seca e o teor de P, este último determinado segundo as metodologias descritas em Tedesco et al. (1995). Três dias antes da colheita foi realizada a coleta de raízes para a análise da colonização micorrízica, que foi determinada após clarificação e coloração das estruturas fúngicas (KOSKE & GEMMA, 1989).

As variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância de acordo com as fontes de variação testadas (genótipo, dose de P e inoculação com *G. clarum*) e as médias foram submetidas ao teste separação de médias de Duncan a 5% de significância.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na análise de variância (Tabela 9) constatou efeitos significativos dos fatores de variação na maioria das características avaliadas, sendo a única exceção o peso de grãos que não apresentou efeito dos fatores de variação. A massa seca da parte aérea das plantas apresentou efeito dos genótipos de feijoeiro e com as dose de P adicionadas, entretanto, não foi observada interação entre estes dois fatores. O teor de P nas plantas apresentou efeito da inoculação com *G. clarum* e em função da dose de P utilizada, sendo a interação entre estes fatores e os genótipos de feijoeiro também significativo. Para o P acumulado da parte aérea observou-se efeito do genótipo e das doses de P, sendo que a interação entre inoculação e genótipo foi significativa. Para a colonização micorrízica total foi observado efeito para as doses de P aplicadas no solo, sendo que a interação entre os fatores genótipo, inoculação e dose de P foram significativas. O peso de grãos por planta não apresentou efeito de nenhum dos fatores ou das interações.

Tabela 9. Resultado da análise de variância para as características massa seca, teor de P, P acumulado na parte aérea, peso dos grãos, colonização micorrízica total, para os fatores Genótipo, Dose de P e inoculação com *G. clarum*.

Fator de Variação	Massa seca (g pl ⁻¹)	Peso dos grãos (g pl ⁻¹)	Teor P (%)	P acumulado (mg pl ⁻¹)	Colonização (%)
Genótipo	*	ns	ns	*	ns
Inoculação	ns	ns	*	ns	ns
Dose P	*	ns	*	*	*
Genótipo*Inoculação	ns	ns	*	*	*
Genótipo*Dose P	ns	ns	*	*	*
Inoculação *Dose P	ns	ns	*	ns	*
Genótipo *Inoculação*Dose P	ns	ns	*	ns	*

* - Significativo a 5% pelo teste F. ns – Não significativo pelo teste F.

O genótipo comercial BAF115 apresentou o maior acúmulo de massa seca e P na parte aérea em relação aos genótipos crioulos BAF55 e BAF42 (Figuras 5 e 6).

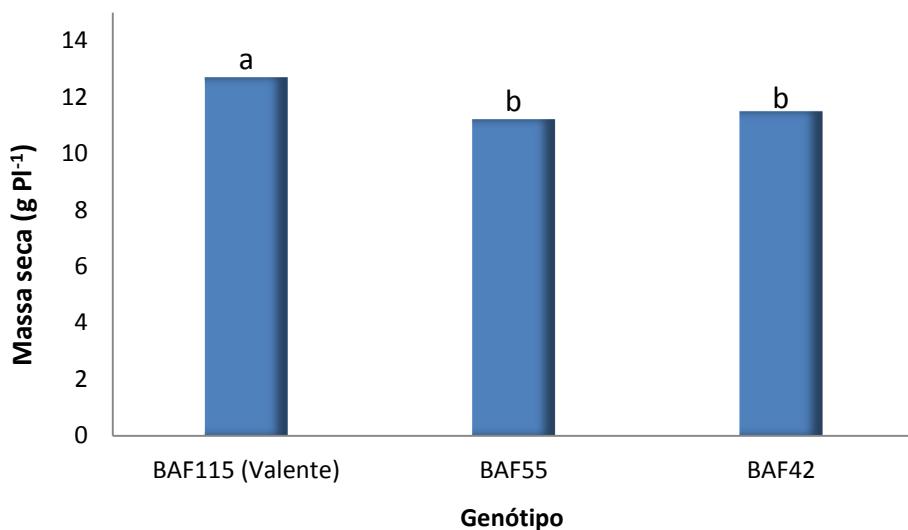


Figura 5. Efeito dos genótipos de feijoeiro na massa seca da parte aérea (g PI⁻¹). Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

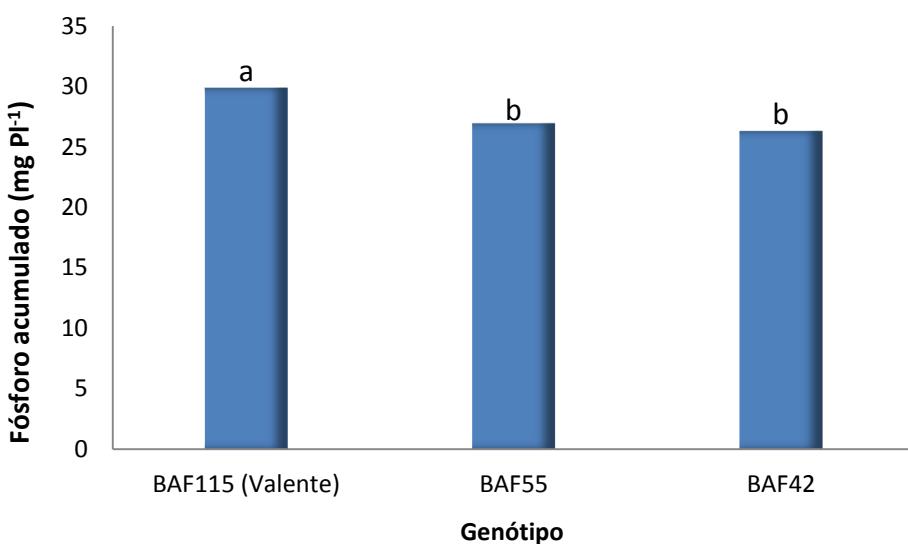


Figura 6. Efeito dos genótipos de feijoeiro no fósforo acumulado na parte aérea (mg PI⁻¹). Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

O efeito das doses de fósforo adicionadas ao solo na massa seca da parte aérea de feijoeiro pode ser observado na Figura 7. A maior dose de fósforo foi a que promoveu o maior incremento na massa seca. Este resultado sugere que a dose de fósforo não foi suficientemente alta para que a cultura atingisse a maior produção de massa seca. Portanto doses mais elevadas de fósforo podem ser testadas para que a disponibilidade de fósforo possibilite atingir e determinar o incremento máximo de massa seca e o nível crítico de fósforo no solo para micorrização das plantas.

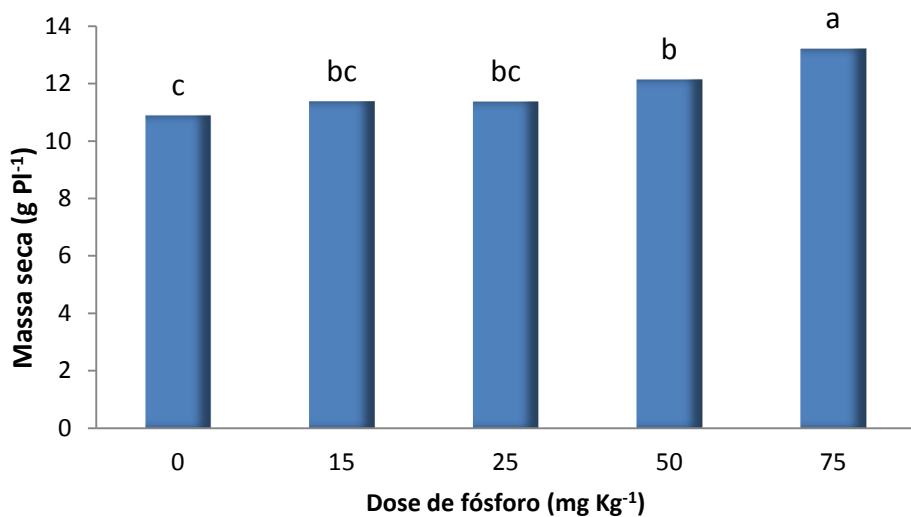


Figura 7. Efeito das doses de fósforo adicionadas ao solo na massa seca da parte aérea (g PI⁻¹). Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Para o teor de P na parte aérea foram observadas diferenças entre as condições de inoculação com *G. clarum* e presença de FMAs nativos, sendo o maior valor encontrado na condição de FMAs nativos. O teor de P nas plantas do genótipo BAF115 foi superior no tratamento sem aplicação de P. As diferenças encontradas entre os tratamentos não foram altas e o menor teor observado foi de 0,22% de P no tratamento com dose de 50 e 75 mg de P kg⁻¹ na condição de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos, respectivamente. No genótipo BAF55 o comportamento foi semelhante ao encontrado no genótipo BAF115, na condição de FMAs nativos, o maior valor observado foi no tratamento sem aplicação de P. Na condição de inoculação com *G. clarum* o único tratamento que diferiu dos demais de maneira negativa foi o tratamento com 50 mg de P kg⁻¹ que obteve o menor teor encontrado nesta condição (0,19% P). No genótipo BAF42 foi observado um comportamento diferente dos outros genótipos avaliados, a expectativa é que com o aumento das doses de P ocorra um aumento do teor de P na parte aérea das plantas, porém esse comportamento não foi observado nos genótipos anteriores. O teor de P na condição de inoculação com *G. clarum* foi superior no tratamento com 50 mg de P kg⁻¹; na condição de FMAs nativos os maiores valores foram observados nos tratamentos com 25 e 50 mg de P kg⁻¹ (Tabela 10).

Tabela 10. Teores de P (%) na parte aérea dos genótipos de feijoeiro BAF115, BAF42 e BAF55 em função da inoculação com *G. clarum* e de doses de P aplicadas no solo.

Dose de P (mg kg ⁻¹)	Genótipo BAF115		Genótipo BAF55		Genótipo BAF42	
	<i>G. clarum</i>	FMA _s Nativos	<i>G. clarum</i>	FMA _s Nativos	<i>G. clarum</i>	FMA _s Nativos
0	0,25 a	0,25 a	0,23 a	0,35 a	0,22 b	0,22 c
15	0,23 b	0,24 bc	0,22 a	0,24 b	0,21 c	0,23 bc
25	0,23 b	0,24 b	0,22 a	0,24 b	0,22 b	0,25 a
50	0,22 c	0,23 cd	0,19 b	0,26 b	0,24 a	0,24 ab
75	0,23 b	0,22 d	0,23 a	0,23 b	0,23 b	0,22 c
Médias	0,23	0,24	0,22	0,26	0,22	0,23

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Para o P acumulado na parte aérea no genótipo BAF115 foi observado efeito das doses de P somente na condição de inoculação com *G. clarum*, onde o maior valor foi no tratamento com a maior dose de P (75 mg de P kg⁻¹), o que indica que apesar do baixo teor de P encontrado neste tratamento a relação com a massa seca da parte aérea promoveu a elevação do P acumulado (Tabela 11). As condições de FMA_s nativos e inoculação com *G. clarum* não promoveram efeito no P acumulado no genótipo BAF115. No genótipo BAF55 foi possível observar poucas diferenças no P acumulado em função das doses de P, na condição de inoculação com *G. clarum* o menor valor encontrado foi de 21,18 mg de P com a dose de 50 mg de P kg⁻¹, sendo este diferente somente do encontrado no tratamento sem aplicação de P (0 mg de P kg⁻¹). Na condição de FMA_s nativos o menor valor foi de 23,58 mg de P no tratamento com a dose de 25 mg de P kg⁻¹, sendo este diferente do tratamento sem aplicação de P. A inoculação com *G. clarum* promoveu efeito no P acumulado do genótipo BAF55, a condição de FMA_s nativos apresentou valores superiores aos da condição de inoculação com *G. clarum*. No genótipo BAF42 foi observado efeito das doses de P aplicadas no solo no P acumulado na parte aérea somente na condição de inoculação com *G. clarum*, o maior valor foi no tratamento com a maior dose de P (75 mg de P kg⁻¹), sendo este diferente dos tratamentos com dose de P de 0 e 15 mg P kg⁻¹, de maneira similar como ocorreu no genótipo BAF115. As condições de FMA_s nativos e inoculação com *G. clarum* não promoveu efeito no P acumulado no genótipo BAF42 (Tabela 11).

Tabela 11. Fósforo acumulado (mg P⁻¹) na parte aérea dos genótipos de feijoeiro BAF115, BAF42 e BAF55 em função da inoculação com *G. clarum* e de doses de P adicionadas ao solo.

Dose de P (mg kg ⁻¹)	Genótipo BAF115		Genótipo BAF55		Genótipo BAF42	
	<i>G. clarum</i>	FMA _s Nativos	<i>G. clarum</i>	FMA _s Nativos	<i>G. clarum</i>	FMA _s Nativos
0	29,86 b	26,41 a	28,17 a	33,34 a	23,12 b	24,14 a
15	29,41 b	28,65 a	25,97 ab	23,58 b	22,79 b	26,16 a
25	26,89 b	30,51 a	23,88 ab	26,07 ab	24,69 ab	27,39 a
50	30,45 b	27,62 a	21,18 b	32,22 ab	28,51 a	28,22 a
75	37,40 a	31,80 a	25,88 ab	29,14 ab	29,07 a	29,10 a
Médias	30,80	29,00	25,01	28,87	25,63	27,00

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

A colonização micorrízica variou em função da inoculação com *G. clarum* e com as doses de P testadas. Foi possível observar para o genótipo comercial BAF115, menor colonização na dose de 50 mg de P kg⁻¹ com o valor de 16,55%, este tratamento não diferiu do tratamento com a dose 25 mg de P kg⁻¹, porém diferiu dos tratamentos com as demais dosagens de P. A inoculação com *G. clarum* não promoveu diferenças significativas quando comparamos com o tratamento com FMA_s nativos do solo. Foi possível observar que a elevação da dose de P não afetou a colonização por *G. clarum* no genótipo BAF115, enquanto o aumento da dose de P implicou em diminuição da colonização de 37% na dose 0 para 20% na dose 75 mg de P kg⁻¹, indicando um possível efeito inibitório da dose de P na micorrização.

No genótipo crioulo BAF55 na condição de FMA_s nativos não foi observado efeito da dose de P, porém quando comparamos as condições de FMA_s nativos e inoculação com *G. clarum* é possível observar uma diferença significativa a favor da inoculação *G. clarum*, a colonização micorrízica aumentou de 6,17% com a inoculação de *G. clarum*, nesta condição analisando o efeito de dose podemos observar que a menor colonização foi na dose de 50 mg de P kg⁻¹ com o valor de 13,54% e a maior colonização na dose de 25 mg de P kg⁻¹ com o valor de 46,53%, este resultado poderia indicar um efeito de inibição da colonização com o aumento da dose, porém isso não se confirma com o resultado do tratamento com a maior dose de P cujo resultado de colonização foi de 31,13%, ou seja, maior que no tratamento na dose de 50 mg de P kg⁻¹.

No genótipo crioulo BAF42 é possível observar efeito da dose de P na colonização micorrízica, na condição de inoculação com *G. clarum* a maior colonização foi encontrada no tratamento sem aplicação de P (0 mg de P kg⁻¹) com o valor de 35,97%, este tratamento foi diferente somente do tratamento com a maior dose de P (75 mg de P kg⁻¹) com a colonização

de 18,80%. Na condição de FMAs nativos o menor valor encontrado foi com a dose de 25 mg de P kg⁻¹, com o valor de 19,26% de raízes colonizadas com fungos micorrízicos, este tratamento foi diferente dos tratamentos com 15 e 50 mg de P kg⁻¹, que apresentaram os valores de 41,09% e 35,86% respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre as condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos do solo (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito das doses de P e inoculação com *G. clarum* na colonização micorrízica (%) nas raízes dos genótipos de feijoeiro BAF115, BAF55 e BAF42.

Dose de P (mg kg ⁻¹)	Genótipo BAF115		Genótipo BAF55		Genótipo BAF42	
	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos
0	40,06 a	37,08 a	36,45 ab	24,09 a	35,97 a	26,76 ab
15	33,89 a	27,97 ab	26,85 b	28,39 a	24,36 ab	41,09 a
25	27,47 ab	36,90 a	46,53 a	23,59 a	24,22 ab	19,26 b
50	16,55 b	25,41 ab	13,54 c	23,82 a	27,42 ab	35,86 a
75	40,33 a	20,18 b	31,13 b	23,77 a	18,80 b	32,88 ab
Médias	31,66	29,51	30,90	24,73	26,15	31,17

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Apesar do conhecimento de que a disponibilidade de P diminui a colonização micorrízica, os efeitos sobre o micélio externo são contraditórios. Em estudo com o objetivo de avaliar o micélio externo dos FMAs *Glomus intraradices* e *Gigaspora rosea*, associados à soja, sob doses crescentes de P (0, 25, 50, 100 e 200 mg kg⁻¹), foi possível observar que os FMA estimularam a produção de biomassa pela planta nas doses 0, 25 e 200 mg kg⁻¹ de P. A colonização micorrízica e o micélio externo total (MET) diminuíram com o aumento das doses de P. Ambos FMA apresentaram aumento do micélio externo ativo com o aumento das doses de P, mas isso não teve relação com a eficiência simbiótica. O MET apresentou correlação com a colonização radicular e com a eficiência micorrízica. A colonização radicular e o MET são mutuamente afetados pela disponibilidade de P (NOGUEIRA & CARDOSO, 2007).

Um estudo com o objetivo de avaliar o crescimento de mudas de citros micorrizadas em casa de vegetação com seis doses de P (0, 50, 100, 150, 200 e 250 mg de P kg⁻¹), em combinação com inoculação ou não do FMA *Glomus intraradices*, constatou que nas doses mais altas de P, nas plantas micorrizadas houve redução na altura, na matéria seca da parte aérea e na área foliar, menor taxa de transpiração e maior resistência estomática, quando comparadas com o controle não micorrizado. A redução no crescimento de mudas

micorrizadas em alta dose de P pode ser atribuída com a existência de forte dreno de carboidratos na raiz. O limite entre simbiose mutualística e parasitismo ficou evidenciado, para as variáveis avaliadas, em dose de P no substrato superior a 240 mg kg⁻¹ (SENA et al., 2004). Kaschuk et al (2010) observaram aumento significativo na produtividade de espécies de plantas leguminosas com a inoculação de FMA em ensaios em casa de vegetação, porém o efeito positivo da inoculação com FMA não foi observado em ensaios de campo. A resposta na produtividade de plantas leguminosas com a inoculação de FMA em ensaios conduzidos em vasos foi de 45%, sendo que houve incremento de 14% no teor de proteínas nos grãos (KASCHUK et al, 2010).

5.4. CONCLUSÃO

As doses de P proporcionaram efeitos no teor de P, conteúdo de P e massa seca da parte aérea das plantas de feijoeiro. Para a massa seca da parte aérea a dose de P mais elevada de 75 mg de P kg⁻¹ promoveu o incremento máximo. Este resultado demonstra que a dose máxima de P utilizada tenha sido suficiente apenas para suprir o dreno do solo e insuficiente para a cultura atingir o potencial de produção.

Os genótipos proporcionaram efeitos na massa seca e P acumulado da parte aérea das plantas de feijoeiro, sendo o genótipo comercial BAF115 (Valente) superior aos genótipos crioulos BAF55 e BAF42.

A colonização micorrízica foi regulada pelos fatores dose de P, genótipo e inoculação, a elevação da dose de P não afetou a colonização por *G. clarum* de no genótipo BAF115, enquanto o aumento da dose de P implicou em diminuição da colonização de 37% na dose 0 de P para 20% na dose 75 mg de P kg⁻¹. No genótipo crioulo BAF55 quando comparamos as condições de FMAs nativos e inoculação com *G. clarum* foi observado uma diferença a favor da inoculação *G. clarum*, a colonização micorrízica aumentou de 6,17% com a inoculação de *G. clarum*. No genótipo crioulo BAF42 na condição de inoculação com *G. clarum* a maior colonização foi encontrada no tratamento sem aplicação de P com o valor de 35,97%.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERBARA, R.L.L.; SOUZA, F.A. & FONSECA, H.M.A.C.; III - Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito além da nutrição. **Nutrição Mineral de Plantas**, 432p. (ed. FERNANDES, M.S.). SBCS, Viçosa, 2006.

BRESSAN, W.; SIQUEIRA, J.O.; VASCONCELLOS, C.A. & PURCINO, A.A.C.; Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 315-323, fev. 2001.

ELLIOTT, G.C; LÄUCHLI, A. Phosphorus efficiency and phosphate-iron interaction in maize. **Agronomy Journal**, Madison, v.77, n.2, p.399-403, 1985.

KASCHUK, G.; LEFFELAAR, P.A.; GILLER, C.E.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. & KUYPER, T.W.; Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses. **Soil Biology & Biochemistry**, n.42,125-127. 2010.

KOSKE, R.E. & GEMMA, J.N.; A modified procedure for staining roots to detect V-A mycorrhizas. **Mycological Research**, 92: 486-488, 1989.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C. & OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional de plantas: Princípios e aplicações. Piracicaba, Potafos, 308p. 1997.

MARSCHNER, H. & DELL, B. Nutrient-uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant Soil**, 159:89-102, 1994.

NAHAS, E. Solubilização microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, U.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Ufla, 1999. p. 467-486.

NOGUEIRA, M.A. & CARDOSO, E.J.B.N.; Phosphorus availability changes the internal and external endomycorrhizal colonization and affects symbiotic effectiveness. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v.64, n.3, p.295-300, 2007.

OLIVEIRA, I.P et al. Avaliação de cultivares de feijão quanto à eficiência no uso do fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.1, p.39-45, 1987.

SENA, J.O.A.; LABATE, C.A. & CARDOSO, E. J. B. N.; Caracterização fisiológica da redução de crescimento de mudas de citros micorrizadas em altas doses de fósforo. **R. Bras. Ci. Solo**, 28:827-832, 2004.

SMITH, S.E. et al. The involvement of mycorrhizas in assessment of genetically dependent efficiency of nutrient uptake and use. **Plant and Soil**, The Hague, v.146, n.2, p.169- 179, 1992.

TEDESCO, M. J.; VOLKWEISS, S. J.; BOHNEN, H.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A. Análises de solos, plantas e outros materiais. 2^a Ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 215p. **Boletim Técnico de Solos**, 5. 1995.

YOUNGDAHL, L.J. Differences in phosphorus efficiency in bean genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.13, n.11, p.1381-1392, 1990.

6. CAPÍTULO 4 - Nutrição fosfatada e expressão gênica em genótipos crioulo e comercial de feijoeiro inoculados com *Glomus clarum*.

RESUMO: A caracterização de acessos crioulos de feijoeiro associada ao uso eficiente de microrganismos promotores de crescimento pode ser de grande valor, já que apresentam maior probabilidade de conter alelos para adaptação local, resistência a doenças e tolerância as principais adversidades edafoclimáticas. As condições ambientais como o nível de P do solo e os fatores biológicos como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são responsáveis por mudanças na nutrição e por alterações na expressão de genes relacionados ao uso do P pela planta. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da interação entre genótipos de feijoeiro, doses de P e inoculação com *Glomus clarum*, na nutrição fosfatada e na expressão de genes relacionados ao uso eficiente do P. A dose de P proporcionou efeito na massa seca da parte aérea, o valor máximo de massa seca foi observado com a dose de 400 mg de P kg⁻¹. O efeito do genótipo foi observado no teor de P e P acumulado na primeira época de coleta, sendo que o genótipo crioulo BAF55 foi superior ao genótipo comercial BAF115. As doses de P proporcionaram efeito na colonização micorrízica nas duas épocas de coleta. Na primeira época de coleta, no genótipo comercial BAF115 com inoculação de *G. clarum* e dose de 100 mg P.kg⁻¹ houve elevação de 123% na colonização micorrízica em comparação com o tratamento sem aplicação de P, na condição de FMA nativos o comportamento foi similar. No genótipo crioulo BAF55 nas condições de inoculação com *G. clarum* e FMA nativos foi possível observar que o tratamento sem aplicação de P apresentou os menores valores. A interação entre genótipos, doses de P e inoculação com *G. clarum* proporcionou efeito na colonização micorrízica do feijoeiro. Na segunda época de amostragem, no genótipo BAF55 a inoculação com *G. clarum* aumentou a colonização em relação à condição de FMA nativos. No tratamento inoculado com *G. clarum* a maior colonização foi observada no tratamento com a dose de 600 mg de P kg⁻¹. A análise da expressão genética demonstrou que existe efeito dos genótipos analisados, doses de P e inoculação com *G. clarum* no gene PVPT. Foi observado na expressão gênica do gene PVPT que o genótipo crioulo BAF55 respondeu tanto com a inoculação com *G. clarum* quanto com a população de FMA nativas, enquanto que o genótipo comercial BAF115 (Valente)

respondeu somente no tratamento com FMAs nativos do solo. Em ambos os genótipos foi possível observar a resposta da expressão genética ocorreu na dose de 100 mg de P kg⁻¹, sendo que esta resposta está associada aos FMAs nativos do solo e não inoculação com *G. clarum*.

PALAVRAS-CHAVE: Gene PVPT, *Glomus clarum*, *Phaseolus vulgaris*, Fósforo.

ABSTRACT: The characterization of landraces of common bean associated with the efficient use of microorganisms growth promoters can be of great value, since most likely to contain alleles for local adaptation, disease resistance and tolerance to major climatic adversities. Environmental conditions such as soil P level and biological factors such as mycorrhizal fungi (AMF) are responsible for changes in nutrition and changes in gene expression related to the use of P by the plant. The objective of this study was to evaluate the effect of the interaction between bean genotypes, levels of P and inoculation with *Glomus clarum* in phosphorus nutrition and expression of genes related to the efficient use of P. The dose of P provided effect on shoot dry weight, the maximum of dry weight was observed with 400 mg P kg⁻¹. The effect of genotype was observed in P and P accumulated in the first collection time, and genotype BAF55 was superior to genotype commercial BAF115. The P present effect on mycorrhizal colonization in two harvests. In the first season of collection on the commercial BAF115 genotype inoculated with *G. clarum* and 100 mg P.kg⁻¹ was 123% increase in root colonization in comparison with the treatment without use of P, provided that AMF native behavior was similar. In genotype BAF55 conditions of inoculation with *G. clarum* and indigenous AMF was observed that the treatment without P application showed the lowest values. The interaction between genotypes, levels of P and inoculation with *G. clarum* show effect on colonization of bean. In the second sampling time, the genotype BAF55 inoculation with *G. clarum* increased colonization in relation to the status of indigenous AMF. In the treatment inoculated with *G. clarum* the major colonization was observed in treatment with the dose of 600 mg P kg⁻¹. The analysis of gene expression demonstrated that there is an effect of the genotypes studied, rates of P and inoculation with *G. clarum* PVPT gene. Was observed in gene expression of the gene that genotype PVPT BAF55 responded with both inoculation with *G. clarum* as with the native AMF population, while the genotype trade BAF115 (Valente) answered only in the AMF treatment with native soil. In both genotypes was possible to observe the response of gene expression occurred in a dose of 100 mg P kg⁻¹, and this response is associated with the native soil and mycorrhizal inoculation with non *G. clarum*.

KEYWORDS: Gene PvPT, *Glomus clarum*, *Phaseolus vulgaris*, Phosphorus.

6.1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*) é uma das principais leguminosas cultivada para alimentação humana em solos ácidos tropicais deficientes em P. A origem do feijoeiro ocorreu a partir de dois principais bancos de genes, da América Central e da América Andina de montanha, áreas que têm proporcionado excelentes recursos genéticos para estudar e melhorar a eficiência destas plantas quanto ao uso do P do solo (TIAN et al., 2007). Dois genótipos comuns de feijoeiro, G19833 (P eficientes) e DOR364 (P ineficiente), bem como suas linhagens recombinantes foram utilizados para elucidar os mecanismos morfológicos, fisiológicos e genéticos que envolvem o uso eficiente do P, os quais incluem o desenvolvimento de um sistema radicular mais superficial, a maior exsudação de ácidos orgânicos e prótons e a formação de aerênquimas nas raízes corticais (SHEN et al, 2002; FAN et al, 2003; LIAO et al, 2004; LIANG et al., 2010).

As plantas desenvolveram durante a sua evolução um conjunto de estratégias adaptativas para melhorar a aquisição e utilização do P, como as modificações na morfologia da raiz e da arquitetura (LIAO et al. 2004; DEVAIAH et al, 2007a, 2007b; ZHOU et al, 2008; LIANG et al., 2010), aumentando a atividade da fosfatase ácida (APase) (WANG et al, 2009) e aumentando a expressão de um conjunto diversificado de genes (RAGHOTHAMA, 1999; VANCE et al, 2003). Mais recentemente, o trabalho realizado por Liang et al., (2010) sugeriu que a maior expressão dos genes P-responsivo PvPT1 e PvPS2 pode contribuir para aquisições e translocação mais eficientes de P no genótipo P-eficiente (G19833) sob condições P limitantes (TIAN et al. 2007). A identificação de genes associados à deficiência de P é essencial para compreender não só os mecanismos moleculares que regem a eficiência de P, mas também para seleção assistida por marcadores de reprodução e melhoramento genético do feijoeiro. A deficiência de fosfato tem profundo impacto sobre o crescimento de feijoeiro comum, como indicado por folhas verdes escuras e expansão foliar reduzida (TIAN et al., 2007).

O gene PvPT está relacionado com a alta afinidade do transportador de P e a análise de expressão de genes diferencialmente induzidos sob deficiência de P mostrou que os genes envolvidos no metabolismo de carbono, aquisição de P, transporte, limpeza e remobilização são coordenadamente reguladas em feijoeiro em condições de baixa disponibilidade de P (TIAN et al., 2007). No mesmo estudo de Tian et al., (2007) os resultados demonstraram

ainda que a expressão de genes PvIDS4-like PvPS2 e PvPT1 é influenciada pela disponibilidade de P, e que em dois genótipos de feijoeiro comum, a expressão destes três genes de raízes e parte aérea é dependente da disponibilidade do P no meio, o que sugere que o genótipo G19833 (P eficiente) responde a deficiência mais rapidamente do que o Dor364 (P ineficiente).

A simbiose micorrízica arbuscular é a mais ancestral dentre todos os tipos de simbioses conhecidas. Evidências fósseis indicam que as primeiras plantas terrestres já estavam colonizadas por fungos que apresentavam estruturas miceliais e esporos similares aos dos atuais fungos arbusculares (FMA) (REDECKER et al., 2000; BERBARA et al., 2006). A associação entre plantas e FMAs é considerada simbiótica pelo fato de os organismos coexistirem em um mesmo ambiente físico (raiz e solo) e mutualístico, porque, em geral, ambos os simbiontes se beneficiam da associação. Ela é considerada como mutualista nutricional, em que a planta supre o fungo com energia para crescimento e manutenção via produtos fotossintéticos, enquanto o fungo provê a planta com nutrientes e água. Nesse sentido, essa simbiose amplia a capacidade de absorção de nutrientes por parte do simbionte autotrófico e, consequentemente, a sua competitividade interespecífica e produtividade (BERBARA et al., 2006).

No caso do P existem evidências de grupos de genes que são especificamente regulados para baixo quando as plantas estão micorrizadas. Em *Medicago truncatula*, observou-se que quatro genes fosfato-inanição induzida incluindo dois genes transportadores de fosfato, um gene de função desconhecida (MT4), e um homólogo da fosfatase ácida foram regulados para baixo na colonização da raiz por fungos micorrízicos (BURLEIGH et al. 1997; LIU et al. 1998). Os níveis elevados de fosfato no meio externo regulam para baixo a expressão destes genes, e desde que a simbiose geralmente resulta em um aumento do nível de fosfato nas raízes, o fato de que esses genes são reprimidos na simbiose não é tão surpreendente (BURLEIGH et al. 1997; LIU et al. 1998; HARRISON, 1999). Os mecanismos envolvidos na maior absorção de P pela planta micorrizadas, entretanto, ainda não estão totalmente esclarecidos, atribuindo-se, em parte, ao aumento no número de sítios de absorção promovido pela hifa e/ou maior afinidade dos carregadores da hifa ou da raiz colonizada ao P (SILVEIRA & CARDOSO, 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inoculação de *G. clarum* no crescimento, nutrição fosfatada e na expressão de genes relacionados ao uso eficiente do P em genótipo crioulo e comercial de feijoeiros em diferentes doses de P adicionadas ao solo.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi conduzido um ensaio em casa de vegetação no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade Estadual de Santa Catarina, no município de Lages, no período de 10/02/2010 a 29/03/2010. O ensaio foi conduzido em duplicata para permitir a coleta em duas épocas, sendo a primeira aos 28 dias após a semeadura em 09/03/2010, e a segunda aos 48 dias após a semeadura em 29/03/2010. A coleta em épocas diferentes teve como objetivo avaliar o período de desenvolvimento vegetal onde é possível observar um efeito significativo dos tratamentos aplicados na nutrição e expressão gênica das plantas de feijoeiro.

Os tratamentos foram arranjados em fatorial 2x2x5, sendo um genótipo de feijoeiro comercial (BAF 115 – Valente) e um genótipo crioulo (BAF 55); dois tratamentos de inoculação (população nativa de FMA e inoculação de *G. clarum*) e cinco doses de P adicionadas ao solo (0, 100, 200, 400, e 600 mg de P dm⁻³). Os tratamentos foram distribuídos em delineamento completamente casualizados com cinco repetições.

A adubação foi realizada antes do plantio utilizando uma solução de fosfato de potássio, sendo que o teor de potássio foi corrigido para todos os tratamentos utilizando uma solução de cloreto de potássio. O teor de fósforo observado no solo natural foi de 0,9 mg dm⁻³. A inoculação ou não com FMA foi realizada utilizando 5 gramas de um inóculo contendo um isolado de *G. clarum* com concentração de 20,6 esporos por grama, totalizando 103 esporos por vaso e o solo com a população nativa de FMAs.

As plantas foram conduzidas com uma mistura de solo e Areia (2:1; v/v), em vasos de 6 kg. O solo utilizado foi um Nitossolo, coletado no município de Capão Alto - SC, nas coordenadas 27°53'50,73"S e 50°25'44,04"O, Com teor de argila de 77% e 3,7% de matéria orgânica, pH natural de 4,7; teor de P de 0,9 mg dm⁻³, teor de K de 85 mg dm⁻³ e CTC efetiva de 4,7 cmol_c dm⁻³. O solo foi peneirado e o seu pH foi corrigido para 5,8. Todas as plantas foram inoculadas com rizóbio, utilizando o inoculante para feijão da empresa Turfal, composto com a cepa de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4088). Uma semana após a geminação foi realizado um desbaste mantendo apenas uma planta por vaso.

Com as amostras da primeira e segunda coleta foi determinado a massa de matéria seca e teor de P, segundo as metodologias descritas em Tedesco et al. (1995) e pela relação da matéria seca com o teor de P foi calculado o P acumulado. A coleta de raízes foi realizada conjuntamente para a análise da colonização micorrízica, que foi determinada após clarificação e coloração das estruturas fúngicas (KOSKE & GEMMA, 1989). Os resultados

de colonização micorrízica foram transformados em percentagem para uma melhor interpretação.

Foram coletadas amostras dos tecidos foliares 43 dias após o plantio, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra-freezer a -80°C até as análises. A extração de RNA-total foi feita por meio da homogeneização do tecido fresco (150 mg) em 1,5 mL de regente Trizol, composto de fenol e isotiocianato de guanidina (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987). O RNA recuperado da fase aquosa por precipitação em álcool isopropanol, foi seguido por lavagens com etanol 70% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenado a -80 °C. O RNA-total extraído foi quantificado por OD260 e OD260/280, seguido por uma corrida em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A obtenção do cDNA e amplificação da região específica do gene de interesse por RT-PCR, foi realizada utilizando um Kit específico da Invitrogen e seguindo a recomendação do fabricante.

Foram examinados dois genes específicos: O gene PVPT, que possui alta afinidade ao transportador do P e a sua expressão é dependente da disponibilidade do P no meio (TIAN et al., 2007) e o gene PvPAP3 que pertence à PAP subfamília de Apase. A PvPAP3 pode funcionar na adaptação de plantas de feijoeiro conduzidas em níveis limitantes de P, possivelmente através do seu envolvimento no ATP de hidrólise e a utilização de ATP extracelular como uma fonte de P do meio ambiente. Ambos apresentam “primers” relatados nos trabalhos nos quais foram clonados e assim selecionados. Realizaram-se análises para observar a integridade do “primer” e utilizou-se o BLAST das respectivas seqüências de nucleotídeos para detectar o grau de similaridade com as diferentes espécies.

O RT-PCR inclui Taq DNA polimerase, mistura de nucleotídeos, tampões com e sem MgCl₂, controles com DNA e com primer. A mistura destes componentes e as concentrações foram o mais semelhantes com as citações nos respectivos trabalhos (HERNADEZ et al., 2007). Após a reação da transcriptase reversa o cDNA obtido foi clonado e seqüenciado para checar se o cDNA obtido corresponde ao gene de interesse. A quantificação foi feita de forma relativa, após padronização das condições de amplificação e o uso dos devidos controles (RT-PCR). Foi observado o nível de expressão do gene em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo; o tamanho do fragmento de cDNA foi determinado pelo uso de padrões de DNA com peso molecular conhecido (Invitrogen).

A expressão dos genes nos diferentes tratamentos foi realizada por PCR em tempo real, conforme descrito por Ramirez et al. (2005). Muitos trabalhos relatam a técnica RT-PCR como sendo de grande valia para detectar de forma bastante sensível a expressão do nível de

um transcrito, considera o uso de alguns padrões internos em diluição serial como referência para determinar com maior exatidão o nível de expressão do gene de interesse. Neste trabalho foi usado gene actina (ACT) como gene de referência.

Os ensaios foram analisados de forma independente, sendo os resultados das variáveis avaliadas submetidas à análise de variância (ANOVA) de acordo com as fontes de variação testadas (genótipo, dose de P e inoculação) e as médias submetidas ao teste de Duncan a 5% de significância.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Efeito da primeira época de coleta (28 dias após a semeadura)

Os resultados da análise de variância dos dados de massa da matéria seca, teor de P, P acumulado na parte aérea e colonização micorrízica total são apresentadas na tabela 13.

Tabela 13. Resultado da análise de variância dos dados da primeira coleta (28 dias) para produção de massa seca da parte aérea, teor de P na parte aérea, P acumulado e colonização micorrízica em plantas de feijoeiro para os fatores genótipo, inoculação com *G. clarum* e doses de P.

Fator de Variação	Massa seca (g)	Teor P (%)	P acumulado (mg P l ⁻¹)	Colonização (%)
Genótipo	ns	*	*	*
Inoculação	ns	ns	ns	ns
Dose P	*	*	*	*
Genótipo*Inoculação	ns	ns	ns	ns
Genótipo*Dose P	ns	ns	ns	*
Inoculação * Dose P	ns	*	*	ns
Genótipo*Dose P*Inoculação	ns	ns	ns	*

* - Significativo a 5% pelo teste F. ns – Não significativo pelo teste F.

Para a massa seca da parte aérea foi observado somente efeito significativo das doses de P aplicadas no solo (Figura 8), com a dose de 400 mg P kg⁻¹ obteve-se o maior valor, porém este não foi diferente do tratamento com a dose máxima de 600 mg P kg⁻¹.

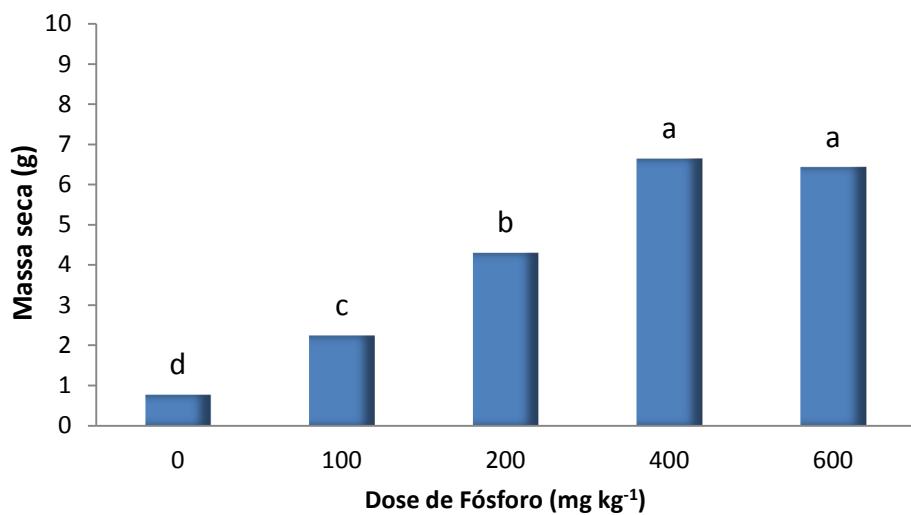


Figura 8. Efeito das doses de P na massa seca da parte aérea ($g P l^{-1}$) na época de colheita aos 28 dias após o plantio. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Os dois genótipos testados (BAF 115 e BAF55) não apresentaram diferenças na produção de massa seca da parte aérea (Tabela 13), entretanto apresentaram efeito significativo no teor de P (%) e P acumulado na parte aérea (Figura 9 e 10), sendo que o genótipo crioulo de feijoeiro (BAF55) apresentou maiores teores de P e P acumulado na parte aérea.

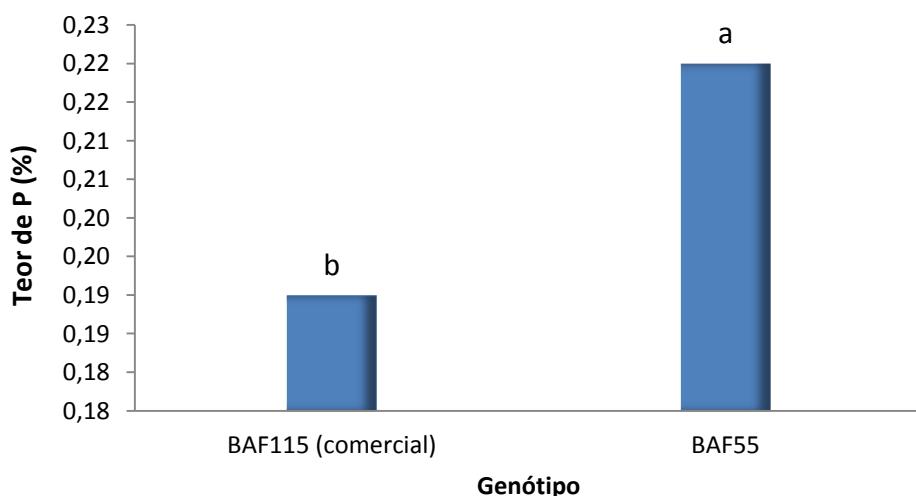


Figura 9. Efeito dos genótipos de feijoeiro no teor de P (%) na parte aérea na época de colheita aos 28 dias após o plantio. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

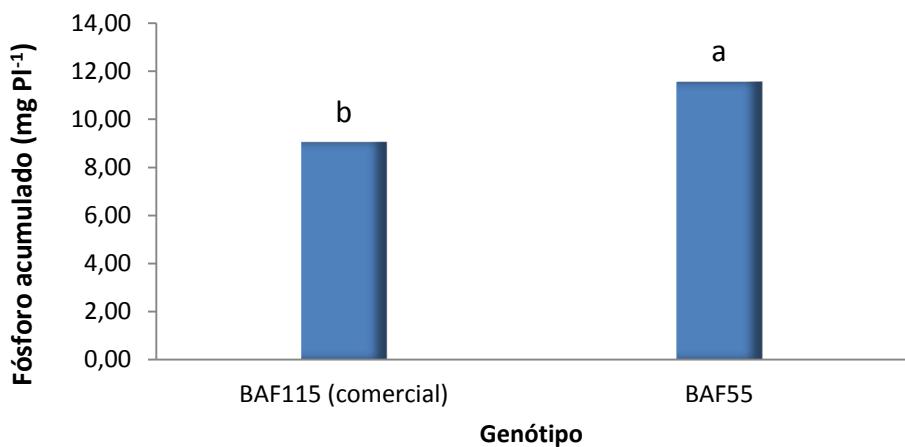


Figura 10. Efeito dos genótipos de feijoeiro no P acumulado na parte aérea (mg P l^{-1}) na época de colheita aos 28 dias após o plantio. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

O teor de P da parte aérea apresentou efeito das doses de P no genótipo comercial BAF115, tanto na condição de inoculação com *G. clarum* como com FMAs nativos do solo, independente da inoculação com *G. clarum* ou FMA nativos, a aplicação de P alterou o teor de P na parte aérea das plantas de feijoeiro (tabela 14). Na condição de inoculação com *G. clarum* o maior valor observado foi de 0,36% na dose de 600 mg P kg^{-1} , o valor de 0,36% pode ser considerado alto para os padrões de teor de P da parte aérea, porém a média de todas as doses desta condição foi de 0,17% que pode ser considerada baixa para os padrões normais de teor de P. O menor valor observado foi no tratamento sem adição de P (0,04%), sendo este inferior aos demais. Na condição de FMAs nativos do solo o maior teor observado foi de 0,38% no tratamento com a dose de 400 mg P kg^{-1} e os menores valores do teor de P foram de 0,07% e 0,11% obtidos nos tratamentos com 0 e 200 mg P kg^{-1} respectivamente. Para o genótipo BAF115 as condições de FMAs nativos e inoculação com *G. clarum* apresentaram diferenças significativas, na condição de FMAs nativos o teor de P da parte aérea foi superior a condição de inoculação com *G. clarum*. No genótipo crioulo BAF55 para o teor de P da parte aérea foi observado efeito das doses de P, na condição de inoculação com *G. clarum*, sendo o maior teor de P encontrado na dose de 600 mg P kg^{-1} , o valor encontrado neste tratamento foi o mesmo observado no genótipo comercial BAF115, este tratamento foi superior aos demais. O menor teor de P foi de 0,05% observado no tratamento sem adição de P, o comportamento do teor de P em relação às doses de P na condição de inoculação com *G. clarum* foi semelhante entre os dois genótipos analisados, na condição de FMAs nativos do solo o maior teor foi de 0,41% observado no tratamento com a dose de 400 mg P kg^{-1} , este

tratamento foi diferente dos demais, o menor teor de P foi de 0,05% observado no tratamento sem adição de P, apesar da diferença significativa entre os tratamentos com o menor e maior teor de P da condição de FMAs nativos para o teor de P foi de 0,23% que é coerente com o esperado. As condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos não apresentaram efeito no teor de P (Tabela 14).

Tabela 14. Teor de P na parte aérea (%) de genótipos de feijoeiro BAF115 e BAF55 inoculados com *G. clarum* em diferentes doses de P adicionadas ao solo na época de colheita aos 28 dias após o plantio.

Dose de P (mg kg ⁻¹)	Genótipo BAF115		Genótipo BAF55	
	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos
0	0,04 c	0,07 c	0,05 c	0,05 c
100	0,12 b	0,23 b	0,19 b	0,24 b
200	0,16 b	0,11 c	0,27 b	0,19 bc
400	0,17 b	0,38 a	0,21 b	0,41 a
600	0,36 a	0,23 b	0,36 a	0,25 b
Médias	0,17	0,20	0,22	0,23

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

No P acumulado na parte aérea foi observado efeito das doses de P no genótipo comercial BAF115, na condição de inoculação com *G. clarum* o maior valor obtido foi de 23,08 mg P no tratamento com dose de 600 mg P kg⁻¹, este tratamento foi o 50,17% superior ao tratamento com a dose de 400 mg P kg⁻¹ que apresentou o segundo maior conteúdo de P, o tratamento com a dose máxima de P foi superior aos demais, na condição de FMAs nativos o maior conteúdo de P foi de 22,57% no tratamento com a dose de 400 mg P kg⁻¹, sendo este significativamente superior aos demais e concordando com o comportamento do teor de P. As condições de FMAs nativos e inoculação com *G. clarum* não afetou o P acumulado da parte aérea de plantas de feijoeiro. No genótipo crioulo BAF55 o P acumulado foi afetado pelas doses de P, o comportamento foi semelhante ao genótipo BAF115 e ao teor de P da parte aérea que é diretamente relacionada com o conteúdo total de P, na condição de inoculação com *G. clarum* o maior valor observado foi de 24,26 mg P kg⁻¹ no tratamento com a dose de 600 mg P kg⁻¹, sendo que este tratamento com a maior dose de P foi superior aos demais, na condição de FMAs nativos o maior valor foi de 28,14 mg P kg⁻¹ no tratamento com a dose de 400 mg P kg⁻¹ que foi superior aos demais tratamentos. As condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos não proporcionaram efeito no P acumulado (Tabela 15).

Em estudo com inoculação de FMAs em feijoeiro com condições de alto e baixo P foram realizadas avaliações quanto à atividade das enzimas superoxidase dismutase (SOD), guaiacol-peroxidase (GPX) e catalase (CAT), que demonstraram não haver efeito da inoculação e baixa colonização pelo fungo *G. intraradices* nas condições de alto (150 mg P kg⁻¹) e baixo (20 mg P kg⁻¹) P (LAMBAIS et al., 2003).

Tabela 15. Fósforo acumulado na parte aérea (mg por planta) de genótipos de feijoeiro BAF115 e BAF55 inoculados com *G. clarum* em diferentes doses de P adicionadas ao solo na época de colheita aos 28 dias após o plantio.

Dose de P (mg kg ⁻¹)	Genótipo BAF115		Genótipo BAF55	
	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos
0	0,40 d	0,28 c	0,56 c	0,39 c
100	1,88 cd	5,93 c	5,16 c	3,87 cd
200	6,30 c	3,29 c	13,76 b	9,41 bc
400	11,50 b	22,57 a	14,14 b	28,14 a
600	23,08 a	15,04 b	24,26 a	15,82 b
Médias	8,63	9,42	11,57	11,53

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Para a colonização micorrízica no genótipo comercial BAF115 foi observado efeito das doses de P, na condição de inoculação com *G. clarum* houve uma elevação da colonização micorrízica com a aplicação de P, quando observamos os resultados para o tratamento sem P (0 mg P kg⁻¹) e o tratamento com a dose de P mais baixa aplicada (100 mg P kg⁻¹), observamos um incremento de 123% na colonização micorrízica, porém quando comparamos o tratamento com a dose de 600 mg P kg⁻¹ com o tratamento com a dose de 100 mg P kg⁻¹, observamos que o incremento foi de 61%, ou seja, a adição de P na dose de 100 mg P kg⁻¹ estimula a colonização micorrízica em uma taxa mais elevada do que nas doses subseqüentes. Na condição de FMAs nativos do solo o comportamento foi similar ao encontrado na condição de inoculação com *G. clarum*, o maior valor de colonização foi de 15,46% no tratamento com a dose mais alta de P (600 mg P kg⁻¹) e o menor valor foi 5,21% no tratamento sem adição de P com (0 mg P kg⁻¹), as condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos foram diferentes para a percentagem de colonização, sendo que a condição de FMAs nativos foi superior a condição de inoculação *G. clarum*. No genótipo crioulo BAF55 para a colonização micorrízica foi possível observar efeito das doses de P, na condição de inoculação com *G. clarum* a única diferença significativa observada foi em relação a

colonização do tratamento sem adição de P que cujo valor foi de 4,07% que foi diferente dos demais tratamentos, o maior valor de colonização foi de 10,91% observado no tratamento com 200 mg P kg⁻¹, na condição de FMAs nativos do solo o comportamento foi similar a da condição de inoculação com *G. clarum*, o menor valor foi de 5,45% no tratamento sem adição de P, sendo este tratamento inferior aos tratamentos com 400 e 600 mg P kg⁻¹ que apresentaram os valores de 10,55% e 11,42% de colonização micorrízica respectivamente, as condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativas não apresentaram diferenças significativas em relação a percentagem de colonização micorrízica (Tabela 16).

As simboses dos FMAs e rizóbios são moduladas pelos fatores ambientais como a disponibilidade de P e N, os benefícios destas simboses dependem da relação entre o custo despendido pela planta e o benefício gerado pela maior absorção de P, proporcionado pelas micorrízas e pela fixação biológica de nitrogênio realizada pelos rizóbios (MORTIMER et al., 2008). Wang et al (2011) observaram efeitos positivos no desenvolvimento de plantas de soja com a coinoculação de rizóbios e FMA em condições de baixo P e/ou N, porém em condição de P e N adequados não foi observado efeito com a coinoculação com FMA.

Tabela 16. Efeito das doses de P e inoculação com *G. clarum* na colonização micorrízica (%) das raízes de feijoeiro dos genótipos BAF115 e BAF55 na época de colheita aos 28 dias após o plantio.

Dose de P (mg kg ⁻¹)	Genótipo BAF115		Genótipo BAF55	
	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos
0	3,90 d	5,21 c	4,07 b	5,45 b
100	8,72 bc	9,08 b	10,20 a	8,97 ab
200	6,97 cd	12,72 ab	10,91 a	7,37 ab
400	11,91 ab	12,58 ab	8,21 a	10,55 a
600	14,01 a	15,46 a	10,59 a	11,42 a
Médias	9,10	11,01	8,80	8,75

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

6.3.2. Efeito da segunda época de coleta (48 dias após a semeadura)

Os resultados da análise de variância dos dados de produção de massa seca, teor de P, e P acumulado na parte aérea e da colonização micorrízica das raízes do feijoeiro são apresentados na Tabela 17. Com a análise fatorial dos resultados do ensaio foi possível observar o efeito da inoculação de *G. clarum* no teor de P, P acumulado na parte aérea e na colonização micorrízica das raízes. A inoculação com *G. clarum* foi positiva no aumento da

colonização micorrízica, porém a inoculação com *G. clarum* decresceu o teor de P na planta e o P acumulado quando comparado com o tratamento sem inoculação de *G. clarum* e com FMAs nativos do solo. Foi observado efeito da interação entre a inoculação de *G. clarum* e o genótipo de feijoeiro para o teor de P, também foi observado efeito da interação entre genótipo e dose de P para o teor de P e colonização micorrízica. Foi observado efeito do fator dose de P no teor de P, P acumulado da parte aérea e colonização micorrízica. Foi observado efeito do genótipo na colonização micorrízica, sendo que o genótipo comercial BAF55 (Valente) teve um maior percentual em relação ao genótipo crioulo BAF55.

Tabela 17. Resultado da análise de variância dos dados da segunda coleta (48 dias) para produção de massa seca da parte aérea, teor de P na parte aérea, P acumulado e colonização micorrízica em plantas de feijoeiro para os fatores genótipo, inoculação com *G. clarum* e doses de P.

Fator de Variação	Massa seca (g)	Teor P (%)	P acumulado (mg P ⁻¹)	Colonização (%)
Genótipo	ns	ns	ns	*
Inoculação	ns	*	*	*
Dose P	*	*	*	*
Genótipo*Inoculação	ns	*	ns	ns
Genótipo*Dose P	ns	*	*	*
Inoculação * Dose P	ns	*	*	ns ns
Genótipo* Inoculação * Dose P	ns	*	*	*

* - Significativo a 5% pelo teste F. ns – Não significativo pelo teste F.

Foi observado efeito significativo do fator dose de P aplicada no solo na massa seca da parte aérea. Pode-se observar o efeito positivo na massa seca da parte aérea das plantas dos tratamentos com as doses de 400 e 600 mg de P kg⁻¹ que apresentaram os maiores valores e diferiram das demais doses (Figura 11).

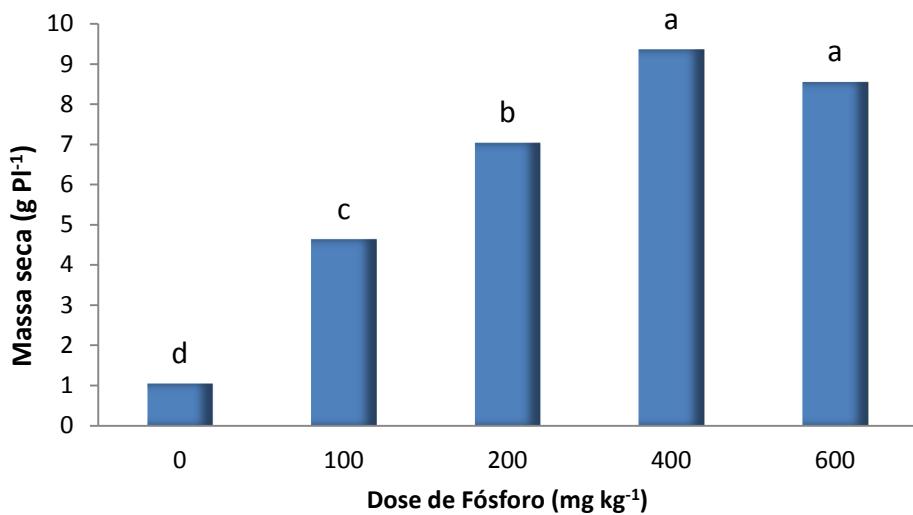


Figura 11. Efeito das doses de P na massa seca da parte aérea (g PI^{-1}) época de colheita aos 48 dias após o plantio. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

O teor de P da parte aérea apresentou efeito das doses de P aplicadas e pela inoculação de *G. clarum*. Nos tratamentos inoculados com *G. clarum* no genótipo BAF115 o maior teor foi com a dose de 600 mg de P kg^{-1} e diferiu das doses de 0 e 100 mg de P kg^{-1} . Nos tratamentos sem inoculação com *G. clarum* o maior teor foi com a dose de 400 mg de P kg^{-1} e este diferente do tratamento com as doses 0 e 600 mg de P kg^{-1} . O teor de P foi significativamente maior nos tratamentos com FMAs nativos, quando comparado com os tratamentos inoculados com *G. clarum*. No genótipo BAF55 o teor de P apresentou efeito das doses de P, nos tratamentos com inoculação de *G. clarum* os maiores teores foram observados com as doses de 400 e 600 mg de P kg^{-1} , sendo estes diferentes dos demais. Nos tratamentos com FMAs nativos os maiores teores de P foram encontrados nos tratamentos com as doses de 200 e 400 mg de P kg^{-1} , a inoculação com *G. clarum* não teve efeito no teor de P no genótipo BAF55 (Tabela 18).

Tabela 18. Teor de P na parte aérea (%) de genótipos de feijoeiro BAF115 e BAF55 inoculados com *G. clarum* em diferentes doses de P adicionadas ao solo na época de colheita aos 48 dias após o plantio.

Dose de P (mg kg ⁻¹)	Genótipo BAF115		Genótipo BAF55	
	<i>G. clarum</i>	FMA Nativos	<i>G. clarum</i>	FMA Nativos
0	0,04 c	0,16 b	0,06 c	0,05 c
100	0,12 b	0,33 a	0,15 b	0,18 bc
200	0,18 ab	0,25 ab	0,21 b	0,39 a
400	0,15 ab	0,34 a	0,33 a	0,38 a
600	0,22 a	0,21 b	0,30 a	0,21 b
Médias	0,14	0,26	0,21	0,24

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

O P acumulado apresentou efeito das doses de P e da inoculação de *G. clarum*. No genótipo BAF115 o tratamento inoculado com *G. clarum* apresentou o maior conteúdo de P com a dose de 600 mg de P kg⁻¹, nos tratamentos com FMA Nativos o maior valor de P acumulado foi com a dose de 400 mg de P kg⁻¹. O P acumulado foi maior nos tratamentos com FMA Nativos, quando comparado com os tratamentos inoculados com *G. clarum* no genótipo BAF115. No genótipo BAF55 o maior valor de P acumulado foi observado no tratamento com a dose de 400 mg de P kg⁻¹ tanto nos tratamentos inoculados com *G. clarum* e com FMA Nativos. (Tabela 19).

As diferenças entre genótipos na eficiência de utilização do P também foi observado por Lana et al., (2006) que realizaram um estudo com o objetivo de determinar a eficiência na absorção e utilização de P de genótipos de feijoeiro e concluíram que existem diferenças entre genótipos. Os autores classificaram como eficientes na absorção e utilização de P os genótipos BAT 477, Jalo Precoce e Roxo, e como genótipos responsivos foram os Carioca MG, Jalo Precoce, Pérola e Roxo.

O efeito da micorriza formada por *Glomus etunicatum* nos parâmetros cinéticos da absorção radicular de P e no influxo de P em feijoeiro, cultivar IAC-Carioca, em duas épocas do ciclo da planta foi avaliado por Silveira & Cardoso (2004). A micorrização promoveu maior crescimento e absorção de P pelas plantas, principalmente na fase de enchimento das vagens e apresentaram maior influxo líquido de P por planta, em ambas as fases. O carbono microbiano foi o parâmetro que mais se relacionou com a absorção de P, ocorrendo correlação significativa entre este e o teor e acúmulo de P na parte aérea do feijoeiro (SILVEIRA & CARDOSO, 2004).

Tabela 19. Fósforo acumulado na parte aérea (mg por planta) de genótipos de feijoeiro BAF115 e BAF55 inoculados com *G. clarum* em diferentes doses de P adicionadas ao solo na época de colheita aos 48 dias após o plantio.

Dose de P (mg kg ⁻¹)	Genótipo BAF115		Genótipo BAF55	
	<i>G. clarum</i>	FMA Nativos	<i>G. clarum</i>	FMA Nativos
0	0,47 c	1,27 c	0,35 d	0,80 c
100	6,01 c	15,05 b	7,38 dc	7,54 c
200	14,27 b	18,58 ab	11,72 c	26,14 a
400	14,56 b	28,04 a	36,30 a	31,16 a
600	21,46 a	17,86 ab	23,45 b	16,95 b
Médias	11,35	16,16	15,84	16,52

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

As doses de P na apresentou efeito na colonização micorrízica, principalmente nos tratamentos inoculados com *G. clarum*, onde no genótipo BAF115 as maiores colonizações foram observadas nos tratamentos com as doses de 200, 400 e 600 mg de P kg⁻¹. Nos tratamentos com FMA nativos o tratamento com a dose 0 mg de P kg⁻¹ apresentou a menor colonização, sendo inferior aos demais tratamentos com doses mais elevadas de P. No genótipo BAF55, ao contrário que no genótipo comercial a inoculação com *G. clarum* incrementou a colonização micorrízica em relação c condição de FMA nativos. Nos tratamentos inoculados com *G. clarum* a maior colonização foi observada no tratamento com a dose de 600 mg de P kg⁻¹, o tratamento com a dose 100 mg de P kg⁻¹, não diferiu dos tratamentos com as doses de 200 e 400 mg de P kg⁻¹ e foi superior ao tratamento com a dose 0 mg de P kg⁻¹. Nos tratamentos com FMA nativos o comportamento em relação à colonização do genótipo BAF55 foi igual ao apresentado no genótipo BAF115, o tratamento com a dose 0 mg de P kg⁻¹ apresentou a menor colonização, sendo inferior aos demais tratamentos com doses mais elevadas de P (Tabela 20).

Costa et al., (2000) em estudo com inoculação de FMA em plantas de feijoeiro e aplicação de ácido salicílico (AS) em condições de alto e baixo P observaram que o AS inibe a colonização micorrízica intra-radicular, de forma semelhante a condições de alto P e que no geral, o AS induziu atividades de quitinases e inibiu atividades de b-1,3-glucanases nas raízes. Lambais (1996) em estudos com FMA observou que, em raízes micorrizadas de feijão, os níveis de mRNAs codificando CHI (chalcone isomerase) são suprimidos em relação as raízes não micorrizadas, em baixo e alto níveis de fosfato, enquanto os níveis de PAL (fenilalanina amônia-liase) e CHS (chalcone sintase) são comparáveis.

Myauchi et al., (2008) avaliaram o efeito de três bactérias diazotróficas (*Azospirillum lipoferum*, *A. amazonense* e *Burkholderia* sp.), e de um fungo micorrízico arbuscular (FMA) (*Glomus clarum*) em cinco genótipos de milho (híbridos C333B, AS3466, PREMIUM e as linhagens lg40897-1 e lg40505-1). Os autores mostraram que as plantas sem FMA e inoculadas com *Azospirillum* apresentaram os maiores teores de N. As linhagens lg40897-1 e lg40505-1 apresentaram maior concentração de P em relação aos híbridos, principalmente quando micorrizadas. Os maiores níveis de colonização micorrízica (90%) ocorreram nos genótipos C333B e lg40897-1 que, por sua vez, apresentaram maior diâmetro de raízes. O FMA aumentou a biomassa da parte aérea e das raízes, comprimento total e específico, superfície total e incidência de pêlos nas raízes em todos os genótipos. O FMA também estimulou a colonização das raízes pelas bactérias diazotróficas. Já as bactérias não alteraram as características morfológicas das raízes e nem a colonização micorrízica (MIYAUCHI et al., 2008).

Tabela 20. Efeito das doses de P e inoculação com *G. clarum* na colonização micorrízica (%) das raízes de feijoeiro dos genótipos BAF115 e BAF55 na época de colheita aos 48 dias após o plantio.

Dose de P (mg kg ⁻¹)	Genótipo BAF115		Genótipo BAF55	
	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos
0	5,78 c	6,41 b	5,61 d	3,90 b
100	9,23 bc	9,32 a	9,22 bc	9,21 a
200	13,44 ab	10,17 a	7,99 c	10,20 a
400	13,99 a	11,32 a	10,08 b	8,24 a
600	12,15 ab	10,28 a	14,45 a	10,28 a
Médias	10,92	9,50	9,47	8,37

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Foi realizada a análise de regressão para o fator dose de P, em cada genótipo e condição de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos do solo para as variáveis de percentagem de colonização micorrízica e massa seca da parte aérea das plantas de feijoeiro. A regressão das doses de P para a colonização micorrízica no genótipo BAF115 na condição de inoculação com *G. clarum* foi significativa para o modelo quadrático com $R^2 = 0,6427$ e a equação $Y = 5,78 + 0,014x + 0,0003x^2$. A regressão das doses de P para a colonização micorrízica no genótipo BAF115 na condição de FMAs nativos foi significativa para o modelo linear com $R^2 = 0,5973$ e a equação $Y = 6,41 + 0,048x$. A regressão das doses de P para a massa seca da parte aérea no genótipo BAF115 na condição de inoculação com *G.*

clarum foi significativa para o modelo quadrático com $R^2=0,9656$ e a equação $Y = 1,09 + 0,0399x + 0,000025x^2$. A regressão das doses de P para a massa seca da parte aérea no genótipo BAF115 na condição de FMAs nativos foi significativa para o modelo quadrático com $R^2=0,7948$ e a equação $Y = 0,78 + 0,0934x + 0,000075x^2$ (Figura 12 e 13).

A regressão das doses de P para a colonização micorrízica no genótipo BAF55 na condição de inoculação com *G. clarum* foi significativa para o modelo linear com $R^2=0,8755$ e a equação $Y = 5,6 + 0,088x$. A regressão das doses de P para a colonização micorrízica no genótipo BAF55 na condição de FMAs nativos foi significativa para o modelo linear com $R^2=0,8004$ e a equação $Y = 3,9 + 0,084x$. A regressão das doses de P para a massa seca da parte aérea no genótipo BAF55 na condição de inoculação com *G. clarum* foi significativa para o modelo linear com $R^2=0,7836$ e a equação $Y = 0,63 + 0,083x$. A regressão das doses de P para a massa seca da parte aérea no genótipo BAF55 na condição de FMAs nativos foi significativa para o modelo quadrático com $R^2=0,8545$ e a equação $Y = 1,71 + 0,017x + 0,00012x^2$ (Figura 14 e 15).

O sucesso da inoculação com FMAs depende de diversos fatores como a condição de fertilidade e propriedades do solo e as espécies e cepas de FMAs que compõem o inóculo (HERRERA-PERAZA et al., 2011). Muitos estudos demonstram efeito positivo da micorrização, foi mostrado em um estudo com solos esterilizados, com ausência da competição com os FMAs nativos e em solos com baixa disponibilidade de P e sem fertilização (CHALK et al., 2006). A condição de esterilidade do solo não representa o ambiente real do campo, o que pode influenciar a resposta dos FMAs contidos nos inoculantes quando utilizados em condições de solo com populações nativas de FMAs.

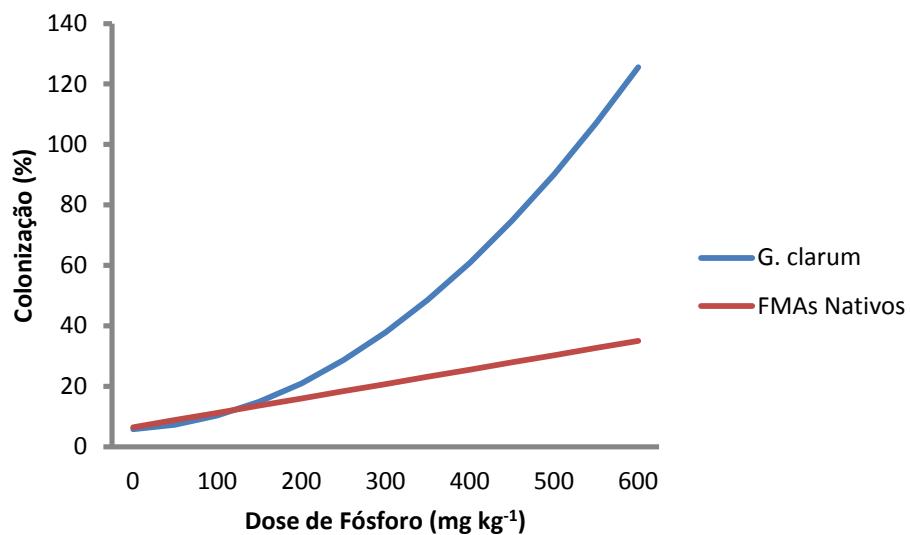


Figura 12. Efeito das doses de P e da inoculação com *G. clarum* e FMs nativos na percentagem de colonização micorrízica no genótipo comercial BAF115 na época de colheita aos 48 dias após o plantio.

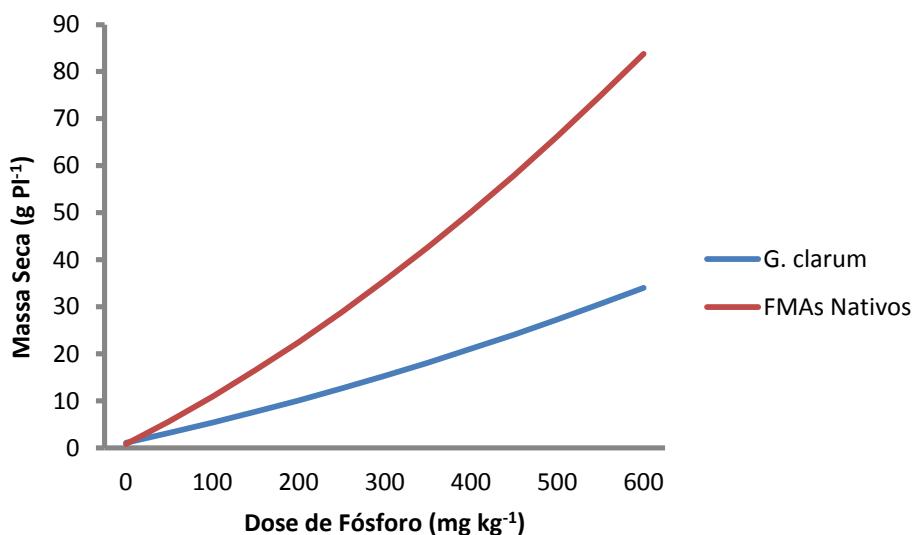


Figura 13. Efeito das doses de P e da inoculação com *G. clarum* e FMs nativos na massa seca (g) da parte aérea do genótipo comercial BAF115 na época de colheita aos 48 dias após o plantio.

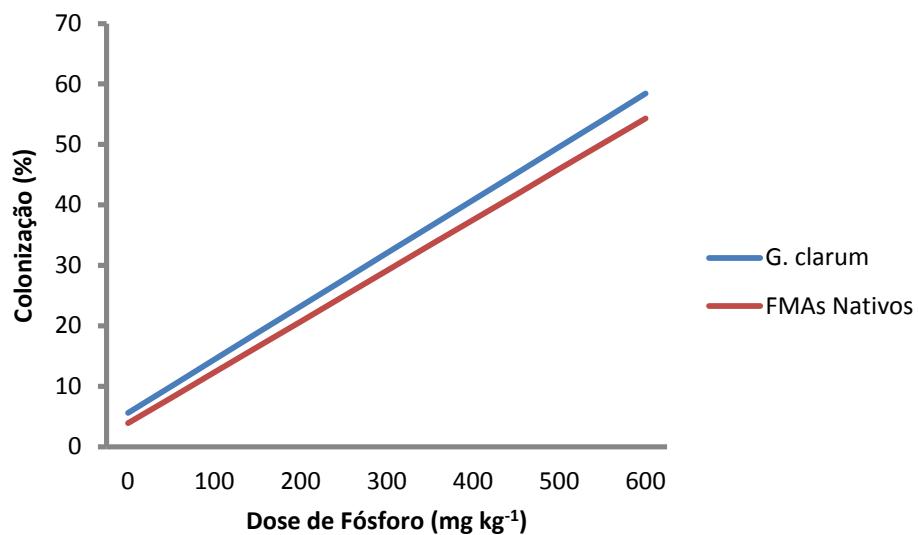


Figura 14. Efeito das doses de P e da inoculação com *G. clarum* e FMs nativos na percentagem de colonização micorrízica do genótipo crioulo BAF55 na época de colheita aos 48 dias após o plantio.

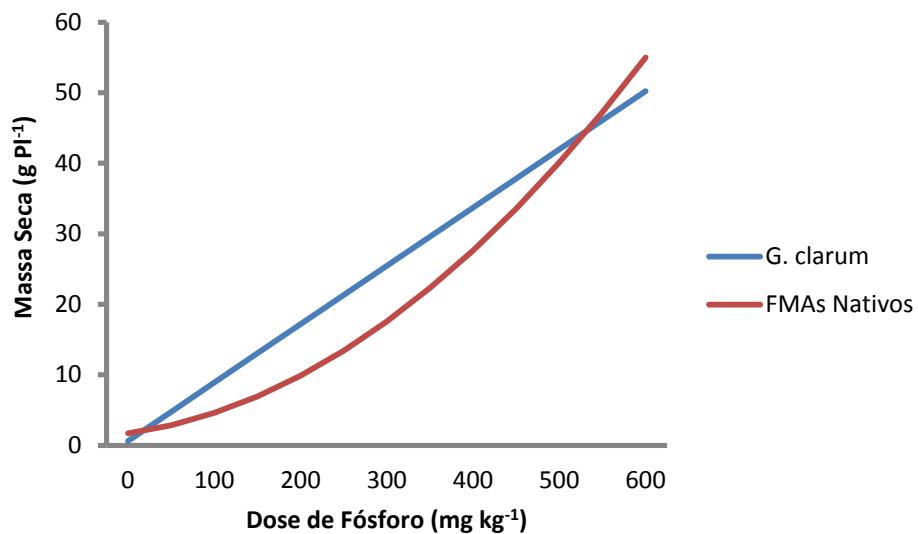


Figura 15. Efeito das doses de P e da inoculação com *G. clarum* e FMs nativos no massa seca (g) da parte aérea do genótipo comercial BAF55 na época de colheita aos 48 dias após o plantio.

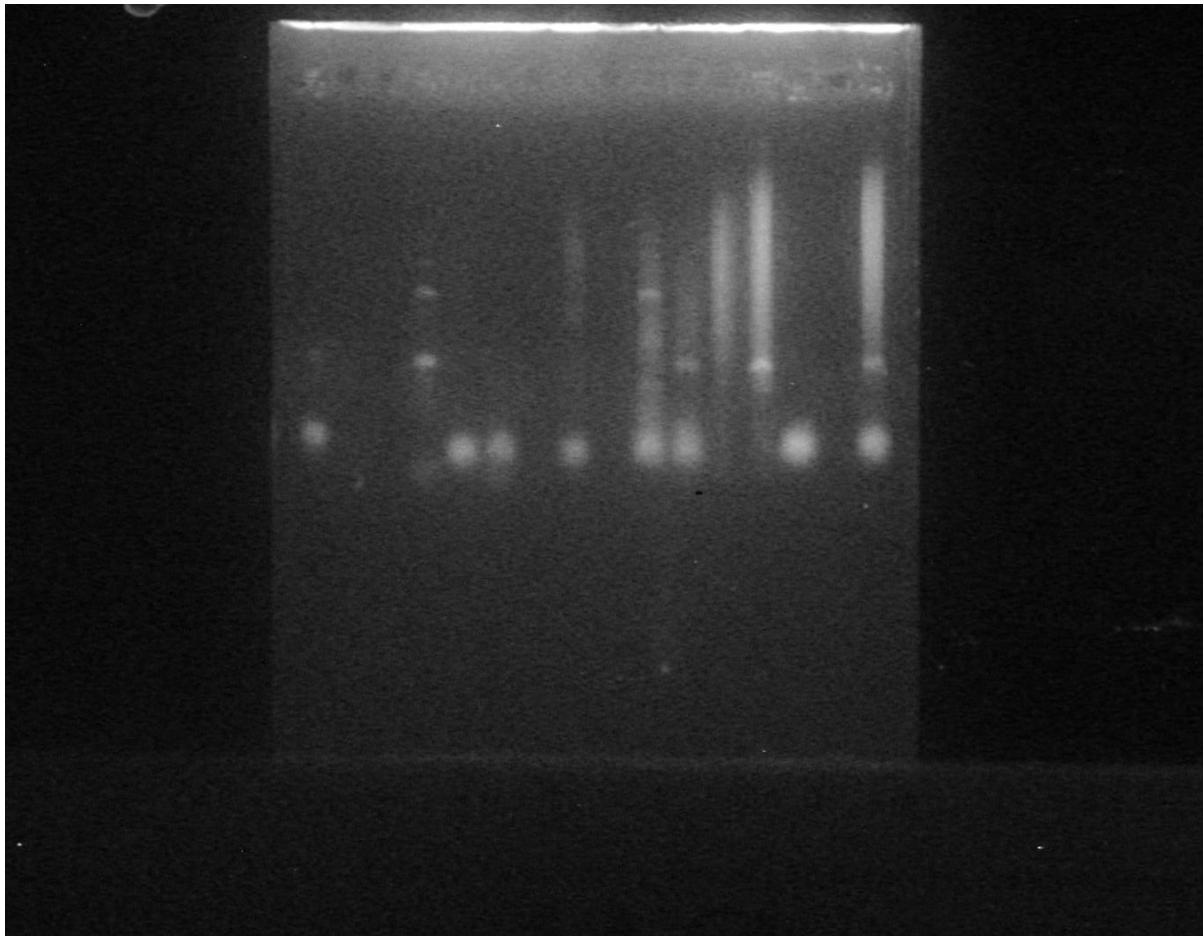


Figura 16. Foto de Gel de agarose demonstrando a integridade do cDNA obtido pela RT-PCR.

Com a análise da expressão genética, realizada para os genes PVPT e PVPAP3, foi possível observar que existem diferenças quanto aos genótipos analisados, doses de P aplicadas e a inoculação com *G. clarum*. Para o gene PVPAP3 a resposta obtida foi muito baixa para ser possível realizar comparações entre os fatores testados, porém o gene PVPT obteve uma resposta significativa quanto aos tratamentos aplicados.

Foi possível observar na expressão gênica do gene PVPT que existem diferenças entre os genótipos quanto à resposta as condições de inoculação com *G. clarum* e doses de P. O genótipo crioulo BAF55 respondeu tanto com a inoculação com *G. clarum* quanto sem a inoculação com *G. clarum* e com a população de FMAs nativos do solo. O genótipo comercial BAF115 (Valente) respondeu somente no tratamento sem inoculação com *G. clarum*, ou seja, com FMAs nativos do solo. Em ambos os genótipos foi possível observar a resposta da expressão genética somente na dose de 100 mg de P kg⁻¹, ou seja independente do genótipo testado a expressão do gene se dá na dose de 100 mg de P kg⁻¹, sendo que esta resposta está associada aos FMAs nativos do solo e não inoculação com *G. clarum*.

O genótipo crioulo BAF55 possui uma base genética mais ampla do que quando é comparado com o genótipo comercial BAF115, desta forma o genótipo crioulo apresenta uma maior resposta quando inoculado com *G. clarum*. No genótipo crioulo BAF55 o aumento da dose de P na condição de FMAs nativos do solo promoveu um decréscimo na expressão gênica. Na dose de 0 mg de P kg⁻¹ não foi observada resposta a nível de expressão gênica, o que sugere que a presença isolada do fungo micorrízico não é capaz de proporcionar resposta na planta, ou seja, a planta precisa além da condição biológica (FMA) de condições ambientais (dose de P) para ter resposta na expressão genética (Tabela 21 e 22).

O genótipo comercial BAF115 (Valente) apresenta uma base genética mais restrita que o genótipo crioulo, devido aos processos de seleção e melhoramento vegetal. O genótipo comercial respondeu em nível de expressão gênica a condição de FMAs nativos do solo sendo que esta resposta foi duas vezes maior que para o genótipo crioulo (Tabela 21 e 22). O genótipo comercial não respondeu na condição de inoculação com *G. clarum*. O genótipo comercial apresentou uma tendência de resposta em nível de expressão gênica na dose de 400 mg de P kg⁻¹ na condição de FMAs nativos onde existe uma maior diversidade, sendo que esta resposta foi menos expressiva no genótipo crioulo. Foi observado relação entre a maior resposta da expressão gênica e o conteúdo de P total da parte aérea. É possível observar que a maior expressão na dose 100 mg de P kg⁻¹ está associada ao incremento do conteúdo de P total da parte aérea que ocorre da dose 0 para a dose 100 mg de P kg⁻¹, o mesmo ocorrendo em relação ao teor de P (Tabela 21 e 22).

A interação entre simbiontes proporciona alterações na expressão gênica das plantas e bactérias. Na simbiose entre leguminosas e rizóbio os flavonóides exsudados ativam o funcionamento dos genes *nod* e *nol*, presentes no cromossomo das espécies de *Bradyrhizobium* e *Azorrhizobium* ou contidos nos plasmídeos simbóticos das espécies de *Rhizobium*. Os flavonóides são indutores potentes e a presença de diversos indutores em concentrações sub-ótimas pode resultar numa resposta sinergética da expressão gênica (NEVES, 1998).

A simbiose com fungos micorrízicos está relacionada à ativação de genes específicos da planta, resultados demonstram que dois grupos de genes estão envolvidos na simbiose que são os genes relacionados à resposta a stress e defesa (LIU et al., 2003). Estudos com a cultura da soja demonstraram que a disponibilidade de P está relacionada à regulação de vários genes. As identificações destes genes são fundamentais para compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no uso eficiente do P (GUO et al., 2008). Em estudos sobre a sinalização entre o P do solo e as raízes de plantas de feijoeiro, os resultados sugerem que

existem duas vias de regulagem e sinalização, uma sinalização sistêmica a longa distância e uma sinalização local do P com a raiz (LIU et al., 2010).

Hoffmann & Cardoso (2001) em estudo com o ativador de defesa vegetal BTH e inoculação com *Glomus intraradices* e *Bradyrhizobium elkanii*, observaram que a colonização micorrízica não foi afetada pelo ativador de defesa BTH, porém a colonização por *B. elkanii* foi reduzida. Os mesmos genes e enzimas podem ser ativados como parte da reação das plantas à colonização por microssimbiontes mutualistas (HOFFMANN & CARDOSO, 2001). O efeito da inoculação micorrízica e de crescentes níveis de P no solo sobre a expressão de proteínas e a atividade da peroxidase foi avaliado em raízes de maracujazeiro-amarelo. Os dados demonstram a influência do nível de P no solo sobre a expressão protéica radicular, sugerindo a influência desse elemento na expressão gênica radicular, bem como nos mecanismos de controle/reconhecimento simbótico (SANTOS et al., 2001).

Em estudo sobre a diversidade de genótipos de feijoeiro no estado de Santa Catarina foi observado uma diversidade de 73 genótipos representativos, demonstrando uma alta diversidade a ser explorada pelos programas de melhoramento (PEREIRA et al., 2009). Os recursos genéticos devem ser devidamente caracterizados para permitir ganhos genéticos mais promissores no melhoramento e para o uso destes recursos pelo próprio agricultor. Em estudo sobre a diversidade genética em acessos de feijoeiro foi observado níveis de produtividade acima de 3.000 kg ha⁻¹, esses genótipos devem ser mais bem caracterizados para serem incorporados nos programas de melhoramento da cultura e/ou indicado para os agricultores (COELHO et al., 2007).

O entendimento genético do controle dos mecanismos relacionados ao uso eficiente do P e simbiose com FMAs é importante para direcionar os programas de melhoramento vegetal que buscam genótipos, mais eficientes na absorção de nutrientes, produtivos e que tenham boas relações com os micro-organismos. Em estudo avaliando o teor de fitato em grãos e a absorção e distribuição de P em genótipos de feijoeiro observou-se variabilidade genética quanto ao teor de fitato nos grãos (COELHO et al., 2002). Resultado de estudos com a cultura do feijoeiro tem demonstrado que a síntese de fitato tem pontos de regulação com as enzimas MIPS (myo-inositol-3-phosphate synthase), e que a variabilidade genética da MIPS e a expressão gênica podem estar associadas à concentração de fitato durante o desenvolvimento das sementes, o que deve ser estudado no futuro (COELHO et al., 2007).

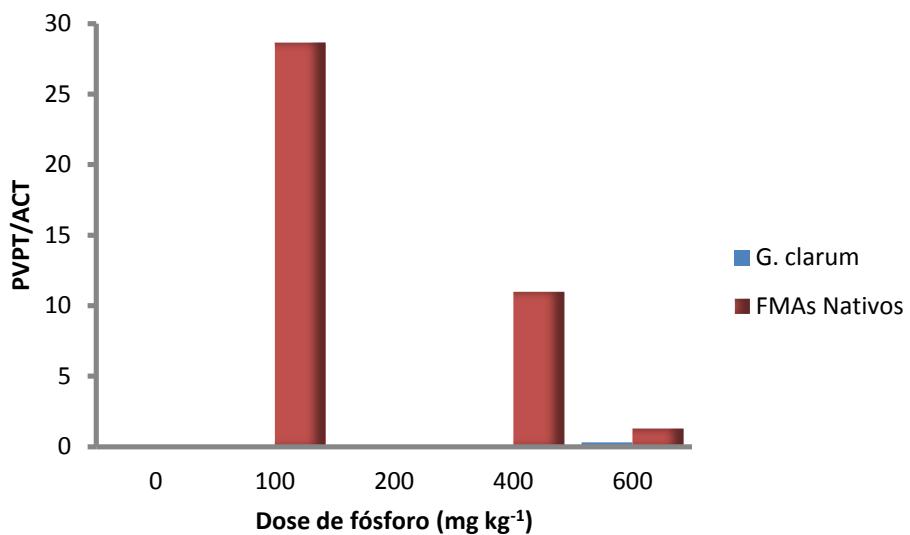


Figura 16. Relação entre PVPT/ACT e doses de P no genótipo comercial BAF115 nas condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos.

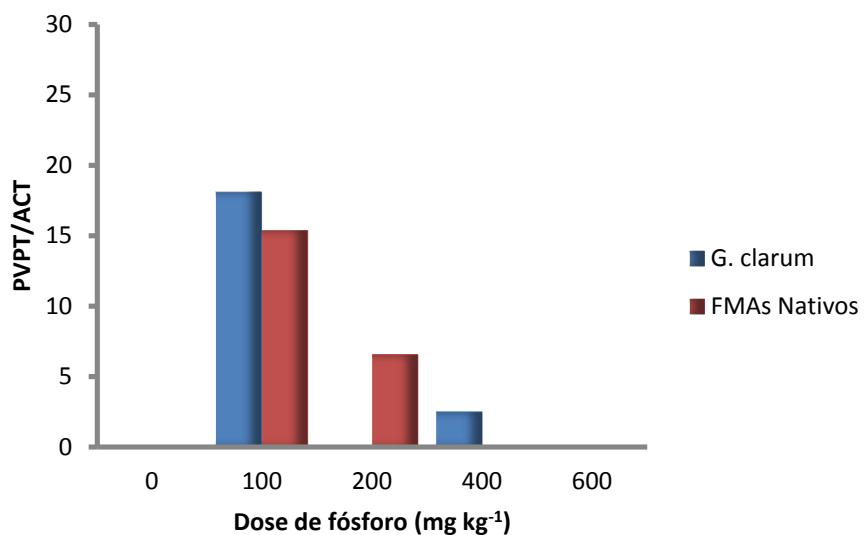


Figura 17. Relação entre PVPT/ACT e doses de P no genótipo comercial BAF55 nas condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos.

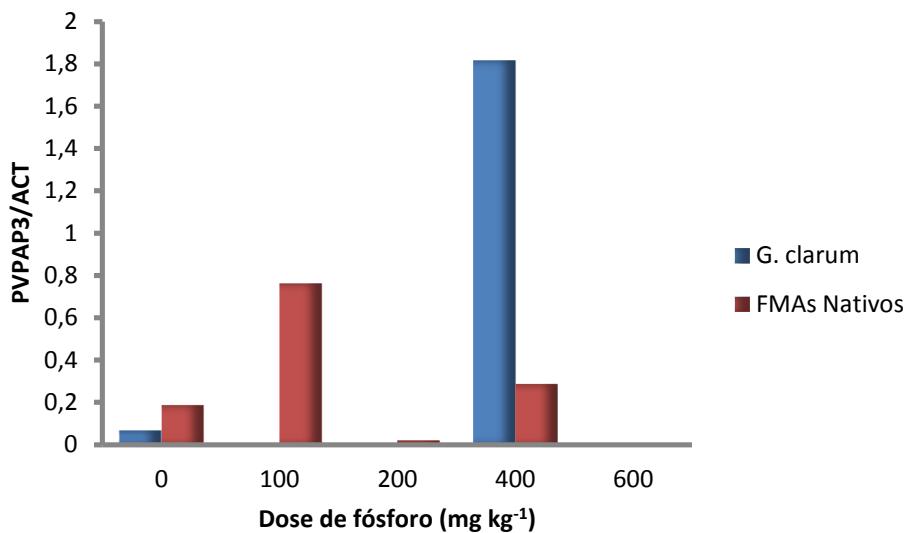


Figura 18. Relação entre PVPAP3/ACT e doses de P no genótipo comercial BAF115 nas condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos.

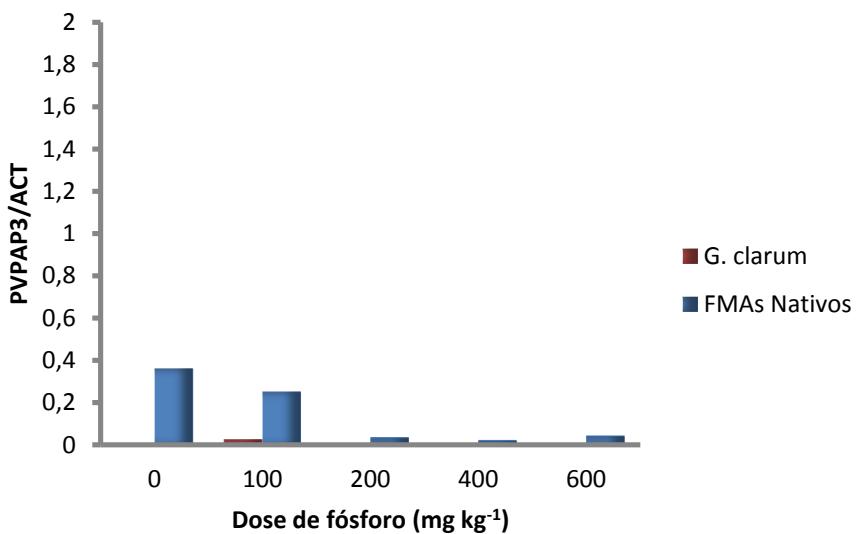


Figura 19. Relação entre PVPAP3/ACT e doses de P no genótipo comercial BAF55 nas condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos.

Tabela 21. Valores da expressão gênica do gene PVPT e PVPAP3 em relação à Actina (ACT), para os fatores Dose de P e inoculação com *G. clarum* para o genótipo comercial BAF115 (Valente).

Dose de P (mg kg ⁻¹)	PVPT/ACT		PVPAP3/ACT	
	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos
0	0,01	0,00	0,07	0,19
100	0,00	28,62	0,00	0,76
200	0,01	0,00	0,00	0,02
400	0,00	10,97	1,82	0,29
600	0,30	1,29	0,00	0,00

Tabela 22. Valores da expressão gênica do gene PVPT e PVPAP3 em relação à Actina (ACT), para os fatores Dose de P e inoculação com *G. clarum* para o genótipo crioulo BAF55.

Dose de P (mg kg ⁻¹)	PVPT/ACT		PVPAP3/ACT	
	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos	<i>G. clarum</i>	FMAs Nativos
0	0,00	0,00	0,00	0,36
100	18,08	15,37	0,03	0,25
200	0,03	6,60	0,01	0,04
400	2,52	0,00	0,01	0,02
600	0,00	0,10	0,00	0,04

6.4. CONCLUSÃO

A dose de P proporcionou efeito na massa seca da parte aérea, nas duas épocas de coleta o valor máximo de massa seca foi observado com a dose de 400 mg de P kg⁻¹.

O efeito do genótipo foi observado no teor de P e P acumulado na primeira época de coleta, sendo que o genótipo crioulo BAF55 foi superior ao genótipo comercial BAF115.

Na segunda época de amostragem a condição de FMAs nativos proporcionou incremento no teor de P da parte aérea das plantas de feijoeiro em relação à inoculação com *G. clarum*. O conteúdo de P foi significativamente maior nos tratamentos com FMAs nativos, quando comparado com os tratamentos inoculados com *G. clarum* no genótipo comercial BAF115 (Valente).

As doses de P proporcionaram efeito na colonização micorrízica nas duas épocas de coleta. Na primeira época de coleta, no genótipo comercial BAF115 com inoculação de *G. clarum* e dose de 100 mg P.kg⁻¹ houve elevação de 123% na colonização micorrízica em

comparação com o tratamento sem aplicação de P, na condição de FMAs nativos o comportamento foi similar. No genótipo crioulo BAF55 nas condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos foi possível observar que o tratamento sem aplicação de P apresentou os menores valores.

A interação entre genótipos, doses de P e inoculação com *G. clarum* proporcionou efeito na colonização micorrízica do feijoeiro. Na segunda época de amostragem, no genótipo BAF55 a inoculação com *G. clarum* aumentou a colonização em relação à condição de FMAs nativos. No tratamento inoculado com *G. clarum* a maior colonização foi observada no tratamento com a dose de 600 mg de P kg⁻¹.

A análise da expressão genética demonstrou que existe efeito dos genótipos analisados, doses de P e inoculação com *G. clarum* no gene PVPT. Foi observado na expressão gênica do gene PVPT que o genótipo crioulo BAF55 respondeu tanto com a inoculação com *G. clarum* quanto com a população de FMAs nativas, enquanto que o genótipo comercial BAF115 (Valente) respondeu somente no tratamento com FMAs nativos do solo. Em ambos os genótipos foi possível observar a resposta da expressão genética ocorreu na dose de 100 mg de P kg⁻¹, sendo que esta resposta está associada aos FMAs nativos do solo e não inoculação com *G. clarum*.

6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFOKPON, A.; COYNE, D.L.; LAWOUIN, L.; TOSSOU, C.; AGBÈDÈ, D.R. & COOSEMANS, J.; Effectiveness of native West African arbuscular mycorrhizal fungi in protecting vegetable crops against root-knot nematodes. **Biol Fertil Soils**, n.47, 2011.
- BERBARA, R.L.L.; SOUZA, F.A. & FONSECA, H.M.A.C.; III - Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito além da nutrição. **Nutrição Mineral de Plantas**, 432p. (ed. FERNANDES, M.S.). SBCS, Viçosa, 2006.
- BURLEIGH SH, HARRISON MJ. A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. **Plant Mol. Biol.** 34:199–208, 1997.
- CHALK, P.M.; SOUZA, R.F.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R. & BODDEY, R.M.; The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance. **Soil Biology & Biochemistry**, n.38, 2006.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N.; Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**. 162(1):156-9. 1987.

COELHO, C.M.M.; BELLATO, C.M.; GARCIA, A.K.M.; VITORELLO, V.A. & AZEVEDO, R.A.; Variation in Phytate Accumulation in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Fruit Explants. **Braz. arch. biol. technol.** v.51 n.1: pp.163-173, Jan./Feb. 2008.

COELHO, C.M.M.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.; VITORELLO, V.A. & AZEVEDO, R.A.; Variation in the enzyme activity and gene expression of myo-inositol-3-phosphate synthase and phytate accumulation during seed development in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta Physiol Plant**, 29:265–271, 2007a.

COELHO, C.M.M.; COIMBRA, J.L.M.; SOUZA, C.A.; BOGO, A. & GUIDOLIN, A.F.; Diversidade genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p.1241-1247, set-out, 2007b.

COELHO, C.M.M.; SANTOS, J.C.P.; TSAI, S.M. & VITORELLO, V.A.; Seed phytate content and phosphorus uptake and distribution in dry bean genotypes. **Braz. J. Plant Physiol.** 14(1):51-58, 2002.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004.

COSTA, H.S.; RIOS-RUIZ, W.F.; LAMBAIS, M.R.; Salicylic acid inhibits arbuscular mycorrhizae formation and changes chitinase and b-1,3-glucanase expression in bean roots. **Sci. agric.**, Piracicaba, v.57, n.1, 2000.

DEVAIAH, B.N.; KARTHIKEYAN, A.S.; RAGHOTHAMA, K.G.; WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, 143: 1789–1801, 2007a.

DEVAIAH, B.N.; NAGARAJAN, V.K.; RAGHOTHAMA, K.G.; Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. **Plant Physiol**, 145: 147–159, 2007b.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J.; LAMB, C.J.; Early events in the activation of plant defense responses. **Annu. Rev. Phytopathol.** 32:479–501, 1994.

FAN, M.; ZHU, J.; RICHARDS, C.; BROWN, K.M. & LYNCH, J.P.; Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. **Funct Plant Biol**, 30: 493–506. 2003.

GUO, W.; ZHANG, L.; ZHAO, J.; LIAO, H.; ZHUANG, C. & YAN, X.; Identification of temporally and spatially phosphate-starvation responsive genes in *Glycine max*. **Plant Science**, N.175, 574–584, 2008.

HARRISON, M.J.; Molecular and Cellular Aspects of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 50:361–89. 1999.

HERNANDEZ, G.; RAMIREZ, M.; VALDES-LOPEZ, O.; TESFAYE, M.; GRAHAM, M.A.; CZECHOWSKI, T.; SCHLERETH, A.; WANDREY, M.; ERBAN, A. & CHEUNG, F.; Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. **Plant Physiol**, 144: 752–767. 2007.

HERRERA-PERAZA, R.A.; HAMEL, C.; FERNÁNDEZ, F.; FERRER, R.L. & FURRAZOLA, E.; Soil-strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants?. **Mycorrhiza**, 21:183–193, 2011.

HOFFMANN, L.V. & CARDOSO, E.J.B.N.; Inibição da colonização por *bradyrhizobium elkanii* mas não por *glomus intraradices* em soja pelo ativador de defesa vegetal bth1. **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.795-799, out./dez. 2001.

KAIDA, R.; SAGE-ONO, K.; KAMADA, H.; OKUYAMA, H.; SYONO, K. & KANEKO, T.S.; Isolation and characterization of four cell wall purple acid phosphatase genes from tobacco cells. **Biochim Biophys Acta** 1625:134–140, 2003.

KOSKE, R.E. & GEMMA, J.N.; A modified procedure for staining roots to detect V-A mycorrhizas. **Mycological Research**, 92: 486-488, 1989.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.s533-s540, 1995.

LAMBAIS, M.R.; RÍOS-RUIZ, W.F. & ANDRADE, R.M.; Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, 160:421–428, 2003.

LAMBAIS., M.R.; Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. **Avanços em fundamentos e aplicações de micorrizas**. UFLA, Lavras, 1996.

LANA, R.M.Q.; ZANÃO JÚNIOR, L.A.; CORREIA, N.M. & LANA, A.M.Q.; Variability between genotypes of common bean for the efficiency of using phosphorus. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, 2006.

LIANG, C.; TIAN, J.; LAM, H.M.; LIM, B.L.; YAN, X. & LIAO, H.; Biochemical and Molecular Characterization of PvPAP3, a Novel Purple Acid Phosphatase Isolated from Common Bean Enhancing Extracellular ATP Utilization. **Plant Physiology**, Vol. 152, pp. 854–865, February, 2010.

LIAO, H.; WONGA, F.L.; PHANG, T.H.; CHEUNG, M.Y.; LI, W.Y.F.; SHAO, G.H.; YAN, X.; LAM, H.M.; GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. **Gene**, 318: 103–111, 2003.

LIAO, H.; YAN, X.; RUBIO, G.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M.W.; LYNCH, J.P.; Genetic mapping of basal root gravitropism and phosphorus acquisition efficiency in common bean. **Funct Plant Biol**, 31: 959–970, 2004.

LIU, H.; TRIEU, A.T.; BLAYLOCK, L.A.; HARRISON, M.J.; Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 11:14–22, 1998.

LIU, J.; BLAYLOCK, L.A.; ENDRE, G.; CHO, J.; TOWN, C.D.; VANDENBOSCH, K.A. & HARRISON, M.J.; Transcript Profiling Coupled with Spatial Expression Analyses Reveals Genes Involved in Distinct Developmental Stages of an Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. **The Plant Cell**, Vol. 15, 2106–2123, 2003.

LIU, J.Q.; ALLAN, D.L. & VANCE, C.P.; Systemic Signaling and Local Sensing of Phosphate in Common Bean: Cross-Talk between Photosynthate and MicroRNA399. **Molecular Plant**, Vol.3, N.2, Pg.428–437. 2010.

McGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L.; SWAN, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **The New Phytologist**, 115 (3):495-501, 1990.

MIYAUCHI, M.Y.H.; LIMA, D.S.; NOGUEIRA, M.A.; LOVATO, G.M.; MURATE, L.S.; CRUZ, M.F.; FERREIRA, J.M.; ZANGARO, W. & ANDRADE, G.; Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v.65, n.5, p.525-531. 2008.

MORTIMER, P.E.; PEREZ-FERNANDEZ, M.A. & VALENTINE, A.J.; The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biology & Biochemistry**, n.40, 1019–1027. 2008.

NEVES, M.C.P.; Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. **Ecologia microbiana**. Embrapa. Jaguariúna, 1998.

PEREIRA, T.; COELHO, C.M.M.; BOGO, A.; GUIDOLIN, A.F. & MIQUELLUTI, D.V.; Diversity in common bean landraces from south Brazil. **Acta Bot.Croat.** 68 (1), 79–92, 2009.

RAGHOTHAMA, K.G.; Phosphate acquisition. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 50: 665–693. 1999.

RAMIREZ, M.; GRAHAM, M.A.; BLANCO-LOPEZ, L.; SILVENTE, S.; MEDRANO-SOTO, A.; BLAIR, M.W.; HERNANDEZ, G.; VANCE, C.P. & LARA, M.; Sequencing and analysis of common bean ESTs: building a foundation for functional genomics. **Plant Physiol**, 137: 1211–1227, 2005.

REDECKER, D.; MORTON, J.B. & BRUNS, T.D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). **Molec. Phylog. Evol.**, 14:276-284, 2000.

SANTOS, B.A.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.M.T.; CORREIA, M.T.S. & COELHO, L.C.B.B.; Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and soil phosphorus level on expression of protein and activity of peroxidase on passion fruit roots. **Bras. J. Biol.**, 61(4): 693-700, 2001.

SAS Institute. **SAS certification prep guide: base programming**. Cary, NC, 2004.

SILVEIRA, A.P.D. & CARDOSO, E.J.B.N.; Arbuscular mycorrhiza and kinetic parameters of phosphorus absorption by bean plants. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v.61, n.2, p.203-209, Mar./Apr. 2004.

TEDESCO, M. J.; VOLKWEISS, S. J.; BOHNEN, H.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A. Análises de solos, plantas e outros materiais. 2^a Ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 215p. **Boletim Técnico de Solos**, 5. 1995.

TIAN, J.; VENKATACHALAM, P.; LIAO, H.; YAN, X. & RAGHOTHAMA, K.; Molecular cloning and characterization of phosphorus starvation responsive genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Planta**, 227:151–165. 2007.

VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C. & ALLAN, D.L.; Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytol**, 157: 423–447. 2003.

WANG, X.; WANG, Y.; TIAN, J.; LIM, B.L.; YAN, X. & LIAO, H.; Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean. **Plant Physiol**, 151: 233–240. 2009.

WANG, X.; PAN, Q.; CHEN, F.; YAN, X. & LIAO, H.; Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. **Mycorrhiza**, n.21:173–181. 2011.

ZHOU, J.; JIAO, F.C.; WU, Z.C.; LI, Y.Y.; WANG, X.M.; HE, X.W.; ZHONG, W.Q.; WU, P.; OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. **Plant Physiol**, 146: 1673–1686, 2008.

7. CAPÍTULO 5 - Efeito da coinoculação de rizobactérias, rizóbio e *Glomus clarum* no crescimento e nutrição nitrogenada e fosfatada do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L).

RESUMO: A formação das micorrizas estimula a presença de rizobactéria no córtex radicular assim como a formação de nódulos por rizóbios. Os efeitos da dupla interação rizóbio e micorrizas são bastante conhecidos, aumentando a área foliar, e a atividade da nitrogenase, melhorando a eficiência da fixação biológica do N₂, pouco se conhece, entretanto sobre os efeitos da interação tripla rizóbios-micorrizas-rizobactérias. O objetivo deste estudo foi de avaliar o efeito da coinoculação de rizobactérias, *Glomus clarum* e *Rhizobium*. O experimento foi conduzido em vasos contendo solo em casa de vegetação, utilizando a inoculação simples e a coinoculação destes três tipos de microrganismos. Foram analisados o a nodulação por rizóbios e a nutrição fosfatada e nitrogenada de genótipo comercial e crioulo de feijoeiro. Foi observado efeito positivo da coinoculação de rizobactérias e *G. clarum* na massa seca da parte aérea, no P e N acumulado da parte aérea em plantas de feijoeiro. O melhor tratamento observado foi a coinoculação de *G. clarum* e a estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis*, que obteve os maiores valores de massa seca da parte aérea, do P e N acumulado e na massa seca dos nódulos. A estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis* apresentou melhor desempenho que a estirpe Ai27 nos parâmetros analisados neste ensaio.

PALAVRAS-CHAVE: *Glomus clarum*, Rizobactérias, Coinoculação e *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT: The formation of mycorrhizae stimulates the presence of rhizobacteria in root cortex and the formation of nodules by rhizobia. The dual effects of rhizobium and mycorrhizal interactions are well known, increasing the leaf area, and nitrogenase activity, improving the efficiency of N₂ fixation, little is known, however, about the effects of triple interaction rhizobia-mycorrhiza-rhizobacteria. The objective of this study was to evaluate the effect of co-inoculation rhizobacteria, *Rhizobium* and *Glomus clarum*. The experiment was conducted in pots containing soil in a greenhouse, using the simple and the inoculating co-inoculation these three types of microorganisms. Were analyzed by the rhizobial nodulation and nitrogen and phosphorus nutrition of genotype bean trade. We observed positive effect of rhizobacteria co-inoculation and *G. clarum* dry mass of shoots, P and N uptake of shoots in

bean plants. The best treatment was observed co-inoculation *G. clarum* and strain Fe55 of *Pseudomonas moraviensis*, which obtained the highest values of dry mass of shoots, the P and N uptake and dry weight of nodules. A strain Fe55 of *Pseudomonas moraviensis* performed better than strain Ai27 the parameters analyzed in this trial.

KEYWORDS: *Glomus clarum*, Rhizobacteria, Co-inoculation, *Phaseolus vulgaris*.

7.1. INTRODUÇÃO

A transmissão de bactérias diazotróficas para plantas pode estar relacionada à presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMA). A bactéria está presente em esporos de fungos micorrízicos, mas ainda se desconhece sua função. No processo de penetração das hifas infectivas, pode ocorrer maior exsudação de nutrientes pela planta, o que acelera o crescimento de tais bactérias. Em contrapartida, as bactérias diazotróficas associadas a esporos de FMA podem promover o aumento e rápida colonização pelo fungo (SALA, 2007). Li & Strzelczyk (2000) isolaram *Azospirillum spp.* da superfície de diferentes espécies de FMA e sugerem que as bactérias diazotróficas podem contribuir para a nutrição dos FMA, ao tornar disponível o nitrogênio. Bactérias diazotróficas do gênero *Gluconacetobacter* têm sido encontradas em esporos de fungos micorrízicos arbusculares presentes no solo (MUTHUKUMARASAMY et al., 2002).

Miransari (2011) relata a importância da interação entre os FMA e as bactérias do solo e da elucidação dos mecanismos de controle e regulação. Estudos mostram que bactérias do solo podem injetar moléculas dentro de esporos de FMA e influenciar a expressão gênica dos FMA. Patten e Glick (1996) relataram que alguns organismos tais como *Gluconacetobacter spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Actinomyces spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Azospirillum spp.*, *Bacillus spp.*, *Burkholderia spp.*, *Curtobacterium spp.*, *Pantoea spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Xanthomonas spp.* podem promover o crescimento vegetal aumentando o comprimento das raízes e o número de pelos radiculares. Mehnaz & Lazarovits (2006) observaram efeitos positivos na massa seca de raízes e parte aérea em plantas de milho com a inoculação de *Pseudomonas putida*. Arzanesh et al., (2011) observou efeito positivo na produtividade e na capacidade em suportar estresse hídrico em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum lipoferum*.

A busca por biotecnologias na cultura do feijoeiro com objetivo de incrementar a eficiência do processo de FBN com rizóbios, proporcionar incremento na nutrição fosfatada das plantas e promoção de crescimento vegetal é uma necessidade para que no futuro a cultura

seja manejada sem o uso de fertilizantes nitrogenados e alcance níveis elevados de produtividade. O uso de microrganismos co-inoculados pode ser uma estratégia de sucesso para promover o aumento das relações simbióticas e efeitos sinérgicos na promoção de crescimento de feijoeiro.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da coinoculação de rizóbio, rizobactérias e de FMA (*G. clarum*) na nutrição e nodulação de genótipo comercial de feijoeiro.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foi conduzido no CAV/UDESC em Lages – SC, um ensaio em casa de vegetação, em delineamento completamente casualizados, com 5 repetições, para testar os seguintes tratamentos: 1) controle total, sem adubação nitrogenada e sem inoculação; 2) Inoculação com *Rhizobium* SEMIA 4088, inoculante comercial “LeguMax” para feijão; 3) Inoculação com *G. clarum*; 4) Coinoculação de *Rhizobium* SEMIA 4088 e *G. clarum*; 5) Coinoculação de *Rhizobium* SEMIA 4088, *G. clarum* e com estirpe Ai27; 6) Coinoculação de *Rhizobium* SEMIA 4088 e com estirpe Ai27; 7) Coinoculação de *G. clarum* e com a estirpe Ai27; 8) Coinoculação de *Rhizobium* SEMIA 4088, *G. clarum* e com a estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis*; 9) Coinoculação de *Rhizobium* com estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis*; 10) Coinoculação de *G. clarum* e a estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis*.

Foi utilizado o genótipo comercial de feijoeiro BAF 115 (Valente). A semeadura foi realizada em mistura de solo e areia (2:1; v/v), em vasos de 6 kg. O solo utilizado foi um Nitossolo, coletado no município de Capão Alto - SC, nas coordenadas 27°53'50,73"S e 50°25'44,04"O, com teor de argila de 77% e 3,7% de matéria orgânica, com pH natural de 4,7, teor de P de 0,9 mg dm⁻³, teor de K de 85 mg dm⁻³ e CTC efetiva de 4,7cmol_c dm⁻³. O solo foi peneirado e o seu pH foi corrigido para 5,8. Neste ensaio o solo não foi esterilizado, mantendo-se as populações nativas de FMAs, rizóbio e rizobactérias.

O inóculo de rizobactérias utilizado no ensaio foi produzido no Laboratório de Microbiologia e Fauna do Solo do CAV/ UDESC e aplicado no tratamento de semente. A concentração obtida do inóculo utilizado foi de 7×10^8 UFC/ml de cultura, sendo utilizado um volume 2 ml de meio, totalizando $1,4 \times 10^9$ UFC por semente. Para a inoculação com FMA foram utilizadas 5 gramas de solo-inóculo contendo esporos, hifas e raízes colonizadas por *Glomus clarum*. O solo-inóculo apresentava 20,6 esporos por grama, totalizando 103 esporos por vaso e foi distribuído no vaso com o auxílio de uma espátula no terço superior do vaso.

As doses de P e K aplicadas foram o dobro da recomendação da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2004), com objetivo de satisfazer a necessidade das plantas conduzidas em vasos. Foi realizado um desbaste uma semana após o plantio mantendo apenas uma planta por vaso até a amostragem.

A data de plantio foi 05/03/2011 e as plantas foram colhidas 35 dias após o plantio no inicio da floração. Foram coletadas a parte aérea das plantas para a determinação da massa seca, e o teores de N e P foram determinados segundo Tedesco et al. (1995). As raízes foram coletadas para avaliação da nodulação e a determinação do comprimento de raiz colonizada conforme McGonigle et al. (1990).

As características avaliadas foram submetidas à análise de variância considerando apenas os tratamentos de inoculação. As médias foram submetidas ao teste de Duncan a 5% de significância.

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância demonstrou que existiu variação na massa seca da parte aérea e no P e N acumulado na parte aérea do feijoeiro, nos tratamentos com inoculação e coinoculação testados (Tabela 22).

Tabela 23. Resultado da análise de variância para massa seca da parte aérea (g PI^{-1}), teor de P (%) e P acumulado (mg PI^{-1}), teor de N (%) e N acumulado (mg PI^{-1}) em função dos tratamentos aplicados.

Fator de Variação	Massa seca (g PI^{-1})	P (%)	P acumulado (mg)	N (%)	N acumulado (mg PI^{-1})
Tratamentos	*	ns	*	ns	*

** - Significativo a 5% pelo teste F. ns – Não significativo pelo teste F.

O maior valor de massa seca (2,47 g) foi observado com a coinoculação de *G. clarum* e estirpe Fe55 de rizobactéria (Tabela 24), com valor médio superior ao controle (sem inoculação), a inoculação simples com rizóbio, com *G. clarum* e coinoculação com *G. clarum* e estirpe Ai27. Estes resultados demonstram que existe uma interação benéfica e sinérgica entre FMAs e rizobactérias, e indicam que a especificidade da estirpe Fe55 (oriunda de plantas de feijoeiro e identificado como *Pseudomonas moraviensis*) é maior do que a estirpe Ai27 (oriunda de plantas de arroz), para cultura do feijoeiro.

Para o P e N acumulado o efeito dos tratamentos foi similar ao observado para a massa seca, os maiores valores foram observados no tratamento com a coinoculação de *G. clarum* e a estirpe Fe55, sendo este tratamento superior aos tratamentos controle (sem inoculação), inoculação com rizóbio e inoculação com *G. clarum*, o que reforça a existência de sinergismo entre os microrganismos. O tratamento com coinoculação de rizóbio, estirpe Fe55 e *G. clarum* apresentou valor de P acumulado inferior ao tratamento com a coinoculação de *G. clarum* e a estirpe Fe55, o que pode indicar uma possível interação negativa entre os microrganismos, visto que a coinoculação com rizóbio e estirpe Fe55 apresentou resultados superiores de P acumulado (Tabela 24).

Tabela 24. Produção de massa seca e P acumulados na parte aérea do genótipo comercial BAF115 de feijoeiro.

Tratamentos	Massa seca (g PI ⁻¹)	P acumulado (mg PI ⁻¹)	N acumulado (mg PI ⁻¹)
Controle/Testemunha	1,07 c	2,17 c	21,78 c
Inoculação com Rizóbio (SEMPIA 4088)	1,18 bc	2,44 c	24,05 bc
Inoculação com <i>G. clarum</i>	1,34 bc	3,23 bc	25,75 bc
Coinoculação com Rizóbio e <i>G. clarum</i>	2,03 abc	5,02 abc	33,92 abc
Coinoculação com Rizóbio, <i>G. clarum</i> e Estirpe Ai27	1,66 abc	5,18 abc	31,84 abc
Coinoculação com Rizóbio e Estirpe Ai27	2,09 ab	4,99 abc	39,91 abc
Coinoculação com <i>G. clarum</i> e Estirpe Ai27	1,46 bc	4,17 abc	28,73 abc
Coinoculação com Rizóbio, <i>G. clarum</i> e Estirpe Fe55	1,69 abc	3,50 bc	37,81 abc
Coinoculação com Rizóbio e Estirpe Fe55	2,02 abc	6,38 ab	41,59 ab
Coinoculação com <i>G. clarum</i> e Estirpe Fe55	2,47 a	7,08 a	46,03 a
Médias	1,71	4,42	33,14

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

A análise de variância para o comprimento de raiz, número de nódulos e massa seca dos nódulos apresentou efeito significativo dos tratamentos para todas as variáveis estudadas (Tabela 25).

Tabela 25. Resultados da análise de variância para comprimento de raiz (cm), Número de nódulos por planta e massa seca dos nódulos (mg).

Fator de Variação	Comprimento de raiz	Nº Nódulos por Planta	Massa seca dos nódulos
Tratamento	*	*	ns

* - Significativo a 5% pelo teste F. ns – Não significativo pelo teste F.

O valor médio observado para número de nódulos por planta foi de 41 (Tabela 26). Os menores valores de números de nódulos foram observados nos tratamentos testemunha e com inoculação isolada de *G. clarum*. A nodulação, por sua vez, foi maior naqueles tratamentos que apresentavam associação com as estirpes de rizobactérias. Nos tratamentos controle, inoculação com *G. clarum* e coinoculação com rizóbio e *G. clarum*, foram observados os menores valores de número de nódulos por planta. O maior valor foi observado no tratamento com coinoculação de rizóbio, estirpe Fe55 e *G. clarum* (60 nódulos por planta). O valor médio obtido para a massa seca dos nódulos foi de 10,7 mg PI⁻¹. O maior valor foi observado no tratamento com coinoculação de rizóbios, estirpe Fe55 e *G. clarum*. Foi possível observar o efeito benéfico da inoculação com as estirpes Ai27 e Fe55 no incremento da massa seca dos nódulos (Tabela 26), apenas o tratamento com coinoculação com rizóbio, *G. clarum* e a estirpe Ai27 apresentaram valor abaixo da média.

O comprimento de raiz variou com a inoculação, o menor valor observado com inoculação de *G. clarum* e a estirpe Ai27 e o maior valor foi observado quando se inoculou rizóbio e a estirpe Ai27.

Tabela 26. Número e massa seca (mg) de nódulos de rizóbio e comprimento de raiz (cm) de feijoeiro submetidos aos tratamentos de coinoculação de *G. clarum* e estirpes de rizobactérias.

Tratamentos	Nº Nódulos por Planta	Massa seca dos nódulos (mg PI ⁻¹)	Comprimento de raiz (cm)
Controle (Testemunha)	23 c	7,4 abc	449 ab
Inoculação com Rizóbio (SEMA 4088)	40 abc	6,0 bc	419 abc
Inoculação com <i>G. clarum</i>	22 c	8,6 abc	421 abc
Coinoculação com Rizóbio e <i>G. clarum</i>	29 bc	3,8 c	365 bc
Coinoculação com Rizóbio, <i>G. clarum</i> e Estirpe Ai27	34 abc	8,4 abc	452 ab
Coinoculação com Rizóbio e Estirpe Ai27	52 ab	12,4 abc	533 a
Coinoculação com <i>G. clarum</i> e Estirpe Ai27	55 ab	15,4 ab	284 c
Coinoculação com Rizóbio, <i>G. clarum</i> e Estirpe Fe55	60 a	15,4 ab	321 bc
Coinoculação com Rizóbio e Estirpe Fe55	52 ab	11,6 abc	375 bc
Coinoculação com <i>G. clarum</i> e Estirpe Fe55	39 abc	17,8 a	410 abc
Médias	41,0	10,7	403

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

O efeito da inoculação com a estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis* no incremento da nodulação e massa seca do feijoeiro observados neste ensaio são semelhantes

aos observados no estudo com coinoculação de *Rhizobium* e *Pseudomonas fluorescens* na cultura do feijoeiro conduzido por Yadegari et al. (2010), que observou que a coinoculação estimulou a nodulação, aumentou o peso seco das plantas, a fixação biológica de nitrogênio e a produção de grãos quando comparado aos tratamentos sem inoculação de *Pseudomonas fluorescens*, indicando que a inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal pode potencializar o processo de fixação biológica de nitrogênio realizado pela simbiose com *Rhizobium*.

Em estudo com o uso de inóculo de FMAs e rizóbio foi observado que as inoculações com FMAs ou com FMAs e rizóbio proporcionaram maior teor e conteúdo de P nas plantas de eucalipto e de sesbânia, cultivadas em consorciação, e maior eficiência de utilização de P pelas plantas de eucalipto (RODRIGUES et al., 2003). A concentração de P nos tecidos de soja foi maior em plantas micorrizadas, comparando com plantas não micorrizadas. A colonização radicular e o micélio externo total correlacionaram-se positivamente com a variável massa seca da parte aérea, P na parte aérea, P nas raízes e Fe nas raízes e negativamente com a disponibilidade de Mn, Mn na parte aérea e nas raízes e Fe na parte aérea (NOGUEIRA & CARDOSO, 2002).

Estudos mostram que certas linhagens de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas estimulam a nodulação de plantas leguminosas por *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Uma linhagem de *P. putida*, selecionada como agente de biocontrole, estimulou a nodulação por *Rhizobium* em feijoeiro (MELO et al., 1998). Não obstante estes avanços conseguidos, o aproveitamento das potencialidades da FBN no feijoeiro ainda é muito aquém do desejável. O que justifica o uso desta diversidade para estudos de interação com outros microorganismos, como *Azospirillum* e outras espécies de rizobactérias. Em plantas de feijoeiro a coinoculação de *Rhizobium tropici* e *Paenibacillus polymyxa* promoveu aumento na nodulação quando comparado com a inoculação isolada de *Rhizobium tropici* (FIGUEIREDO et al., 2008). Pelaez et al., (2010) não observaram efeito positivo da coinoculação com FMAs e rizóbios no desenvolvimento de plantas de feijoeiro. Larsen et al., (2009) observaram efeitos supressivos para os FMAs proporcionado por espécies de *Paenibacillus* quando co-inoculados em plantas de *Cucumis sativus*.

7.4. CONCLUSÃO

Existe efeito positivo da coinoculação de rizobactérias e *G. clarum* na massa seca da parte aérea, no P e N acumulado da parte aérea em plantas de feijoeiro. O melhor tratamento

observado foi a coinoculação de *G. clarum* e a estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis*, que obteve os maiores valores de massa seca da parte aérea, do P e N acumulado e na massa seca dos nódulos.

A estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis* apresentou melhor desempenho que a estirpe Ai27 nos parâmetros analisados neste ensaio.

7.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARZANESH, M.H.; ALIKHANI, H.A.; KHAVAZI, K.; RAHIMIAN, H.A. & MIRANSARI, M.; Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. **World J Microbiol Biotechnol**, 27:197–205, 2011.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004.

FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; MARTINEZ, C.R. & CHANWAY, C.P.; Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied soil ecology**, 40, 182 – 188, 2008.

LARSEN, J.; CORNEJO, P. & BAREA, J.M.; Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* and *P. macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*. **Soil Biology & Biochemistry**, N.41, 286–292, 2009.

LI, C.Y.; STRZELCZYK, E. Belowground microbial process underpin forest productivity. **Phyton**, v.40, p.129-134, 2000.

McGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L.; SWAN, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **The New Phytologist**, 115 (3):495-501, 1990.

MEHNAZ, S. & LAZAROVITS, G.; Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions. **Microbial Ecology**. Volume 51, 326–335. 2006.

MELO, I.S.; Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: Descrição e potencial de uso na agricultura. **Ecologia microbiana**. Embrapa. Jaguariúna, 1998.

MIRANSARI, M.; Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**, 89:917–930. 2011.

MUTHUKUMARASAMY, R., REVATHI, G., SESHADRI, S., LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, v. 83, n. 2, p. 137 – 145, 2002.

NOGUEIRA, M.A. & CARDOSO, E.J.B.N. Interações microbianas na disponibilidade e absorção de manganês por soja. **Pesq. agropec. bras.** vol.37 no.11 Brasília Nov. 2002.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.

PELAEZ, C.; OLIVARES, E.; CUENCA, G. & IZAGUIRRE-MAYORAL, M.L.; Manganese modulates the responses of nitrogen-supplied and Rhizobium-nodulated *Phaseolus vulgaris* L. to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology & Biochemistry** n.42, 1924-1933, 2010.

RODRIGUES, L. A.; MARTINS, M. A. & SALOMÃO, M.S.M.B.; Uso de micorrizas e rizóbio em cultivo consorciado de eucalipto e sesbânia. ii - absorção e eficiência de utilização de fósforo e frações fosfatadas. **R. Bras. Ci. Solo**, 27:593-599, 2003

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S. e SILVEIRA, A.P.D. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.42, n.11, p.1593-1600, nov. 2007.

TEDESCO, M. J.; VOLKWEISS, S. J.; BOHNEN, H.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A. Análises de solos, plantas e outros materiais. 2^a Ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 215p. **Boletim Técnico de Solos**, 5. 1995

YADEGARI, M.; RAHMANI, H.A.; NOORMOHAMMADI, G. & AYNEBAND, A.; Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Plant Nutrition**, 33:1733–1743, 2010.

8. CONCLUSÕES GERAIS

A cultura do feijoeiro apresenta alto potencial para a utilização de biotecnologias que permitam uma produção mais sustentável e com redução no uso de fertilizantes e agroquímicos. Os ensaios e análises realizadas neste estudo nos permitiram avaliar tecnologias como a inoculação de *Rhizobium tropici*, rizobactérias e do FMA *G. clarum* em genótipos crioulos e comerciais de feijoeiro. Os resultados observados colaboram para uma melhor compreensão das simbioses formadas e da interação entre os fatores ambiente, planta e microrganismos. A utilização destas tecnologias a nível comercial depende ainda do entendimento das relações simbióticas para que seja possível realizar um planejamento e recomendação de uso de forma a possibilitar a eficácia agronômica destas biotecnologias na cultura.

Os resultados mostraram uma alta densidade de rizobactérias nas raízes de feijoeiro amostradas com valores que variaram entre $3,85 \times 10^5$ a $1,36 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca, com o isolamento e caracterização fisiológica das estirpes foi possível observar o potencial na produção de auxina e fixação biológica de nitrogênio, nos testes realizados *in vitro* as estirpes Fe34 e Fe22 se destacaram na produção de auxinas com valores de 33,72 e 30,47 mg de AIA L^{-1} respectivamente. Para a FBN as estirpes Fe22 e Fe27 apresentaram os melhores valores de 33,25 e 27,85 mg de N L^{-1} , respectivamente. A identificação das estirpes de rizobactérias de raízes de feijoeiro demonstram a presença de rizobactérias do gênero *Pseudomonas* sp.; *Rhizobium* sp.; *Pseudomonas moraviensis* e *Stenotrophomonas maltophilia*. O seqüenciamento das estirpes permitiu observar que existe um predomínio do gênero *Pseudomonas* sp.: 13 de um total de 15 estirpes.

Não houve efeito significativo da inoculação com rizobactérias no NMP, na massa seca das plantas, no teor de N e N acumulado na parte aérea das plantas de feijoeiro. Não foram observadas diferenças entre os genótipos de feijoeiro crioulo e comercial utilizadas no ensaio. A época de coleta aos 28 dias não possibilitou resposta da planta a inoculação com rizobactérias.

As doses de P proporcionaram efeitos no teor de P, conteúdo de P e massa seca da parte aérea das plantas de feijoeiro. Para a massa seca da parte aérea a dose de P mais elevada

de 75 mg de P kg⁻¹ promoveu o incremento máximo. Os genótipos proporcionaram efeitos na massa seca e P acumulado da parte aérea das plantas de feijoeiro, sendo o genótipo comercial BAF115 (Valente) superior aos genótipos crioulos BAF55 e BAF42. A colonização micorrízica foi regulada pelos fatores dose de P, genótipo e inoculação, a elevação da dose de P não afetou a colonização por *G. clarum* no genótipo BAF115, enquanto o aumento da dose de P implicou em diminuição da colonização de 37% na dose 0 de P para 20% na dose 75 mg de P kg⁻¹. No genótipo crioulo BAF55 quando comparamos as condições de FMAs nativos e inoculação com *G. clarum* foi observado uma diferença a favor da inoculação *G. clarum*, a colonização micorrízica aumentou de 6,17% com a inoculação de *G. clarum*. No genótipo crioulo BAF42 na condição de inoculação com *G. clarum* a maior colonização foi encontrada no tratamento sem aplicação de P com o valor de 35,97%.

A dose de P proporcionou efeito na massa seca da parte aérea, o valor máximo de massa seca foi observado com a dose de 400 mg de P kg⁻¹. O efeito do genótipo foi observado no teor de P e P acumulado na primeira época de coleta, sendo que o genótipo crioulo BAF55 foi superior ao genótipo comercial BAF115. As doses de P proporcionaram efeito na colonização micorrízica nas duas épocas de coleta. Na primeira época de coleta, no genótipo comercial BAF115 com inoculação de *G. clarum* e dose de 100 mg P.kg⁻¹ houve elevação de 123% na colonização micorrízica em comparação com o tratamento sem aplicação de P, na condição de FMAs nativos o comportamento foi similar. No genótipo crioulo BAF55 nas condições de inoculação com *G. clarum* e FMAs nativos foi possível observar que o tratamento sem aplicação de P apresentou os menores valores. A interação entre genótipos, doses de P e inoculação com *G. clarum* proporcionou efeito na colonização micorrízica do feijoeiro. Na segunda época de amostragem, no genótipo BAF55 a inoculação com *G. clarum* aumentou a colonização em relação à condição de FMAs nativos. No tratamento inoculado com *G. clarum* a maior colonização foi observada no tratamento com a dose de 600 mg de P kg⁻¹.

A análise da expressão genética demonstrou que existe efeito dos genótipos analisados, doses de P e inoculação com *G. clarum* no gene PVPT. Foi observado na expressão gênica do gene PVPT que o genótipo crioulo BAF55 respondeu tanto com a inoculação com *G. clarum* quanto com a população de FMAs nativas, enquanto que o genótipo comercial BAF115 (Valente) respondeu somente no tratamento com FMAs nativos do solo. Em ambos os genótipos foi possível observar a resposta da expressão genética ocorreu na dose de 100 mg de P kg⁻¹, sendo que esta resposta está associada aos FMAs nativos do solo e não inoculação com *G. clarum*.

Foi observado efeito positivo da coinoculação de rizobactérias e *G. clarum* na massa seca da parte aérea, no P e N acumulado da parte aérea em plantas de feijoeiro. O melhor tratamento observado foi a coinoculação de *G. clarum* e a estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis*, que obteve os maiores valores de massa seca da parte aérea, do P e N acumulado e na massa seca dos nódulos. A estirpe Fe55 de *Pseudomonas moraviensis* apresentou melhor desempenho que a estirpe Ai27 nos parâmetros analisados neste ensaio.

A diversidade de genótipos de plantas de feijoeiro e de FMAs nativos demonstraram serem os fatores fundamentais na resposta das variáveis analisadas, os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que a diversidade de FMAs nativos proporcionou respostas na nutrição e expressão gênica do feijoeiro e que a diversidade dos genótipos delimitou as respostas da planta as condições submetidas.

Como consideração final é importante ressaltar que o desenvolvimento e a busca por estirpes de rizóbios, rizobactérias, FMAs e genótipos de feijoeiro responsivos a inoculação é um processo dinâmico e constante, ou seja, novos estudos que tenham como objetivo avaliar a eficiência agronômica de cepas de rizobactérias e FMAs co-inoculadas com rizóbios é fundamental para comprovar a eficiência destas tecnologias e torná-las uma realidade comercial no mercado brasileiro. A expectativa é que os resultados obtidos com este estudo possam colaborar com estudos futuros para o processo de seleção de rizobactérias na cultura do feijoeiro e para a compreensão do fator genótipo nas relações simbióticas com FMAs e o nível de P no solo.