

ESTUDO DO POTENCIAL AGRONÓMICO, EM ESTUFA, DE ESPÉCIES DE RIZOBIO NA CULTURA DO GRÃO-DE-BICO

ANTÓNIO PINTO ¹

ILÍDIO ADRIANO ²

¹ Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu.

² Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Centro.

Resumo

O presente trabalho tem como principal objectivo avaliar o potencial biológico de seis espécies de rizobio, capazes de produzir nódulos na raiz do grão-de-bico (*Cicer arietinum*, L) com a intenção de seleccionar possíveis espécies que se destaquem nos parâmetros agronómicos estudados, para posterior fornecimento aos agricultores.

As espécies ensaiadas foram oriundas de Espanha e isoladas no Departamento de Microbiologia e Genética da Universidade de Salamanca. Juntamente com estas espécies foram também estudadas as espécies de *Mesorhizobium mediterraneum* tipo e *Mesorhizobium ciceri* tipo consideradas de referência para a cultura do grão-de-bico, assim como as estirpes endógenas que funcionaram como testemunha.

As estirpes que deram origem às espécies foram designadas, de acordo com a sua origem por RCA21 (Riego de la Vega, León); RCA08 (Riego de la Vega, León); FCA11 (Fuentesaúco, Zamora); PECA26 (Pedrosillo, Salamanca); VGCA02 (Vega-Guatiza, Lanzarote); FCA08 (Fuentesaúco, Zamora); RCA13 (Riego de la Vega, León) e Testemunha (populações autóctones do solo da estufa. Estas estirpes foram identificadas por González (2003), nas seguintes espécies: *Mesorhizobium mediterraneum* (VGCA02); *Mesorhizobium ciceri* (FCA08 e PECA26); *Mesorhizobium tianshanense* (RCA08 e RCA21) e *Mesorhizobium amorphae* (FCA11 e RCA13).

O ensaio foi instalado na estufa de plástico, em forma de túnel com 2,5 m de altura, da Escola Superior Agrária de Viseu, tendo decorrido de 08/03/04 a 21/06/04, e sendo a cultura do grão-de-bico conduzida segundo as técnicas de cultivo tradicionais da região.

Adoptou-se um delineamento experimental constituído por quarenta blocos casualizados de 1 m² com quatro repetições, cada uma com dez blocos. Em cada bloco foram semeadas 15 sementes com um compasso de 0,20 m x 0,50 m, previamente inoculadas com cada uma das estirpes e espécies a estudar, com excepção da testemunha que não foi inoculada. Entre os blocos ficou um corredor com cerca de 0,20 m.

Os parâmetros agronómicos avaliados neste estudo, para cada uma das espécies ensaiadas, foram a percentagem de emergência, o número de nódulos por planta, o peso seco dos nódulos por planta, a altura da parte aérea das plantas e o peso seco da parte aérea das plantas.

No tratamento estatístico dos resultados utilizou-se o programa STATISTICA, método one-way ANOVA e POS-HOC recorrendo ao método Tukey HSD para desiguais n.

Relativamente aos parâmetros avaliados, os resultados obtidos não revelaram diferenças significativas entre as espécies ensaiadas e a testemunha, à excepção do peso seco dos nódulos. No entanto, a tendência dos valores observados indicou que, em termos gerais, os melhores resultados foram obtidos com a inoculação das espécies, por ordem decrescente: *M. mediterraneum* tipo, *M. ciceri* tipo, *M. amorphae*, *M. mediterraneum*, *M. ciceri*, *M. tianshanense* e *testemunha* (Blanco).

Palavras-chave: *Mesorhizobium*, grão-de-bico, nódulos, fixadores de azoto.

1. Introdução

A atmosfera é na sua maior parte constituída por azoto. Cerca de 78 % do ar é constituído por este elemento sob a forma molecular (N₂). No entanto, as plantas só por si não conseguem convertê-lo numa forma assimilável. A sua transformação em azoto assimilável pelas plantas só é possível pelo processo de fixação industrial ou pelo processo de fixação biológica, com interesse agronómico, podendo uma pequena quantidade ser arrastada pela chamada fixação espontânea (Postgate 1978, 1982; Morgante, 2005).

O azoto é o quarto elemento mais abundante nas plantas, sendo superado apenas pelo carbono, oxigénio e hidrogénio. É constituinte fundamental dos aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e clorofila entre outras moléculas, sendo o macro nutriente que é exigido em maiores quantidades pelas plantas (Morgante, 2005).

O processo de fixação industrial também conhecido por processo de Haber-Boch, processo que está na base do fabrico dos adubos azotados, utiliza temperaturas e pressões muito elevadas, tornando-o muito dispendioso do ponto de vista energético e económico, além de utilizar matérias-primas não renováveis e provocar forte poluição ambiental.

O processo de fixação biológica decorre à temperatura ambiente e pressão atmosférica normal. Este processo exige a presença de um sistema enzimático apropriado, com ocorrência apenas em microrganismos, de forma isolada ou em associação com plantas leguminosas e não leguminosas (Prescott et al., 1996; Madigan et al., 2000). É um processo natural e sustentável do ponto de vista económico e ecológico.

O grão-de-bico, à semelhança de outras leguminosas, apresenta a faculdade de fixar azoto atmosférico quando estabelece uma simbiose com bactérias de rizóbio.

O isolamento e a selecção de espécies de rizóbio perfeitamente adaptado às cultivares de grão-de-bico e às condições edafo-climáticas de uma determinada região, seria óptimo para a economia agrícola e para a defesa do ambiente, à semelhança do que acontece com a soja no Brasil.

Segundo Morgante (2005), a inoculação de soja com *Bradyrhizobium japonicum* permitiu aos produtores brasileiros reduzir em 57,5 % o valor dos custos da sua produção, em virtude de não haver necessidade da utilização dos adubos azotados. Desta forma viabilizou-se a produção de soja no Brasil, fazendo deste o maior exportador mundial.

O principal objectivo do presente trabalho é a avaliação do potencial agronómico de espécies de rizóbio, nas condições edafo-climáticas da região de Viseu, que foram isoladas e identificadas em Espanha como capazes de nodular o Grão-de-bico, cultura que se afigura como muito importante do ponto de vista nutricional e bioenergético.

2. Material e métodos

2.1. Origem e caracterização das espécies de rizóbio ensaiadas

Para a realização do presente estudo foram utilizadas diferentes espécies de rizóbio obtidas por González (2003), a partir de diferentes solos localizados na Espanha continental e nas Ilhas Canárias.

Todas as estirpes ensaiadas foram identificadas por González (2003), no género *Mesorhizobium*. Foram também utilizadas as espécies *M. mediterraneum* e *M. ciceri*, como espécies de referência (espécies tipo), pela sua capacidade de nodular as plantas de grão-de-bico. Assim, as espécies ensaiadas foram, para além das espécies tipo já referidas, as seguintes: *Mesorhizobium mediterraneum*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium tianshanense*, *Mesorhizobium amorphae* e *Testemunha* (sem inoculação). As primeiras duas espécies têm características muito semelhantes ao *M. mediterraneum* tipo e *M. ciceri* tipo, que são desde há muito tempo consideradas as espécies tipicamente noduladoras do grão-de-bico. As espécies *M. tianshanense* e *M. amorphae* constituem espécies novas que nunca antes tinham sido referenciadas como capazes de estabelecer simbiose com o grão-de-bico (González, 2003).

Morfológica e fisiologicamente todas as espécies apresentam um crescimento intermédio entre as espécies dos géneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. São aeróbias, Gram negativas, têm forma de bastonetes flagelados e não formam esporos (González, 2003).

2.2. Caracterização da variedade do grão-de-bico

A variedade de grão-de-bico utilizada foi gentilmente cedida pela Estação de Melhoramento de Plantas de Elvas, Portugal, referenciada com o código chk3209, com as seguintes características: porte da planta □□ erecto; cor da flor □ branca; cor da folhagem □ verde; pigmentação da vagem □ ausente; forma do grão □ semirrugoso; cor do grão □ branco amarelado; tamanho do grão – médio; resistência à ferrugem – tolerante; resistência ao frio – resistente (figura.1).



Figura 1. Características morfológicas das plantas.

2.2. Processo de inoculação das sementes

Para a obtenção do inóculo foi feito o crescimento de cada uma das espécies de rizóbio, em meio de cultura AML (Agar, Manitol, Levedura) através de um riscado em superfície, em tubos de ensaio (16 x 160) com agar inclinado e incubadas durante 7 dias à temperatura de 28 °C.

O meio de cultura referido apresenta a seguinte composição (g/L)

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levedura.....	0,5 g
Agar.....	20,0 g
Água destilada.....	1,0 L

A partir de cada um destes crescimentos foi feita uma suspensão bacteriana numa solução com 5 % de açúcar, com a qual se inocularam as sementes em condições de assepsia, de forma a ficar cerca de 1 milhão de bactérias por semente, e semeadas de imediato (segundo a metodologia do laboratório Rebelo da Silva, do Instituto Superior de Agronomia de Lisboa), (figuras.2 e 3).



Figura 2. Preparação da suspensão de bactérias.



Figura 3. Homogeneização das sementes inoculadas com a suspensão de bactérias.

2.4. Preparação do terreno

A fim de preparar uma boa cama para a semente, foi realizada uma lavoura manual e, próximo da sementeira, foi feita uma fresagem com um motocultivador. Para não alterar as condições de fertilidade do solo e não influenciar os resultados, não se procedeu a qualquer fertilização química ou correcção do solo.

2.5. Execução do delineamento experimental

A sementeira da cultura do grão-de-bico foi realizada na estufa da Escola Superior Agrária de Viseu. Para o efeito, fizeram-se quatro repetições com 10 parcelas cada. As parcelas tinham cerca de 1 m² de superfície

e estavam separadas por um corredor de serviço com cerca de 0,2 m de largura, para impedir as contaminações cruzadas.

Em cada parcela foram semeadas 15 sementes inoculadas com cada uma das espécies a ensaiar e com as espécies tipo já referenciadas. O compasso utilizado em cada parcela foi de (0,20 X 0,5 m). Em cada repetição as parcelas foram distribuídas aleatoriamente. Na figura 4 apresenta-se um aspecto geral do campo de ensaio.



Figura 4. Aspecto geral do campo de ensaio

2.6. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados, para cada um dos parâmetros em estudo, foi utilizada a análise de variância considerando blocos casualizados com mais de dois tratamentos.

O programa estatístico que se empregou foi o STATISTICA, método one-Way ANOVA e PÔS-HOC, recorrendo ao método Tukey HSD para n desiguais.

2.7. Sementeira

A sementeira foi realizada no dia 06/03/2004, utilizando-se a deposição das sementes em sulcos, em cada uma das parcelas, ficando as plantas alinhadas e com um compasso de 0,20 X 0,50 m, com já foi referido.

Os sulcos foram abertos manualmente com o auxílio de uma sachadeira e as sementes foram colocadas através de uma pinça previamente esterilizada à chama e arrefecida, para evitar contaminações cruzadas.

2.8. Recolha de dados

2.8.1. Percentagem de emergência

A percentagem de emergência foi determinada uma semana após o início da emergência das plantas, para nos assegurarmos que as plantas emergidas iriam vingar. Determinou-se pela relação percentual entre o número de plantas emergidas e o número de sementes semeadas.

Após o início da floração, foram arrancadas duas plantas em cada parcela a fim de se proceder à contagem dos nódulos, determinação do peso seco dos nódulos, medição da altura da parte aérea e peso seco da parte aérea. O arranque foi feito com muito cuidado com o auxílio de uma sachadeira para evitar desintegração e perda de nódulos. De imediato procedeu-se muito cuidadosamente à lavagem das raízes para facilitar a visualização e contagem dos nódulos.

2.8.2. Contagem dos nódulos

A contagem dos nódulos foi feita nas raízes, após uma lavagem cuidadosa, através do destacamento de todos os nódulos integralmente sãos (figura.5).

Figura 5. Aspecto dos nódulos na raiz.



2.8.3. Peso seco dos nódulos

A determinação do peso seco dos nódulos, expresso em mg, foi feita por pesagem numa balança de precisão, após secagem dos mesmos, numa estufa a 105°C, durante 24 horas.

2.8.4. Altura da parte aérea das plantas

A altura da parte aérea das plantas, expressa em cm, foi determinada através da sua medição, desde o colo até ao folíolo imparipinulado mais afastado, após separada a raiz do caule, e executada com uma fita métrica, como se indica na figura 6.



Figura 6. Medição da parte aérea das plantas.

2.8.5. Peso seco da parte aérea das plantas

O peso seco da parte aérea das plantas, expresso em g, foi determinado por pesagem numa balança de precisão, da parte aérea das plantas depois de secas à sombra e em lugar fresco e seco, até à obtenção de peso constante.

3. Resultados e discussão

3.1. Percentagem de emergência

Os resultados referentes à percentagem de emergência, encontram-se representados na figura 7.

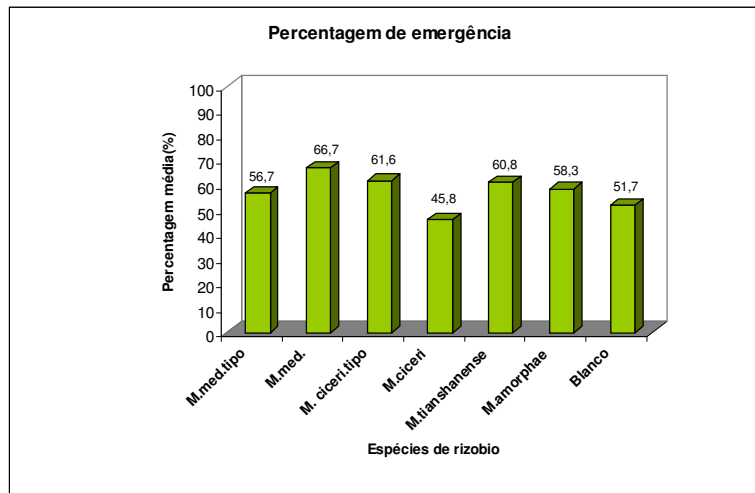


Figura 7. Resultados da percentagem de emergência.

Da aplicação da análise estatística, não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes espécies de rizóbio e a testemunha (Blanco).

No entanto, da análise desta figura, poderemos referir que a percentagem de emergência mais elevada foi observada na espécie *M. mediterraneum* (66,7%). A percentagem de emergência mais baixa foi observada na espécie *M. ciceri*, (45,8%). Relativamente às outras espécies, todas elas apresentaram uma percentagem de emergência intermédia, sendo de realçar a testemunha, que apresentou uma percentagem de 51%, que se aproximou de uma das espécies tipo.

3.2. Número de nódulos

Os resultados relativos a este parâmetro encontram-se apresentados na figura 8.

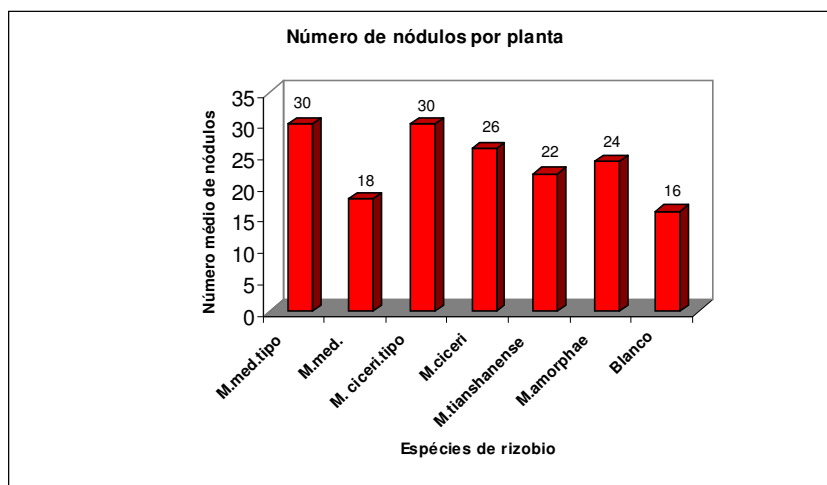


Figura 8. Número de nódulos.

Da aplicação da análise estatística, não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes espécies de rizóbio e a testemunha (Blanco).

Da análise da figura anterior, pode verificar-se que o número mais baixo de nódulos foi observado na testemunha (Blanco) (16). O número mais elevado de nódulos foi observado nas espécies tipo de *M. mediterraneum* e *M. ciceri* (30), o que era perfeitamente esperável. A espécie *M. mediterraneum* apresentou um número de nódulos mais baixo do que a espécie tipo *M. mediterraneum* (18 e 30 respectivamente). Nas espécies *M. ciceri*, *M. tianshanense* e *M. amorphae* foram observados números similares de nódulos (26, 22, 24, respectivamente).

3.3. Peso seco dos nódulos

Os resultados relativos ao peso seco dos nódulos encontram-se apresentados na figura 9.

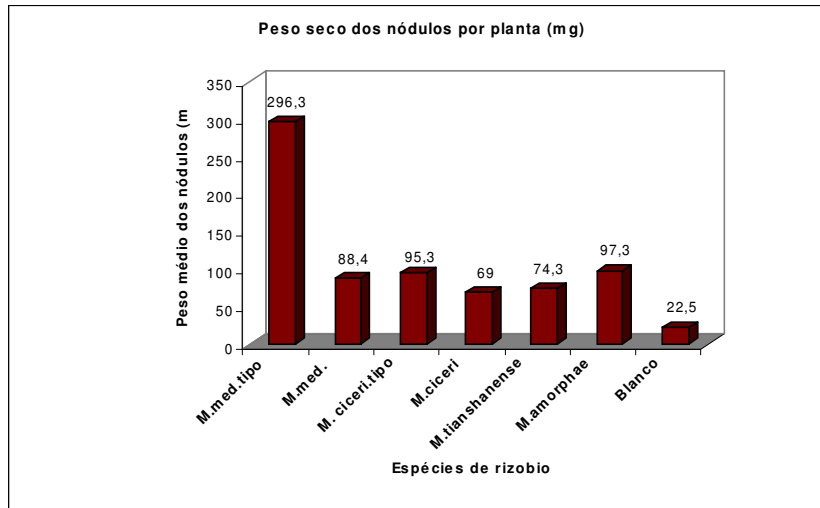


Figura 9. Peso seco dos nódulos.

Da aplicação da análise estatística, também para este parâmetro, não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes espécies de rizobio. No entanto, foram observadas diferenças significativas entre a testemunha (Blanco) e a espécie tipo *M. mediterraneum*. O peso mais baixo de nódulos foi observado na testemunha (Blanco) (22,5 mg). O peso mais elevado de nódulos foi observado na espécie tipo *M. mediterraneum* (296,3 mg). Na espécie *M. mediterraneum* foi observado também um peso de nódulos mais baixo do que na correspondente espécie tipo (88,4 mg e 296,3 mg, respectivamente). Cabe no entanto, destacar que foi observado um maior peso de nódulos nas espécies de *M. tianshanense* e *M. amorphae* que na espécie *M. ciceri*, considerada um microsimbionte habitual do grão-de-bico. De registar um peso muito elevado de nódulos na espécie tipo *M. mediterraneum*, quando comparada com as restantes.

3.4. Altura da parte aérea das plantas

Os resultados relativos à altura da parte aérea das plantas encontram-se apresentados na figura 10.

Da aplicação da análise estatística, também para este parâmetro, não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes espécies de rizobio e a testemunha (Blanco), como se pode observar na figura seguinte.

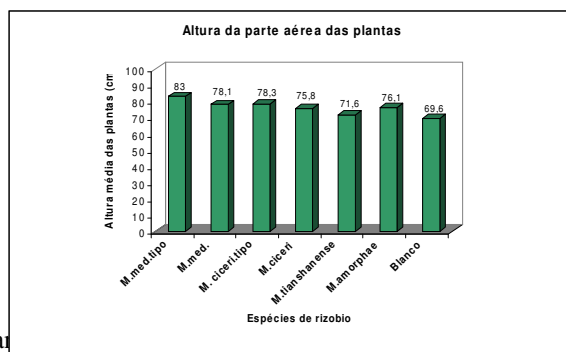


Figura 10. Altura da parte aérea das plantas.

Da análise da figura anterior, pode verificar-se que a maior altura da parte aérea das plantas foi observada na testemunha (Blanco) (69,6 cm). A maior altura da parte aérea das plantas foi observada na espécie tipo *M.*

mediterraneum (83 cm). As restantes espécies apresentaram alturas da parte aérea bastante similares, excluindo a espécie *M. tianshanense*, que se aproximou mais da altura da testemunha (Blanco).

3.5. Peso seco da parte aérea das plantas

Os resultados relativos ao peso seco da parte aérea das plantas encontram-se apresentados na figura 11.

Da aplicação da análise estatística, também para este parâmetro, não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes espécies de rizóbio e a testemunha (Blanco).

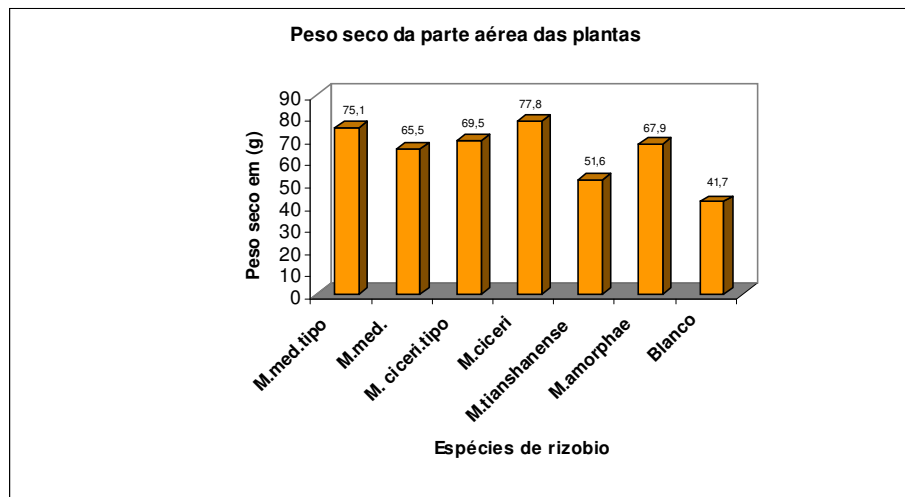


Figura 11. Peso seco da parte aérea das plantas.

Da análise da figura 11, pode verificar-se que o peso mais baixo da parte aérea das plantas foi observado na testemunha (Blanco) (41,7 g). O peso mais elevado da parte aérea das plantas foi observado na espécie *M. ciceri* (77,8 g). Na espécie *M. mediterraneum* foi observado um peso da parte aérea das plantas similar ao das espécies tipo *M. ciceri* e *M. amorphae* (65,5; 69,5 e 67,9 g, respectivamente). A espécie *M. tianshanense* produziu o menor peso da parte aérea, à exceção da testemunha (Blanco).

4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que para a generalidade dos parâmetros estudados, não se encontraram diferenças significativas entre as diferentes espécies ensaiadas. Só no caso do peso seco de dos nódulos é que se observaram diferenças significativas entre a espécie tipo *M. mediterraneum* e a testemunha (Blanco).

Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre as espécies ensaiadas, para a generalidade dos parâmetros estudados foram encontradas tendências, que apontam no sentido de os melhores resultados terem sido conseguidos com a inoculação por ordem decrescente de *Mesorhizobium mediterraneum* tipo, *Mesorhizobium ciceri* tipo, *Mesorhizobium amorphae*, *Mesorhizobium mediterraneum*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium tianshanense*, testemunha (Blanco ou seja populações autóctones do solo).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GONZÁLEZ RR (2003). Taxonomía polifásica de poblaciones de microorganismos que establecen simbiosis con *Cicer arietinum*. Universidad de Salamanca. Departamento de Microbiología y Genética. Tese de Doutoramento: 163 pp.
- MORGANTE PG (2005). Fixação biológica e assimilação de nitrogénio. <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisiVegGrad/MetNitro.htm>, consultado em 19-09-2009.
- POSTGATE JR (1978). Nitrogen Fixation. Studies in Biology n° 92, London. 68 pp.
- POSTGATE JR (1982). The fundamentals of nitrogen fixation. University Press. Cambridge. 252 pp.
- MADIGAN MT, Martinko JM & Parker J (2000). Brock biology of microorganisms. 9ª Edição. Prentice- Hall. Brasil. 991pp.

- PRESCOTT LM, Harley JP & Klein DA (1996). Microbiology. 3ª Edição. Wm.C. Brower Publishers. 935 pp.