

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE COMPETITIVA (VIA “ELISA” E RAPD-PCR) DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM* NA NODULAÇÃO DA FEIJOEIRO EM SOLO DE CERRADO.

Raposeiras, R.(1); Passos, R.V.M.(1); Carvalhais, L.C.(1); Paiva, E.(2); Marriel, I.E.(2); Oliveira, C.A.(1); Sá, N.M.H.(1)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte M.G (1); Embrapa/Milho e Sorgo-Sete Lagoas M.G(2).

INTRODUÇÃO

Os solos tropicais apresentam estirpes de *Rhizobium* nativas, capazes de nodular o feijoeiro. Porém, essas estirpes são consideradas pouco efetivas (Pereira, 1991; Pinto et al, 1995), comprometendo a resposta positiva à inoculação, devido a competição com as estirpes efetivas introduzidas. Por outro lado, a inadequação, em geral, dos métodos tradicionais de identificação dessas estirpes de rizóbio no solo, têm limitado os estudos de competitividade necessários para a seleção de estirpes efetivas e competitivas, capazes de garantir o sucesso da inoculação dessa leguminosa. Nesse trabalho, foi avaliada a competitividade de estirpes efetivas de *R. tropici* em solos de cerrado, através da sua identificação via técnicas de “ELISA”(Enzyme Linked Imunosorbent Assay) e “RAPD”(Randomly Amplified Polymorphic DNAs).

MATERIAL E MÉTODOS

Estirpes de *Rhizobium tropici* (Br322, SLA2.2 e CPACH₂₀), pré-selecionadas quanto a efetividade e competitividade em condições axênicas (Raposeiras et al, 1999), foram avaliadas em vasos contendo solo de cerrado, onde foram cultivadas as variedades de feijão “carioca” e “diamante negro”. Utilizou-se 4 repetições por tratamento, incluindo: co-inoculações 2 a 2 das estirpes testes; estirpes inoculadas individualmente; tratamento sem inoculação e tratamento contendo nitrogênio mineral (NH₄SO₄ distribuído em 3 aplicações, totalizando 90 mg de N).

Após 40 dias, as plantas foram colhidas, avaliadas quanto a produção de matéria seca, porcentagem de nitrogênio e número de nódulos. A identificação das estirpes nos nódulos via “ELISA” foi efetuada após determinação dos títulos dos soros em coelhos (Nishi, 1994) de acordo com Ahmad et al. (1981). Para identificação via RAPD, os nódulos foram isolados (Vincent, 1970), procedendo-se a extração do DNA total (Sá et al, 1993) de cada estirpe e verificação de sua qualidade e dosagem das amostras em gel de agarose. Os procedimentos para amplificação das amostras, seguiram-se de acordo com Steindel et al (1993). Foram utilizados 3 “primers” como marcadores (Kit-Operon-Technologies-Inc.): OPC04(ACGGGACCTG), OPC10 (AGCAGCGAGG) e OPA10(TGGTCGGGTG), previamente selecionados (Oliveira et al, 2000 e Pinto et al, 1999). Os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida a 5%. A identificação das estirpes foi efetuada através da comparação do perfil

eletroforético da estirpe original com cada um dos isolamentos dos nódulos amostrados com os 3 “primers” referidos. Foram considerados como correspondentes as estirpes que apresentaram similaridade igual ou superior a 65% em relação a(s) estirpe(s) original(is).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação das estirpes nos nódulos foi efetuada através das 2 técnicas (“ELISA” e RAPD), porém apesar de sua sensibilidade e indicações na literatura para identificação de nódulos em plantas cultivadas em solo, a técnica de “ELISA” apresentou elevado índice de nódulos não identificados e/ou reações cruzadas. A confirmação definitiva da presença das estirpes foi efetuada via RAPD.

De modo geral, o efeito da inoculação foi mais acentuado na variedade “carioca” (tab.1), mostrando a influência da planta hospedeira sobre a resposta à inoculação como observado por outros autores (Monte alegre et al, 1994). Apesar das plantas que receberam o N mineral apresentarem a maior produtividade, alguns tratamentos, representados especialmente pela inoculação com a estirpe SLA2.2, mostraram ganhos significativos em relação aos controles não inoculados, na produção de matéria seca e teor de N. A contribuição dessa estirpe foi confirmada não só pela sua maior efetividade, mas pela sua maior competitividade evidenciada pelo seu maior índice de ocupação nodular entre as estirpes testadas (tab.2). A estirpe CPACH₂₀ mostrou-se a menos competitiva das 3 estirpes testadas (índice de ocupação nodular menor ou igual a 20%). A Br322 apresentou resultados variáveis de ocupação nodular. Quando co-inoculada com a estirpe CPACH₂₀ foi aparentemente favorecida, e quando co-inoculada com a estirpe SLA2.2 foi totalmente dominada por essa estirpe. Esses resultados indicam que além da interação com a rizosfera e com a população nativa de rizóbio do solo, as estirpes usadas nos inoculantes mistos precisam ser compatíveis.

BIBLIOGRAFIA

- AHMAD, M.H.; EAGLESHAM, A.R.J.; HASSOUNA, S. Examining serological of “Cowpea” rhizobia by ELISA technique. *Archeology Microbiology*, v.130, p. 281-281, 1981.
- MONTE ALEGRE, C. & KIPENOLT, J. Ability of selected accessions of *Phaseolus vulgaris* L. to restrict nodulation by particular rhizobia. *Archives of Microbiol*, 162: 352-356, 1994.
- NISHI, Y.M. Identificação sorológica de Bradyrhizobium/Rhizobium. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Cap 8, 1994.
- OLIVEIRA, I.P.; VASCONCELLOS M.J.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; VARGAS, M.A.T.; and SÁ, M.N.H. Random amplified polymorphic DNA analysis of effective *Rhizobium* sp. Associated with beans cultivated in Brazilian Cerrado Soils. *Brazilian Journal of Microbiology* in press, 2000.
- PEREIRA, J.C.; VIDOR, C.LOVATO, P.E. & PENTEADO, A.F. Eficiência e capacidade competitiva de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* em feijão. *Pesq. Agropec. Bras.* 26: 1073-1080, 1991.
- PINTO, P.P.; KATTAH, L.S. & SÁ, N.M.H. Termotolerância e eficiência em fixar N, de estirpes de *Rhizobium* nativas, isoladas de áreas de cultivos do feijoeiro nos cerrados. *Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, Viçosa, Vol.p. 509-51, 1995.*
- PINTO, P.P.; CARVALHO, J.G.; PASSOS, R.V.M.; VARGAS, M.A.T.; PURCINO, H.; SÁ, M.N.H. Caracterização genética, via RAPD, de estirpes nativas de rizóbio associadas a *Arachis pintoi* isoladas dos cerrados. *XX Congresso Brasileiro de Microbiologia p. 291, Salvador outubro, 1999.*

RAPOSEIRAS, R.; PASSOS, R.V.M.; VARGAS M.A.T.; PAIVA E.MARRIEL, I.E., SÁ, N.M.H. Identificação de estirpes de *Rhizobium* competitivas para nodulação efetiva do feijoeiro nos cerrados. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia Salvador Bahia, p. 292, Resumos 1999

SÁ, N.M.H, SCOTTI, M.R.M.M.L.; VARGAS, M.A.T. & DOBEREINER, J. Resistência natural a estreptomicina e eficiência de estirpes de *Rhizobium* sp. Nativas nos Cerrados associados a *Stylosanthes* spp. Ver. Pesq. Agropec. Bras. 18: 213-218, 1993.

STEINDEL, M; DIAS NETO, E.; MENESES, C. L. P.; ROMANHA, A.; SIMPSON, A. L. G.; Random amplified polymorphic DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Gen.* 90: 655-656, 1993.

VICENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blacwell, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).

Tab.1- Peso seco, número de nódulos e % de N de plantas de feijoeiro; variedades "carioca" e "diamante negro", inoculadas com estirpes de *Rhizobium*, em testes de competitividade em vasos com solo de cerrado.

Tratamentos	Variedade Carioca			Variedade Diamante Negro		
	Peso seco / parte aérea (g)	Nº de nódulos	% de N	Peso seco / parte aérea (g)	Nº de nódulos	% de N
Test. N	2.396 a	—	3.95a	2.340 a	—	4.20a
Sem inoculação	1.261 c	55	2.88d	1.257 ab	67	3.10c
BR322	1.482 abc	92	3.46c	0.988 bc	65	3.83ab
SLA2.2	1.736 b	76	3.64b	1.338 ab	103	3.91a
CPACH ₂₀	1.305 bc	65	3.54bc	0.811 c	80	3.49bc
BR322XSLA2.2	1.585 ab	71	3.62bc	1.232 ab	56	3.30c
BR322XCPACH ₂₀	1.630 b	98	3.60bc	1.404 b	48	3.34c
SLA2.2XCPACH ₂₀	1.611 ab	77	3.95a	1.569 b	79	3.27c

Cada tratamento corresponde a média de 5 plantas. Os valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Duncan a 5%.

Tab.2- Determinação da ocupação nodular do feijoeiro; variedades "carioca" e "diamante negro" inoculado com diferentes estirpes de *Rhizobium* em vasos contendo solo de cerrado, via "RAPD".

Estirpe inoculada	Variedade Carioca				Variedade Diamante Negro			
	% de nódulos com perfil de amplificação				% de nódulos com perfil de amplificação			
	BR 322	SLA 2.2	CPACH ₂₀	Outras	BR 322	SLA 2.2	CPACH ₂₀	Outras
BR322	20	—	—	80	10	—	—	90
SLA2.2	—	60	—	40	—	60	—	40
CPACH20	—	—	50	50	—	—	40	60
BR322XSLA2.2	0	63	—	57	0	50	—	50
BR322XCPACH20	50	—	10	40	35	—	0	65
SLA2.2XCPACH20	—	63	13	24	—	80	0	20

- RAPOSEIRAS, R.; PASSOS, R.V.M.; VARGAS M.A.T.; PAIVA E.MARRIEL, I.E. , SÁ, N.M.H. Identificação de estirpes de *Rhizobium* competitivas para nodulação efetiva do feijoeiro nos cerrados. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia Salvador Bahia, p. 292, Resumos 1999
- SÁ, N.M.H, SCOTTI, M.R.M.M.L.; VARGAS, M.A.T. & DOBEREINER, J. Resistência natural a estreptomicina e eficiência de estirpes de *Rhizobium* sp. Nativas nos Cerrados associados a *Stylosanthes* spp. Ver. Pesq. Agropec. Bras. 18: 213-218, 1993.
- STEINDEL, M; DIAS NETO, E.; MENESES, C. L. P.; ROMANHA, A.; SIMPSON, A. L. G.; Random amplified polymorphic DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Gen.* 90: 655-656, 1993.
- VICENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blacwell, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).

Tab.1- Peso seco, número de nódulos e % de N de plantas de feijoeiro; variedades “carioca” e “diamante negro”, inoculadas com estirpes de *Rhizobium*, em testes de competitividade em vasos com solo de cerrado.

Tratamentos	Variedade Carioca			Variedade Diamante Negro		
	Peso seco / parte aérea (g)	Nº de nódulos	% de N	Peso seco / parte aérea (g)	Nº de nódulos	% de N
Test. N	2.396 a	—	3.95a	2.340 a	—	4.20a
Sem inoculação	1.261 c	55	2.88d	1.257 ab	67	3.10c
BR322	1.482 abc	92	3.46c	0.988 bc	65	3.83ab
SLA2.2	1.736 b	76	3.64b	1.338 ab	103	3.91a
CPACH ₂₀	1.305 bc	65	3.54bc	0.811 c	80	3.49bc
BR322XSLA2.2	1.585 ab	71	3.62bc	1.232 ab	56	3.30c
BR322XCPACH ₂₀	1.630 b	98	3.60bc	1.404 b	48	3.34c
SLA2.2XCPACH ₂₀	1.611 ab	77	3.95a	1.569 b	79	3.27c

Cada tratamento corresponde a média de 5 plantas . Os valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Duncan a 5%.

Tab.2- Determinação da ocupação nodular do feijoeiro; variedades “carioca” e “diamante negro” inoculado com diferentes estirpes de *Rhizobium* em vasos contendo solo de cerrado, via “RAPD”.

Estirpe inoculada	Variedade Carioca				Variedade Diamante Negro			
	% de nódulos com perfil de amplificação				% de nódulos com perfil de amplificação			
	BR 322	SLA 2.2	CPACH ₂₀	Outras	BR 322	SLA 2.2	CPACH ₂₀	Outras
BR322	20	—	—	80	10	—	—	90
SLA2.2	—	60	—	40	—	60	—	40
CPACH20	—	—	50	50	—	—	40	60
BER322XSLA2.2	0	63	—	57	0	50	—	50
BR322XCPACH20	50	—	10	40	35	—	0	65
SLA2.2XCPACH20	—	63	13	24	—	80	0	20