

## INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO DE CAUPI COM ESTIRPES EFICIENTES DE RIZÓBIO NA POPULAÇÃO RIZOBIANA NATIVA NO SOLO DA REGIÃO SEMI-ÁRIDA BRASILEIRA

F. W. RANGEL<sup>1</sup>, L. M. V. MARTINS<sup>2</sup>, G. R. XAVIER<sup>2</sup>, J. R. A. RIBEIRO<sup>3</sup>, L. B. MORGADO<sup>4</sup>,  
M. C. P. NEVES e N. G. RUMJANEK<sup>5</sup>

**Resumo** - O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) foi cultivado durante dois anos consecutivos em área de sequeiro da região semi-árida do Nordeste do Brasil. Durante o experimento foi realizada inoculação com estirpes de rizóbio previamente selecionadas quanto à eficiência simbiótica. Ao final do segundo ano de cultivo, foram coletadas amostras de solos de cada tratamento para avaliação da população sobrevivente. Os resultados revelam que a introdução da leguminosa na área foi capaz de promover aumento no número de sorogrupos através do estímulo no crescimento de populações rizobianas específicas. A inoculação durante dois anos consecutivos foi capaz de aumentar a população relativa as estirpes BR 3267 e BR 3269 usadas como inoculante indicando ser esta uma estratégia para melhorar o estabelecimento de estirpes eficientes no solo das áreas de sequeiro.

**Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*, ELISA, reatividade imunológica

### INFLUENCE OF COWPEA INOCULATION WITH EFFICIENT RHIZOBIUM STRAINS ON THE SOIL NATIVE RHIZOBIAL POPULATION IN THE SEMI-ARID BRAZILIAN REGION

**Abstract** - Cowpea was cultivated during 2 following years in non-irrigated areas of the semi-arid region of Brazil. During this period, inoculation was performed with previously selected strains for efficiently fixing nitrogen. At the end of the second cultivation year, soil samples were collected from each parcel aiming the characterization of rhizobial population. The results revealed that cowpea introduction in the area promoted an increase in the sorogroup numbers due to a stimulus on the growth of specific rhizobium populations. The inoculation during 2 following years were capable of increasing BR 3267 and BR 3269 populations which has been used as inoculant indicating that this may represent a strategy to optimize the establishment of efficient strains in soils of non-irrigated areas.

**Keywords:** *Vigna unguiculata*, ELISA, immunological reaction

#### Introdução

O feijão é uma das mais importantes fontes de proteína para a população brasileira, especialmente para a de baixa renda. O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também conhecido como feijão-de-corda, macassar e fradinho, possui elevado valor nutritivo e adapta-se bem ao clima da região semi-árida do país, por ser uma espécie de reconhecida capacidade de se desenvolver e produzir satisfatoriamente em condições desfavoráveis de água e de solo, razão talvez, de sua ampla dispersão em áreas consideradas agronomicamente marginais. A maioria do cultivo é praticada em condições de sequeiro, e apesar dos baixos níveis de produtividade encontrados nestas regiões (500 a 700 kg.ha<sup>-1</sup>), é uma cultura de subsistência importante para o sertanejo, garantindo um teor de proteína na dieta alimentar durante os meses de seca, quando o clima caracteriza-se por severos déficits hídricos e temperaturas elevadas.

Apesar desta leguminosa ser capaz de fixar eficientemente o nitrogênio quando associada ao rizóbio, estudos visando a seleção e a identificação de associações caupi e rizóbio com maior potencial de obtenção de N através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) têm sido negligenciados há muitos anos. Isto se deve ao caráter pouco específico do macrossimbionte em relação à bactéria, resultando em uma baixa eficiência da inoculação por estirpes

<sup>1</sup>Estudante em Ciências Agrícola - UFRRJ E-mail: fwrangel@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Estudante de doutorado em Ciências do Solo - UFRRJ

<sup>3</sup>Apoio Técnico -FAPERJ

<sup>4</sup>Embrapa Semi-árido - Petrolina (PE)

<sup>5</sup>Embrapa Agrobiologia - BR 465 Km 47 Caixa Postal 74.505 CEP 23851- 970 Seropédica (RJ)



selecionadas. Na maioria dos casos, os nódulos são formados por estirpes nativas não raramente ineficientes, adaptadas a condições edafoclimáticas ao longo de sua história evolutiva.

A utilização de inoculantes visando a otimização FBN em caupi é uma das técnicas capazes de proporcionar maior produtividade à cultura e melhoria nas condições do solo das áreas secas. Martins (1996) avaliando a diversidade de rizóbio de solos, utilizando caupi como planta-isca nas regiões dos Estados de Pernambuco e Sergipe, encontrou cerca de 76 grupos de rizóbios capazes de nodular esta leguminosa, baseados em características morfológicas da colônia e fisiológicas da associação. Dentro deste grupo foram encontradas estirpes com diferentes níveis de eficiência em relação à FBN em caupi em experimentos de casa de vegetação.

Uma das dificuldades em se estudar o estabelecimento de inoculantes rizobianos tem sido a identificação de um método adequado, que apresente sensibilidade, especificidade e praticidade que permita a caracterização de um número grande de amostras. A utilização de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), uma técnica baseada na reação imunológica (Evans et al. 1996) viabiliza a identificação de estirpes de rizóbio formadoras de nódulos. Soros policlonais são capazes de reconhecer a superfície das células bacterianas contendo antígenos variados e, não raro se observa reatividade cruzada entre diferentes estirpes (Vincent, 1982). Esta característica permite estabelecer a distância filogenética entre diferentes estirpes e pode ser uma ferramenta capaz de auxiliar na compreensão de um germoplasma específico.

Este estudo teve por objetivo avaliar por meio de ELISA o perfil antigênico de estirpes de rizóbio em solo de área experimental cultivada durante dois anos consecutivos.

### Materiais e Métodos

As análises foram realizadas em um experimento de plantio de caupi após dois anos de cultivo consecutivos em área de plantio de sequeiro no campo experimental da Embrapa Semi-Árido em Petrolina (PE). O desenho experimental foi em blocos ao acaso com três repetições e dois fatores: estirpes e esquemas de inoculação: esquema I, inoculação no cultivo 1, esquema II inoculação no cultivo 2 e esquema III inoculação nos dois cultivos.

Foram utilizados de, estirpes de nódulos de caupi caracterizados previamente como eficientes e tratamentos controle sem inoculação e controle com adubação nitrogenada (50 kg de N.ha<sup>-1</sup>) além de uma parcela onde não houve o cultivo de caupi durante os dois anos de experimento. Após as análises de ocupação nodular foram selecionadas para a caracterização do perfil antigênico da população de rizóbio do solo apenas os tratamentos inoculados com as estirpes BR 3267 e BR 3269 que apresentaram uma boa nodulação e produtividade. Além destes tratamentos foram incluídos os tratamentos controle descritos.

Sementes de caupi desinfestadas foram cultivadas em amostras de solo coletadas nestas parcelas em casa-de-vegetação. Após 35 dias de cultivo, os nódulos foram coletados e estocados em sílica-gel. Posteriormente foram selecionados, ao acaso, quatro nódulos por parcela, que foram re-hidratados, macerados em 1,7 ml de água destilada em microtubos e armazenados a -15°C. A reatividade imunológica dos extratos foi determinada por meio da técnica ELISA, utilizando-se os anti-soros produzidos em coelhos jovens da raça Nova Zelândia após a inoculação com as estirpes BR 3267, BR 3268, BR 3269, BR 3270, BR 3271, BR 3272, BR 3273, BR 3274, BR 3275, BR 3276, BR 96, BR 33, 7-18, 9-5 e BR 2001. Os anti-soros foram submetidos a purificação em coluna preenchida com proteína A de *Staphylococcus aureus* visando eliminar imunoglobulinas não-específicas, IgMs. O ensaio utilizou um anti-corpo secundário conjugado à fosfatase alcalina que reconhece o substrato p-nitrofenilfosfato formando uma cor amarela que pode ser quantificada a 405 nm (Ribeiro, 1999).

### Resultados e Discussão

De um modo geral, foi observada a presença dos sorogrupos BR 3268, BR 3269, BR 3276 e com menor intensidade o BR 3274, nos nódulos do tratamento onde a cultura do caupi não foi cultivada (Figura 1). O cultivo de caupi resultou em aumento no número dos sorogrupos observados, aparecendo respostas não muito intensas aos antisoros BR 3270, BR 3271, BR 96 e 7-18. Os sorogrupos BR 3269 e BR 3276 mantiveram-se num nível semelhante ao observado no tratamento sem plantio, enquanto houve uma resposta maior ao sorogrupo BR 3274 e uma redução do sorogrupo BR3268. Estes dados indicam que a introdução da leguminosa na área foi capaz de promover aumento no número de sorogrupos através do estímulo no crescimento de populações rizobianas específicas (Woomer et al., 1988; Turk et al, 1993). Estes resultados também foram encontrados por Thurman & Bronfield (1988) e Sanginga et al. (1994), que ressaltaram o fato de que a presença do hospedeiro como integrante da vegetação natural ou o cultivo freqüente da leguminosa, seleciona e aumenta a comunidade do rizóbio a ela homóloga. A Figura 1 mostra que os sorogrupos BR3269 e BR 3276 dominaram, nos solos com e sem cultivo de caupi. Por outro lado, o cultivo de caupi sob adubação nitrogenada, acarretou em uma diminuição destes sorogrupos

(BR3269 e BR 3276), enquanto foi observada a presença de sorogrupos que não apareceram nos outros tratamentos: BR3267, BR 3272, BR3273, BR 3275 e BR2001, o que indica a seleção de estirpes de rizóbio capazes de induzir a formação de nódulos na presença de nitrogênio no solo. Os sorogrupos BR 3271 e 7-18 apresentaram uma resposta mais intensa em presença do adubo nitrogenado o que provavelmente também pode ser resultado de um processo de seleção. Alguns sorogrupos (BR3270, BR 3274, BR 3276 e BR96) diminuíram de intensidade ou mesmo desapareceram completamente com o tratamento nitrogenado, sugerindo a limitação de crescimento destas estirpes frente a presença do adubo nitrogenado. Neste tratamento pode ser observado também que apesar de um número maior de anti-soros ter respondido positivamente, não se observa predominância de alguns grupos como foi observado nos tratamentos anteriores.

Solos provenientes de áreas que foram inoculadas somente no plantio 1 (Esquema I da Figura 2), revelaram que a introdução do inoculante BR 3267 promoveu um deslocamento dos sorogrupos BR 3269 e BR 3276 que são dominantes nas áreas sem caupi e com caupi não inoculado. Não houve repetição destes resultados no esquema II, onde esses sorogrupos ocuparam cerca de 50% dos nódulos, sugerindo baixa competitividade do inoculante.

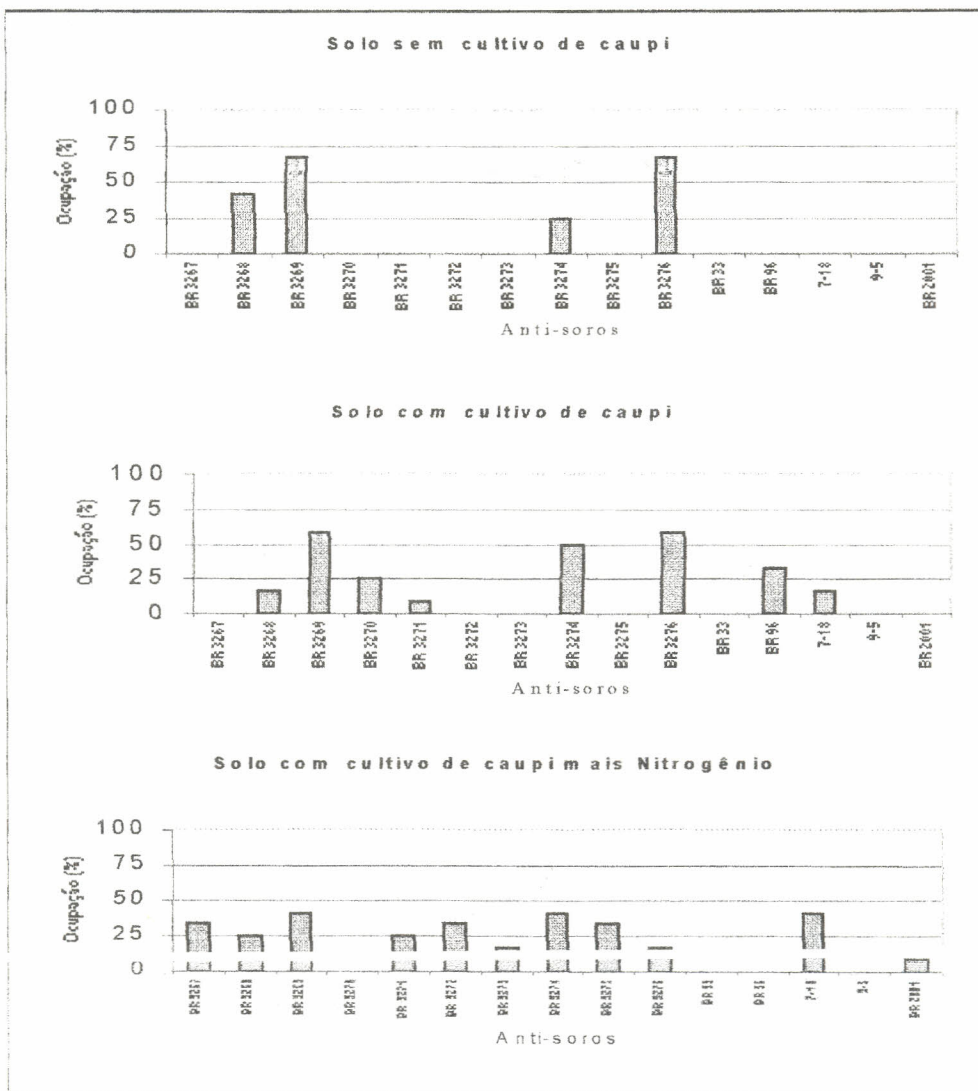


FIGURA 1. Ocupação nodular de 15 sorogrupos relacionados com tratamentos com e sem o cultivo de caupi e com o cultivo de caupi adubado com nitrogênio



O sorogrupo BR 3267 mostrou ocupação de 100% no esquema III da Figura 2, inoculado nos dois anos de cultivo e, 60% no tratamento inoculado no primeiro cultivo somente, mostrando características de sobrevivência e estabelecimento, importantes para o estudo de ecologia microbiana. O aumento observado nos sorogrupos BR 3271, BR 3272 e BR 3274 pode também estar relacionado ao estabelecimento do inoculante (BR 3267). Ribeiro (1999) mostrou que esta estirpe é identificada por anti-soros produzidos contra as estirpes BR 3271, BR 3272 e BR 3274, o que caracteriza uma resposta cruzada.

Em relação à introdução do inoculante BR 3275 (Figura 3), observa-se um aumento da presença do sorogrupo respectivo no solo. Aumento considerável foi observado após a inoculação durante dois anos consecutivos. Foi identificada também a predominância dos sorogrupos dominantes nos solos estudados para os três esquemas de inoculação, com exceção da BR 3276, que no esquema de inoculação durante dois anos consecutivos, foi observada uma redução na resposta a este sorogrupo. É possível que neste esquema de inoculação, o aumento da população da estirpe inoculante tenha deslocado estirpes que respondem ao sorogrupo BR 3276. Observa-se também um aumento da resposta ao sorogrupo BR3268, que de acordo com Ribeiro (1999) não apresenta reação cruzada significativa com a estirpe BR 3275, sugerindo que a presença dessa estirpe, estimulou a multiplicação de outras estirpes nativas.

Os resultados mostram que as estirpes BR 3267 e BR 3275 quando utilizadas como inoculante, foram capazes de se estabelecer no solo, sobrevivendo durante o período do experimento. Além disso, o estabelecimento do inoculante é mais expressivo quando as plantas são inoculadas durante dois anos consecutivos. Esses resultados mostram que a seleção e determinação de inoculantes devem ser realizados por mais de um período de cultivo da leguminosa.

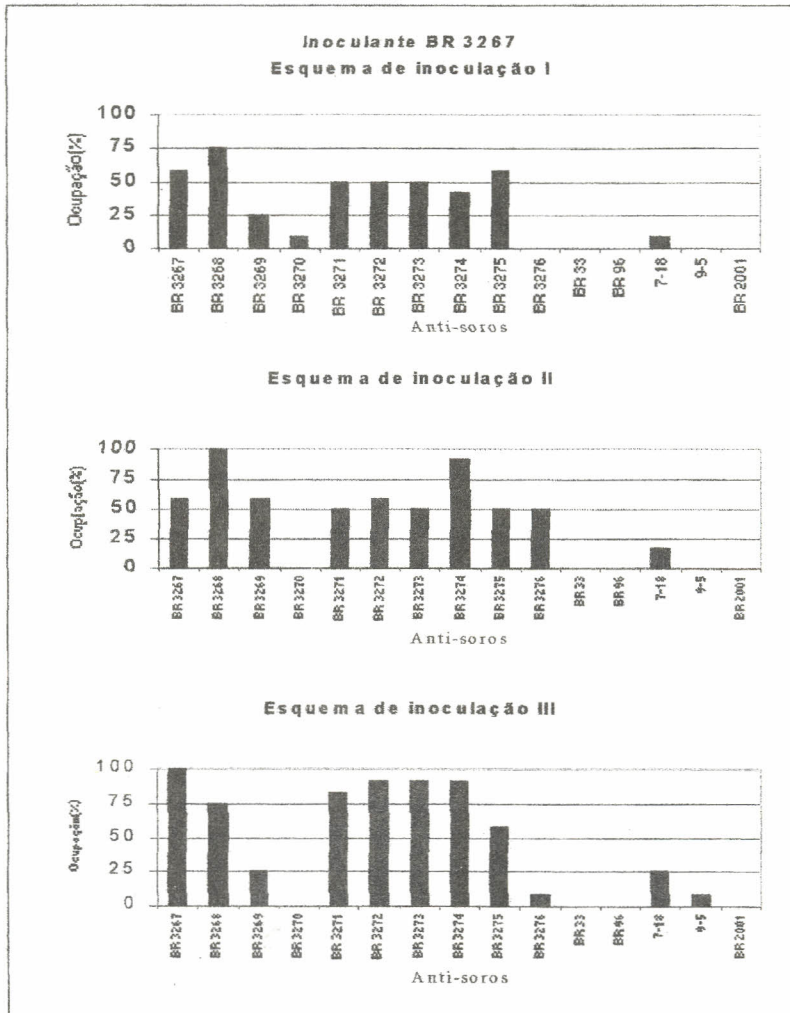


FIGURA 2. Ocupação nodular de 15 sorogrupos relacionado com o tratamento inoculado com a BR 3267



SANGINGA, N., DANSO, S. K. A, MULONGOY, K., OJEIFO, A. A. Persistence and recovery of introduced *Rhizobium* ten years after inoculation on *Leucaena leucocephala* grown on an Alfisol in Southwestern Nigeria. **Plant and Soil**. Dordrecht. V.159. 1994. p.199-204.

THURMAN, N. P., BRONFIELD, E. S. P. Effect of variation within and between *Medicago* e *Melilotus* species on the composition and dynamics of indigenous populations of *R. meliloti*. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford. V.20. 1988. p.31-38.

TURK, D., KEYSER, H. H., SINGLETON, P. W. Response of tree legumes to rhizobial inoculation in relation to the population density of indigenous rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford. V.25. 1993. P.75-81.

VINCENT, J. M. The basic serology of rhizobia. Nitrogen Fixation in Legumes, VINCENT, J. M. Academic Press Australia. 1982. 188p. WOOMER, P.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Ecological Indicators of Native Rhizobia in Tropical Soils. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.54. 1988. p.1112-1116.

WOOMER, P.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Ecological Indicators of Native Rhizobia in Tropical Soils. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.54. 1988. p.1112-1116.