

ISSN 1518-5680

# UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO



S  
8609

## Anais da XI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ Trabalhos completos

27, 28 E 29 DE NOVEMBRO DE 2001

Volume 11  
Número 2

PAT-OK  
PC-

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
DECANATO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

ANAIS DA  
XI JORNADA DE  
INICIAÇÃO CIENTÍFICA  
DA UFRRJ - 2001

27, 28 e 29 de novembro

TRABALHOS COMPLETOS

Editora da Universidade Rural  
Seropédica, RJ



## Estudo do comportamento de estirpes eficientes de rizóbio inoculado em caupi frente a população nativa de rizóbio da região semi-árida do nordeste do Brasil

Fernando Wagner Rangel<sup>1</sup>, Lindete Míria V. Martins<sup>2</sup>, Gustavo R. Xavier<sup>2</sup>, José Roberto A. Ribeiro<sup>2</sup>, L. B. Morgado<sup>3</sup>, Maria Cristina Prata Neves<sup>2</sup> & Norma Gouveia Rumjanek<sup>2</sup>

1. Bolsista PIBIC/Embrapa; 2. Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 7, Caixa Postal 74505. CEP 23890-000. Seropédica, RJ. [fwrangel@yahoo.com.br](mailto:fwrangel@yahoo.com.br); 3. Embrapa Semi-Árido.

Palavras-chave: Caupi, ELISA, Reatividade Imunológica.

### 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.

### 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 FBN têm sido negligenciados há muitos anos. Isto se deve ao caráter pouco específico do macrossimbionte em relação à bactéria, resultando numa baixa eficiência da inoculação por estirpes 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 da fixação biológica de nitrogênio (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 do estado 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 Immuno Sorbent 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 2 anos consecutivos.

## Material e Métodos

As análises foram realizadas num 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 10 isolados de nódulos de caupi caracterizados previamente como eficientes e tratamentos controle sem inoculação e controle com adubação nitrogenada, além de uma parcela onde não houve o cultivo de caupi durante os 2 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 4 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 anti-soros 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 frequente 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 em presença de adubação nitrogenada, acarretou numa 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 presença de estirpes tolerantes ao nitrogênio no solo. Os sorogrupos BR 3271 e 7-18 apresentaram uma resposta mais intensa em presença do adubo nitrogenado o que provavelmente também é uma indicação de tolerância. Alguns sorogrupos (BR3270, BR 3274, BR 3276 e BR96) diminuíram de intensidade ou mesmo desapareceram completamente com o tratamento nitrogenado, sugerindo a presença de estirpes sensíveis ao 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 estes sorogrupos ocuparam cerca de 50% dos nódulos, sugerindo baixa competitividade do inoculante. 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 2 anos consecutivos. Foi identificada também a predominância dos sorogrupos dominantes nos solos estudados para os 3 esquemas de inoculação, com exceção da BR 3276, que no esquema de inoculação durante 2 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 desta estirpe, estimulou a multiplicação de outras estirpes nativas.

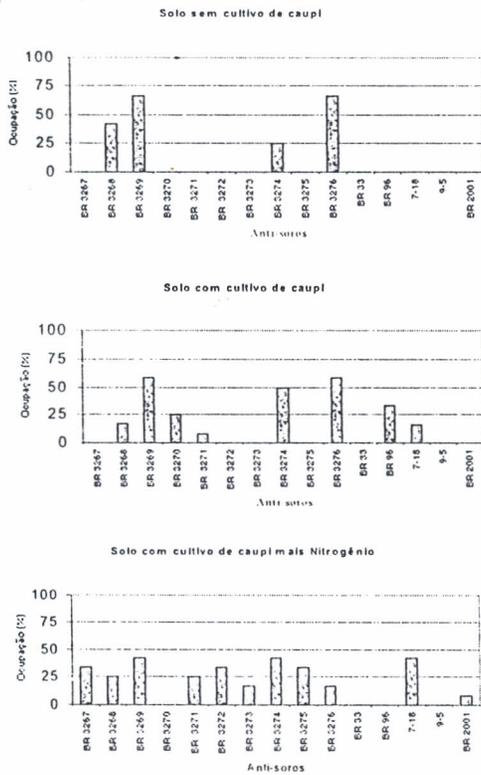


Figura 1. Ocupação nodular de 15 sorogrupos relacionados com tratamentos com e sem o cultivo de caupi e com o cultivo de caupi adubado com nitrogênio.

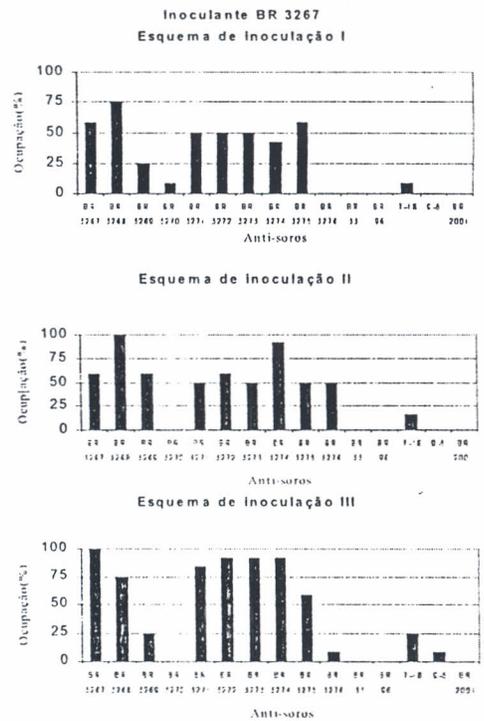


Figura 2. Ocupação nodular de 15 sorogrupos relacionado com o tratamento inoculado com a BR 3267.

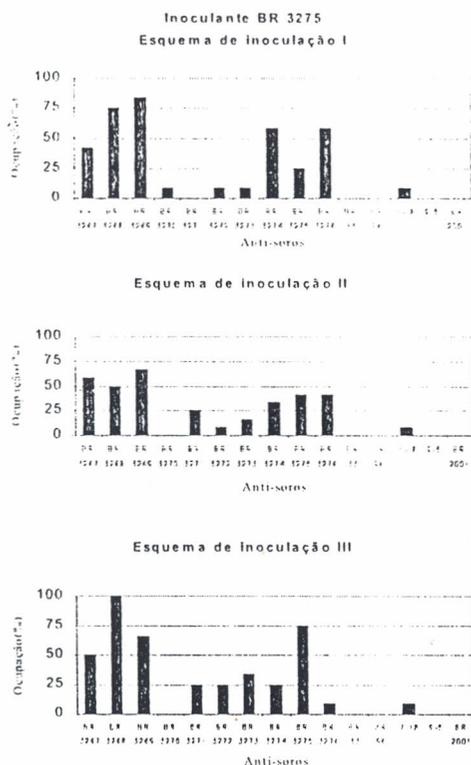


Figura 3. Ocupação nodular de 15 sorogrupos relacionado com o tratamento inoculado com a BR 3275.

### Conclusões

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 2 anos consecutivos. Estes resultados apontam para que estudos visando a seleção e determinação de inoculantes devem ser realizados por mais de um período de cultivo da leguminosa.

### Agradecimentos e Auxílio Financeiro

A Embrapa Agrobiologia e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

### Referências Bibliográficas

EVANS, J., GREGORY, A., DOBROWOLKI, N., MORRIS, S.G., O'CONNOR, G.E., WALLACE, Nodulation of field-grown *Pisum sativum* and *Vicia faba*: competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* determined by an indirect, competitive ELISA method. *Soil Biology and Biochemistry* v. 28. n. 2. 1996. p.247-255.

MARTINS, L.M.V. Características ecológicas e fisiológicas de caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil. 1996. 214 p. tese de mestrado.

RIBEIRO, J.R.A. Aplicação da técnica de ELISA no estudo ecológico de *Rhizobium* sp. isolados de nódulos de caupi (*Vigna unguiculata*) originárias da região Nordeste brasileira. Rio de Janeiro: UFRJ. 1999. 121 p. Tese de Mestrado.

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 na Alfisol in Southwestern Nigéria. *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. Responce 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 sorology of rhizobia. Nitrogen Fixation in Legumes, VINCENT, J.M. Academic Press Australia. 1982. 188 p.

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.