

CO-INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE CAUPI COM *Bradyrhizobium* E *Paenibacillus* E SUA EFICIÊNCIA NA ABSORÇÃO DE CÁLCIO, FERRO E FÓSFORO PELA PLANTA¹

Valéria Nogueira da Silva², Luiz Eduardo de Souza Fernandes da Silva²
e Márcia do Vale Barreto Figueiredo³

ABSTRACT

CO-INOCULATION OF CAUPI SEEDS WITH *Bradyrhizobium* AND *Paenibacillus* AND ITS EFFICIENCY ON CALCIUM, IRON AND PHOSPHORUS PLANT ABSORPTION

The objective of this study was to verify the viability of the co-inoculation of caupi seeds (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) with nitrogen fixing bacteria of *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 and NFB-700) and *Paenibacillus polymyxa* [(Loutit (L.))] strains and their efficiency in calcium, iron, and phosphorus absorption by caupi plants under different inoculation methods. A Yellow Argisol was collected in February, 2002, located at the km 53 of BR 101 North highway, latitude 07°South34'00", longitude 35°West00'00" and altitude 14m, in Itapirema (Goiana, Pernambuco State, Brazil). The inoculations were made in seeds and soil to a depth of 3.5 cm using IPA-205 cultivar. The variables evaluated were calcium, iron, and phosphorus concentration in the aerial part dry matter. The co-inoculation of caupi with strains of *Bradyrhizobium* sp. introduced in the soil provided calcium, iron, and phosphorus concentration increase.

KEY WORDS: co-infection, calcium, iron, phosphorus, *Vigna unguiculata*.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a viabilidade da co-inoculação de sementes de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) com bactérias fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) e *Paenibacillus polymyxa* [(Loutit (L.))] e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pelas plantas de caupi, sob diferentes métodos de inoculação. Foi utilizado um Argissolo Amarelo coletado em fevereiro de 2002, localizado a BR 101 Norte, km 53, latitude 07°34'00", longitude 35°00'00" e altitude 14m, em Itapirema (Goiana, Estado de Pernambuco). As inoculações foram efetuadas na semente e no solo a uma profundidade de 3,5 cm, usando-se a cultivar IPA-205. Foram determinadas as concentrações de cálcio, ferro e fósforo na matéria seca da parte aérea das plantas de caupi. A co-inoculação do caupi com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. introduzidas no solo proporciona aumentos nas concentrações de cálcio, ferro e fósforo.

PALAVRAS-CHAVE: co-infecção, cálcio, ferro, fósforo, *Vigna unguiculata*.

INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa de alto valor protéico, apresenta boa capacidade de adaptação a diferentes tipos de solos, sendo cultivado, predominantemente, nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil. Dentre as culturas de subsistência, o caupi tem-se constituído na principal fonte de proteína, para as populações carentes destas regiões (Melo 1999).

Bactérias da família Rhizobiaceae se associam às raízes de diversas leguminosas, dentre elas o caupi, desempenhando um papel fundamental, que é suprir as necessidades das plantas por nitrogênio com bactérias do gênero *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* que são denominados genericamente de rizóbios (Vargas & Hungria 1997, Júnior & Hungria 2000).

1. Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Trabalho recebido em abr./2005 e aceito para publicação em jul./2006 (registro nº 629).

2. Departamento de Agronomia / UFRPE. CEP 52171- 900 Recife, PE. E-mails: vnds1@hotmail.com; luizeduardo_404@hotmail.com

3. Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA / EPEAL. CEP 50761-000 Recife, PE. E-mail: mbarreto@elogica.com.br

O caupi é uma leguminosa que possui ampla variabilidade genética para os caracteres de interesse agrônomico. No Nordeste, o melhoramento genético da espécie tem buscado, principalmente, maiores produtividade e resistência a doenças (Martins *et al.* 2000). Um dos mecanismos alternativos, importante para a elevação do rendimento da cultura, é a sua associação simbiótica com microrganismos que favorecem a resistência da planta a patógenos, além de outros efeitos sinérgicos.

O exato mecanismo pelos quais bactérias endofíticas induzem proteção à planta hospedeira permanece ainda obscuro, embora se saiba de mecanismos como produção de sideróforo, competição por nutrientes (Shisido *et al.* 1999). Além de outros benefícios tais como o controle biológico (Pleban *et al.* 1995), a fixação de nitrogênio (Silva 2003) e a produção de metabólitos que podem oferecer aumentos nas concentrações de N, P, Fe, Ca e Cu, na parte aérea do hospedeiro (Cattelan 1995). Isso porque esses elementos auxiliam na fixação de N₂ e crescimento da planta.

As plantas dependentes da fixação biológica de N₂ requerem mais fosfato que as plantas que usam exclusivamente N mineral. Os níveis baixos de P podem afetar a simbiose, ao diminuir o suplemento de fotossintato ao nódulo, reduzir a taxa de crescimento bacteriano e a população total de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Siqueira & Franco 1988). Devido ao seu papel na síntese de proteínas, sua falta se reflete diretamente no menor crescimento da planta (Malavolta *et al.* 1997). Já o ferro é considerado um metal chave para transformações energéticas necessárias para síntese e outros processos vitais das células (Ferreira & Cruz 1991).

Um aspecto importante diz respeito às raízes das plantas necessitarem de cálcio no próprio ambiente de absorção de água e nutrientes. Isto porque as plantas não translocam o elemento, pelo floema, até as raízes (Raij 1991). O cálcio favorece o desenvolvimento do sistema radicular e um alto teor desse elemento é necessário para a fase de encurvamento do pêlo. Sua deficiência dificulta a divisão celular, afeta o crescimento da raiz, diminui ou anula a produção de sementes e provoca uma menor nodulação das leguminosas (Malavolta 1980, Malavolta *et al.* 1997).

No Brasil, ainda há poucos trabalhos nessa área, porém, já foi observada a promoção do crescimento vegetal em café, feijão, milho, soja, entre outras, devido a essas bactérias. Todavia, em cada caso o isolado de rizobactérias promotoras de cres-

cimento parece agir de modo diferente. Algumas dessas rizobactérias, quando inoculadas na semente ou no solo, têm a capacidade de promover o crescimento vegetal através de diferentes mecanismos, podendo apresentar efeito sinérgico com a fixação simbiótica do nitrogênio (Cattelan 1999).

As atividades biológicas e metabólicas da interface solo-raiz estão entre os fatores mais críticos, que contribuem para o apoio da vida em nosso planeta (Smucker 1993). No mundo todo, os rumos tomados pela agricultura exigem a investigação de fenômenos que resultem no emprego de técnicas não agressivas ao ambiente (Freitas 1994).

Este trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade da co-infecção de sementes de caupi com bactérias dos gêneros *Paenibacillus* e *Bradyrhizobium*, sob diferentes métodos de inoculação, e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo em plantas de caupi.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se um Argissolo Amarelo (Embrapa 1999), da Estação Experimental da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA (Itapirema- PE), localizado a BR 101 Norte, km 53, latitude 07° 34' 00", longitude 35° 00' 00" e altitude 14 m. O experimento foi realizado em casa de vegetação utilizando 4,0 kg de solo por vaso, com pH corrigido para 6,5 e autoclavado por sessenta minutos a 120°C a 101 kPa, com intervalos de 24 h, por três dias consecutivos. As análises químicas e microbiológicas foram efetuadas na mesma empresa e a cultivar de caupi usada foi IPA-205. As bactérias utilizadas no experimento são listadas na Tabela 1.

O experimento constatou de nove tratamentos, sendo que oito deles representaram as inoculações alternativas com as estirpes de *Bradyrhizobium* (BR-2001 e NFB-700) ou de *Paenibacillus*, no solo ou na semente, mais um tratamento adicional repre-

Tabela 1. Estirpes de *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus polymyxa*, utilizadas no experimento.

Bactérias	Código do acesso	Origem	Referência ou fonte
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	BR2001	<i>Crotalaria juncea</i>	CNPAB/ Embrapa-Brasil
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	NFB -700	<i>Cajanus cajan</i>	UFPE (NFB) Laboratório de Microbiologia
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Loutit (L)	Solo de pastagens: Otago, Nova Zelândia	Line & Loutit (1971)

sentado pela testemunha nitrogenada. O delineamento experimental foi em blocos completos casualizados com três repetições, sendo cada parcela constituída de nove vasos.

A estirpe de *Paenibacillus* foi purificada em tubo de ensaio utilizando o meio GB (Seldin *et al.* 1983), incubada a 32°C por 38 h. As estirpes de *Bradyrhizobium* foram crescidas em meio YMA (ágar, manitol, extrato de levedura) mais vermelho congo (Vincent 1970), por cinco dias e passadas para meio YM (manitol, extrato de levedura) pelo mesmo tempo a uma temperatura de 28°C, sob agitação mecânica. A inoculação e co-inoculação foram efetuadas na semente (por trinta minutos em cada meio de cultura, separadamente, antes do plantio) e no solo a uma profundidade de 3,5 cm. Para cada semente foi adicionada 1,0 mL de cada cultura líquida contendo aproximadamente 10^8 cels mL⁻¹, para *Bradyrhizobium*, e 10^7 cels mL⁻¹ para *Paenibacillus*.

Durante as primeiras duas semanas do cultivo, todos os vasos receberam solução nutriente (Silveira *et al.* 2001) estéril, com mínimo de nitrogênio – 1 mM N de Ca(NO₃)₂ e, após, foi utilizada solução nutriente estéril livre de nitrogênio. Aos 45 dias após o plantio, foram analisada as concentrações de fósforo, cálcio e ferro na matéria seca da parte aérea, a partir da biomassa seca (72 h) sob o fluxo de ar a 65°C, utilizando metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997).

A análise de variância dos dados foi feita seguindo o modelo do delineamento e a comparação das médias dos tratamentos foi realizada por meio do teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram analisados entres os grupos "a" e "b", e dentro dos grupos, sendo: grupo "a" – inoculação apenas com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB -700), no solo e na semente; grupo "b" – co-inoculação com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) e com *Paenibacillus polymyxa*, no solo e na semente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à concentração de cálcio na parte aérea das plantas de caupi, verifica-se que, para a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001), as maiores concentrações médias foram obtidas para todos os tratamentos quando a bactéria foi inoculada na semente (Figura 1a). Para a estirpe *Bradyrhizobium* sp. (NFB-700), a situação foi inversa, porém, não apresentaram diferença signi-

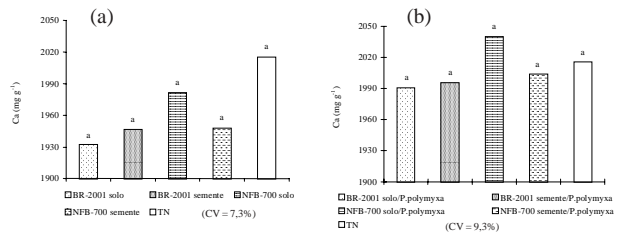


Figura 1. Concentração de cálcio (Ca) na parte aérea de plantas de caupi inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) (a), e co-inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) e com *Paenibacillus polymyxa* (b), no solo e na semente, em relação à testemunha nitrogenada (TN).

ficativa em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (Figura 1b).

Pode-se observar que houve maiores concentrações de cálcio para todos os tratamentos co-inoculados com BR-2001 e NFB-700 (Figura 1b). Verificou-se também uma correlação significativa ($r = 0,67$; $p < 0,05$) entre a concentração de cálcio e a produção de matéria seca da raiz dos tratamentos co-inoculados.

Sabe-se que ganhos na concentração de cálcio estimulam o desenvolvimento do sistema radicular, aumentam a resistência a pragas e moléstias, auxiliam a fixação de nitrogênio. Um alto teor de cálcio é necessário para a fase de encurvamento do pêlo. A deficiência desse elemento dificulta a divisão celular, afetando o crescimento da raiz e provoca menor nodulação em leguminosas (Malavolta 1980; Malavolta *et al.* 1997).

Na Figura 2 encontra-se o resultado relacionado à concentração de fósforo na parte aérea do caupi, onde se observa que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700), nos diferentes métodos de inoculação. Porém, foi verificada uma maior concentração de fósforo nos tratamentos co-inoculados de até 25,3% (Figura 2b) em relação aos tratamentos inoculados (Figura 2a).

Gaing & Gaur (1991), trabalhando com feijão, observaram que uma estirpe de *Bacillus subtilis* aumentou a produção de grãos, biomassa, absorção de P e N, em solo deficiente de P suplementado com fosfato de rocha. Malavolta *et al.* (1997) relatam que o fósforo acelera a formação de raízes, aumenta o teor de carboidratos e ajuda na fixação simbiótica de nitrogênio.

Em relação à concentração de ferro na parte aérea do caupi, foi verificado que todos os tratamentos tiveram concentrações médias superior quando as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. foram inoculadas no

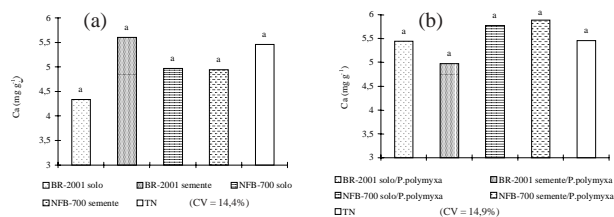


Figura 2. Concentração de fósforo (P) na parte aérea de plantas de caupi inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) (a), e co-inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) e com *Paenibacillus polymyxa* (b), no solo e na semente, em relação à testemunha nitrogenada (TN).

solo (Figura 3). Os tratamentos co-inoculados apresentaram diferença superior de até 103,9%, na concentração desse elemento, comparados aos tratamentos inoculados, como por exemplo, no tratamento BR-2001-solo/*P. polymyxa*-semente (Figura 3b) em comparação ao tratamento BR-2001-solo (Figura 3a). Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Cattelan (1995), em trabalhos com rizobactérias promotoras de crescimento em plantas.

Um aumento na concentração de ferro nas plantas é importante, uma vez que a formação de clorofila parece ser influenciada por esse elemento, o qual participa na fixação do N₂ e síntese de proteínas. Setenta e cinco por cento do ferro da folha está nos cloroplastos e, quando há deficiência desse micro-nutriente, diminui-se o teor de clorofila e ocorre redução no crescimento e frutificação (Malavolta 1980, Malavolta *et al.* 1997).

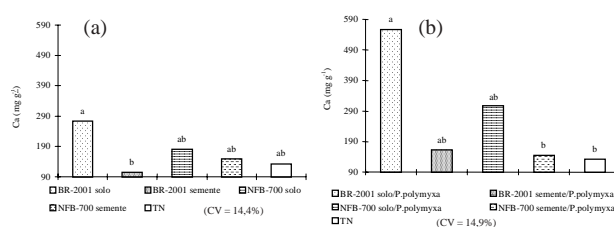


Figura 3. Concentração de ferro (Fe) na parte aérea de plantas de caupi inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) (a), e co-inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) e com *Paenibacillus polymyxa* (b), no solo e na semente, em relação à testemunha nitrogenada (TN).

CONCLUSÕES

1. A estirpe de *Paenibacillus polymyxa* co-inoculada com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. proporciona uma tendência de aumento nas concentrações de cálcio, fósforo e ferro na parte aérea das plantas de caupi.

2. O caupi inoculado e co-inoculado com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. introduzidas no solo obteve melhores resultados.

REFERÊNCIAS

- Cattelan, A. J. 1995. Aumento no número de pêlos radiculares em plântulas de soja inoculadas com bactérias promotoras do crescimento. p. 393-397. In Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo, 3. Embrapa, Londrina. 421 p. Anais
- Cattelan, A. J. 1999. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Embrapa, Londrina. 36 p.
- Embrapa. 1999. Sistema brasileiro de classificação de solos. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 1.ed. rev. Embrapa, CNPS, Brasília. 412 p.
- Ferreira, M. E. & M. C. P. da Cruz. 1991. Micronutrientes na Agricultura. Associação brasileira para pesquisa da potassa e do fosfato. Potatos, Piracicaba. 734 p.
- Freitas, S. S. 1994. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs). p. 369-376. In M. Hungria & R. Araújo (Ed.). Manual e métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Embrapa. Brasília. 542 p.
- Gaing, S. & A. C. Gaur. 1991. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms an their interation with mung bean. *Plant and Soil*, 133: 141-149.
- Junior, B. & M. Hungria. 2000. Efeito de doses de inoculantes turfosos na fixação biológica do nitrogênio pela cultura da soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 24: 527-535. Campinas.
- Line, M. A. & M. W. Loutit. 1971. Non-symbiotic nitrogen fixing organisms from some New-Zealand tussock grassland soils. *J. Gen. Microbiol.* 66: 309-318.
- Malavolta, E. 1980. Elementos de nutrição mineral de plantas. Agronômica Ceres, São Paulo. 254 p.
- Malavolta, E., G. C. Vitti & S. A. A. Oliveira. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Potatos, Piracicaba. 319 p.
- Martins, L. M. V., F. W., Rangel, G. R., Xavier, J. R. A., Ribeiro, L. B., Morgado, M. C. P., Neves & N. G., Rumjanek. 2000. Inoculação de caupi cultivada em área de sequeiro do sertão nordestino. p. 336. In *Fertibio*. Santa Maria, RS. 78 p. Resumos.
- Melo, A. R. B. 1999. Utilização de nitrato e ajustamento osmótico em plantas de feijão de corda (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) submetidas a diferentes níveis

- de estresse salino. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 255 p.
- Pleban, S., F. Ingel & I. Chet. 1995. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* sp. European Journal of Plant Pathology. 101: 665-672.
- Raij, B.V. 1991. Fertilidade do solo e adubação. Agronômica Ceres, São Paulo. 343 p.
- Seldin, L., J. D. V. Elsas & E. G. C. Penido. 1983. *Bacillus* nitrogen fixers from brazilian soils. Plant and Soil. 70: 243-255.
- Shisido, M., C. Brevil & C. P. Chanway. 1999. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiology Ecology, Amsterdam, 29: 191-196.
- Silva, L. E. S. F. 2003. Fixação do N₂ no caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) pela interação *Bradyrhizobium* sp. x *Glomus clarum*. sob condições de estresse hídrico. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 102 p.
- Silveira, J. A. G., R. C. L., Costa, R. A., Viegas, J. T. A., Oliveira & M. V. B., Figueiredo. 2001. N-compound accumulation and carbohydrate shortage on N fixation in drought-stressed and rewatered cowpea plants. Spanish J. Agric. Res. 3 (1): 65-75.
- Siqueira, J. O. & A. A. Franco. 1988. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Nagy, Brasília. 235 p.
- Smucker, A. J. M. 1993. Soil environmental modifications of root dynamics and measurement. Annual Review Phytopathology, Palto Alto, 31:191-216.
- Vargas, M. A. T. & M. Hungria. 1997. Biologia dos solos dos cerrados. Embrapa, Planaltina. 524 p.
- Vincent, J. M. 1970. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 119 p.