

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 agrônomo. 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 fósforo 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 cajans</i>	UFRPE (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 10⁸ cels mL⁻¹, para *Bradyrhizobium*, e 10⁷ 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 significativa 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).

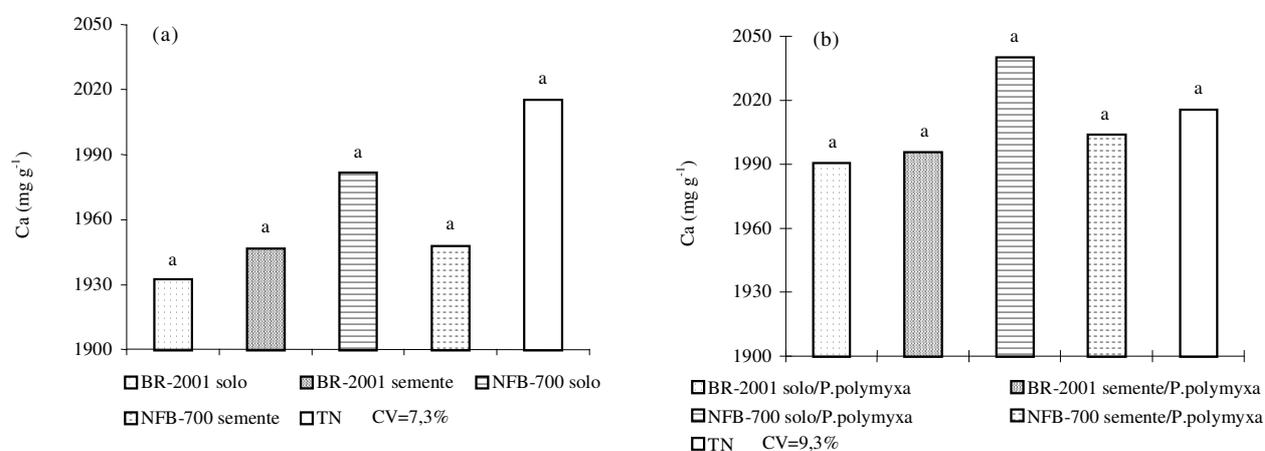


Figura 1. Concentração de cálcio (Ca) na parte aérea de plantas de caupi inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) (a), e co-inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) e com *Paenibacillus polymyxa* (b), no solo e na semente, em relação à testemunha nitrogenada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

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 solo (Figura 3). Os tratamentos co-inoculados apresentaram diferença superior de até 103,9%, na concentração desse elemento, comparados aos

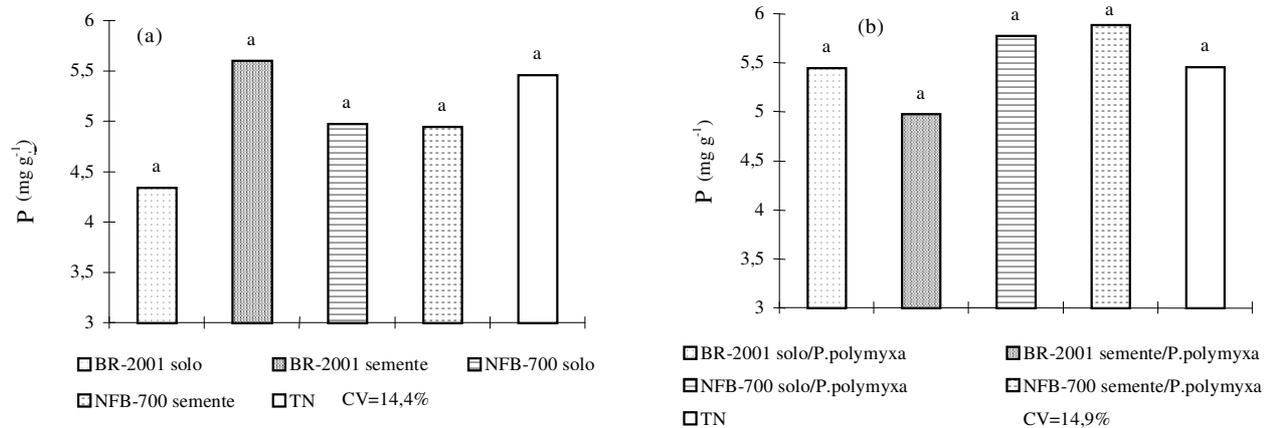


Figura 2. Concentração de fósforo (P) na parte aérea de plantas de caupi inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) (a), e co-inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) e com *Paenibacillus polymyxa* (b), no solo e na semente, em relação à testemunha nitrogenada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

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

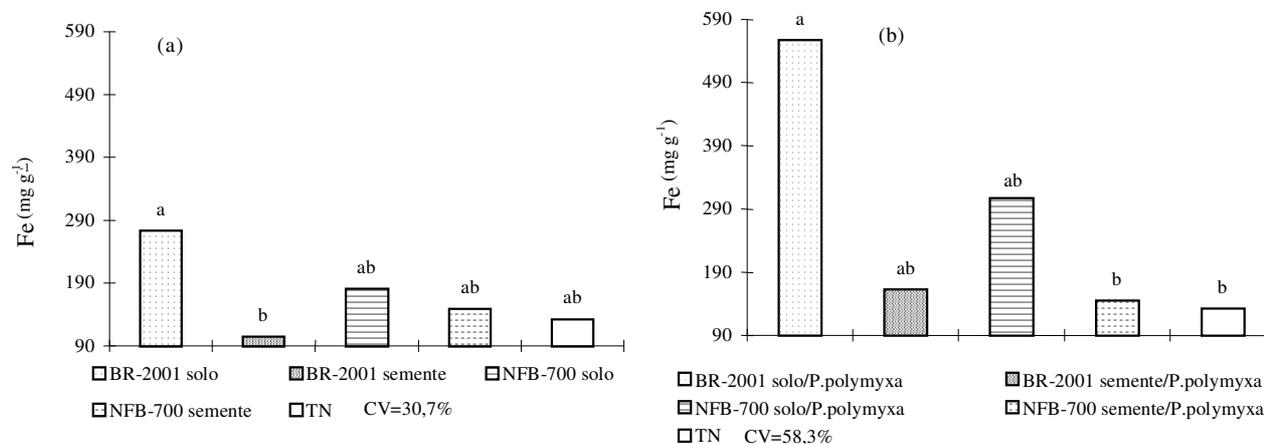


Figura 3. Concentração de ferro (Fe) na parte aérea de plantas de caupi inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) (a), e co-inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001 e NFB-700) e com *Paenibacillus polymyxa* (b), no solo e na semente, em relação à testemunha nitrogenada (TN).

micro-nutriente, diminui-se o teor de clorofila e ocorre redução no crescimento e frutificação (Malavolta 1980, Malavolta *et al.* 1997).

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 rolfsi* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* sp. European Journal of Plant Pathology. 101: 665-672.
- Raj, 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. Nacy, 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 Scientifi Puplications, Oxford. 119 p.