

# Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*

Valéria Nogueira da Silva<sup>1,4</sup>, Luiz Eduardo de Souza Fernandes da Silva<sup>1,4</sup>, Cosme Rafael Martínez<sup>2</sup>, Lucy Seldin<sup>3</sup>, Hélio Almeida Burity<sup>4</sup> e Márcia do Vale Barreto Figueiredo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. <sup>3</sup>Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. <sup>4</sup>Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Pernambuco, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: vnds1@hotmail.com

**RESUMO.** O efeito de estirpes de *Paenibacillus* e *Bacillus* (Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas - RPCP) na simbiose do caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] com *Bradyrhizobium* sp. foi estudado em vaso de Leonard. A cultivar de caupi utilizada foi a IPA-205. As plantas foram irrigadas com solução nutritiva sem nitrogênio. As inoculações com RPCP promoveram maior crescimento da raiz em relação às co-inoculações, como a estirpe S21 de *P. polymyxa*, que foi superior (70%) ao controle (não-inoculado). As RPCP aumentaram a nodulação específica nas plantas co-inoculadas, evidenciado pela correlação positiva com o nitrogênio acumulado específico. Efeitos indiretos e diretos na nodulação específica foram mostrados pela diminuição significativa do crescimento da raiz (40%) e pelo aumento não-significativo do número de nódulos (46%), nas estirpes Loutit (L) de *P. polymyxa* e na LBF-410 de *P. macerans*. RPCP que estimulam a nodulação podem promover uma melhor fixação de N<sub>2</sub> durante a simbiose do *Bradyrhizobium-caupi*.

**Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*, co-infecção, RPCP.

**ABSTRACT.** Strains of *Paenibacillus* promoters of the specific nodulation in the symbiosis *Bradyrhizobium-caupi*. The effect of *Paenibacillus* and *Bacillus* (Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR) strains on the symbiosis of the caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] with *Bradyrhizobium* sp. was studied in vases of Leonard. The caupi cultivar used was IPA-205. The plants were irrigated with an N-Free nutrient solution. The inoculations with PGPR promoted a better growth of the root in relation to the co-inoculations, as the S21 strain of *P. polymyxa* which was superior (70%) to the control (not inoculated). The PGPR increased the specific nodulation in the co-inoculated plants, evidenced by the positive correlation with the specific nitrogen accumulated. Indirect and direct effects on the specific nodulation were shown by the significant decrease of root growth (40%) and non-significant increase in the number of nodules (46%) in the Loutit (L) strain of *P. polymyxa* and LBF-410 strain of *P. macerans*. The PGPR, which stimulated the nodulation, can promote a better fixation of N<sub>2</sub> during the symbiosis between *Bradyrhizobium* and caupi.

**Key words:** *Vigna unguiculata*, co-infection, PGPR.

## Introdução

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma das leguminosas graníferas mais extensamente adaptada, versátil e nutritiva. No Brasil, ela é cultivada, predominantemente, na região Nordeste, representando uma fonte alternativa de proteína. Por associar-se a bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, obtém o nitrogênio por simbiose, processo fisiológico importante, que é explorado para obter aumento no rendimento de grão por uma maneira ecológica e economicamente sustentável. Avanços no melhoramento das plantas e no conhecimento da

relação solo-rizóbio-planta, para o aumento da fixação simbiótica do N<sub>2</sub>, estão sendo procurados constantemente. Uma estratégia adicional vem sendo conduzida com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) e de leguminosas de importância agrícola (Figueiredo *et al.*, 2001; Vessey, 2003). As RPCP são bactérias benéficas que habitam o ecossistema do solo (Glick, 1995) e afetam positivamente o crescimento das plantas, por mecanismos diretos ou indiretos (Kloepper *et al.*, 1980).

Sementes inoculadas com *Pseudomonas putia* induziram aumento na nodulação, na atividade de redução do C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> e no peso de raiz em plantas de

lentilhas (*Lens esculenta* Moench) (Chanway et al., 1989). O aumento da nodulação das plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.) mediado por *P. fluorescens* deveu-se a um aumento da produção de flavonóides (Andrade et al., 1998). *Bacillus cereus* UW85 promoveu um aumento no crescimento das raízes e da parte aérea das plantas e na quantidade de N acumulada, assim como na nodulação total das plantas. Entretanto, nenhum efeito na nodulação específica, na matéria seca média dos nódulos e na atividade da nitrogenase foi observado para a soja (Vessey e Buss, 2002). A co-inoculação de *Rhizobium etli* com *Paenibacillus polymyxa* nas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) aumentou a densidade do rizóbio na superfície da raiz, o número de nódulos e as raízes laterais dessas plantas (Petersen et al., 1996). A co-inoculação da *R. tropici* CIAT899 com *Bacillus* sp. CECT450 teve um efeito positivo no número e na matéria seca dos nódulos, bem como na matéria seca da raiz e na parte aérea das plantas de feijão (Camacho et al. 2001). Sindhu et al. (2002) indicaram que *Bacillus* sp. co-inoculado com *Bradyrhizobium* sp. efetiva resultou em melhoria na nodulação e no crescimento das plantas de grama verde (*Vigna radiate* [L.] Wilzeck.).

Os estímulos das RPCP têm sido associados aos seguintes mecanismos: (1) ao balanço de hormônios na leguminosa hospedeira; (2) ao aumento de nutrientes minerais solubilizados; e (3) ao antagonismo contra patógenos das plantas (Glick, 1995). A produção do fito-hormônio ácido indol-3-acético (IAA) tem sido relatada em estirpes de *Bacillus* sp. e associada a um estímulo na nodulação no feijão (Srinivasan et al., 1996). Várias RPCP que têm efeitos positivos no crescimento da raiz e/ou da parte aérea da soja foram produtoras de IAA ou 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC), entretanto nenhum efeito positivo foi observado na nodulação (Cattelan et al., 1999). O estímulo mediado por *Azospirillum brasilense* na nodulação do feijão, realizado pelo rizóbio, foi associado ao aumento da produção de flavonóides (Lambrecht et al., 2000).

Muitas espécies de rizóbio produzem IAA e muitos estudos indicam que mudanças nas concentrações endógenas de auxinas são pré-requisitos para a organogênese do nódulo (Lambrecht et al., 2000). Compostos semelhantes à citoquinina foram produzidos e metabolizados em culturas de *P. polymyxa* para as fases de crescimento estacionária e logarítmica, respectivamente (Timmusk et al., 1999). Bacilos RPCP efetivos com atividade da ACC deminase foram relatados por

Ghosh et al. (2003). Segundo Ferguson e Mathesius (2003), uma relação auxina/citoquinina pode ser importante para regular o número de nódulos. Em rizóbio, os fatores Nod regulam os níveis de auxina e reduzem a relação auxina/citoquinina na planta, devido à síntese ou à liberação induzida de inibidores do transporte (etileno e flavonóides) de auxina endógena (Lambrecht et al., 2000). O objetivo deste estudo foi o de investigar os efeitos de linhagens de *Paenibacillus* e de *Bacillus* na simbiose entre *Bradyrhizobium* e caupi.

## Material e métodos

Os reagentes utilizados foram obtidos da Vetec Química Fina Ltda. (Rio Janeiro, Brasil) e da Sigma-Aldrich-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, EUA). Sementes do caupi [*V. unguiculata* (L.) Walp.] cv. IPA-205 foram cedidas pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA (Recife-Brasil). As estirpes de *Bradyrhizobium*, de *Bacillus* e de *Paenibacillus* foram obtidas de diferentes coleções e estão listadas na Tabela 1, junto com algumas de suas características. Neste estudo, as estirpes de *Bacillus* e de *Paenibacillus* foram chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de planta (RPCP).

**Tabela 1.** Estirpes de *Bradyrhizobium*, *Bacillus* e *Paenibacillus* estudadas neste trabalho.

Espécies estirpe	Origem	Aspecto	Referência ou fonte
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BR2001	<i>Crotalaria juncea</i> L.	nif <sup>+</sup>	CNPAB/Embrapa-Brasil
<i>Bacillus pumilus</i> 65(E)180	<i>Atriplex nummularia</i> L. (folha), Pernambuco-Brasil.	-	Miranda (2001)
<i>Paenibacillus macerans</i> LBF-410	Solo	-	Fiocruz-Brasil
<i>Paenibacillus durus</i> P3E30	Raízes de trigo; Paraná-Brasil.	nif <sup>+</sup>	Seldin (2004)
P3L5	Raízes de trigo; Paraná-Brasil.	nif <sup>+</sup>	Seldin (2004)
RBN4	Raízes de plantas de banana; Rio de Janeiro-Brasil.	nif <sup>+</sup>	Seldin (2004)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> S21	Solo de Seropédica, RJ-Brasil	nif <sup>+</sup>	Seldin et al. (1983)
Loutit (L)	Solo de pastagens: Otago Nova Zelândia.	nif <sup>+</sup>	Line e Loutit (1971)

A estirpe de *Bradyrhizobium*, BR2001, foi multiplicada rotineiramente em caldo de extrato de levedura-manitol (Vincent, 1970) à temperatura de 28°C. As estirpes de *Bacillus* e de *Paenibacillus* foram multiplicadas, respectivamente, em caldos de trypticase

soy broth (Seldin *et al.*, 1984) e de glucose broth (Seldin *et al.*, 1983) à temperatura de 32°C. Sempre que necessário, 1,5% de ágar (p/v) foi adicionado para obter meios sólidos. Na preparação dos inoculantes, essas estirpes foram purificadas e, então, repicadas em meios específicos. As estirpes foram cultivadas em 25 mL de meio líquido (250 rpm; 28 ou 32°C) durante 5 dias, 24 e 48 horas para as estirpes de *Bradyrhizobium*, *Bacillus* e *Paenibacillus*, respectivamente, e armazenadas a 4°C. O número de unidades formadoras de colônia (u.f.c.) foi avaliado pela contagem direta em câmara de Neubauer (Hirschmann Techcolor – 0,10 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup>). Para obter a densidade formadora de colônia adequada, os inóculos foram diluídos em meio específico.

Sementes sadias maduras da cv. IPA-205 foram selecionadas e imersas em solução de etanol (95%, v/v, por 90 segundos), esterilizadas com solução de NaOCl (1% Cl<sup>-</sup> disponível por 2,5 minutos) e lavadas com água destilada estéril (7x). As sementes, superficialmente esterilizadas, foram distribuídas assepticamente em conjuntos de vaso do tipo Leonard (5 sementes por vaso) contendo areia lavada (1,2 kg), com pH corrigido para 6,8 e autoclavados por 60 minutos à temperatura de 120°C a 101 kPa. Em seguida, as inoculações foram realizadas e 300 mL de solução esterilizada de nutriente com nitrogênio mínimo foi adicionada (Silveira *et al.*, 2001). Os tratamentos testados foram: (G<sub>1</sub>) co-inoculação com 2 mL da suspensão bacteriana de BR2001 (10<sup>8</sup> u.f.c. semente<sup>-1</sup>) com 1 mL de RPCP (10<sup>7</sup> u.f.c. semente<sup>-1</sup>); (G<sub>2</sub>) inoculação de 1 mL de RPCP (10<sup>7</sup> u.f.c. semente<sup>-1</sup>). Como controles, foram usados tratamentos inoculados apenas com 1 mL de suspensão bacteriana de BR2001 (10<sup>8</sup> u.f.c. semente<sup>-1</sup>) e sem inoculação. Esses tratamentos foram incluídos para a comparação dentro dos grupos dos G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, respectivamente.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com luz solar, cuja temperatura (31 ± 3°C) e umidade relativa (65 ± 15%) foram controladas. Uma semana após semeadura, foram deixadas duas plantas por vaso. Durante as primeiras duas semanas de cultivo, todos os vasos receberam solução nutriente (Silveira *et al.*, 2001) estéril com mínimo de nitrogênio 1 mM N a partir de uma solução molar de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e, em seguida, foi utilizada solução nutriente estéril sem nitrogênio. Ambas as soluções foram renovadas a cada 4 dias. Após 45 dias de crescimento das plantas, o número de nódulos foi avaliado, juntamente com a matéria seca dos nódulos, da raiz e da parte aérea, as quais foram determinadas gravimetricamente, a partir da biomassa seca sob fluxo de ar a 65°C por 72 horas. Para a determinação do N total, a matéria seca da

parte aérea de cada planta foi moída e uma alíquota de um grama foi analisada, baseado no método de Kjeldahl (Bremer, 1965). Outras avaliações foram: relação da matéria seca da parte aérea (quantidade de N acumulado) com a matéria seca da raiz; a matéria seca média dos nódulos e a nodulação específica (Malavolta, 1980; Malavolta *et al.*, 1997).

O experimento foi realizado de acordo com um desenho em bloco completo casualizado com 3 repetições. A análise estatística foi conduzida usando o software Statsoft (Statsoft Inc., Tulsa) e os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelo teste de F. O erro padrão (p < 0,05) foi estimado e a comparação das médias dos tratamentos foi feita pelo teste de Tukey.

## Resultados e discussão

Os resultados da análise de variância estão na Tabela 2. O contraste [F(G<sub>1</sub> vs G<sub>2</sub>)] entre a co-inoculação (BR2001 + RPCP) e a inoculação (RPCP) indicou que existem efeitos significativos (p < 0,01) entre esses dois grupos de tratamentos em todas as variáveis analisadas. No grupo de co-inoculação [F(G<sub>1</sub>)], entretanto, foram detectados efeitos significativos para o rendimento da matéria seca da raiz (MSR), o nitrogênio acumulado (Nac) e as relações da matéria seca da parte aérea (MSPA/MSR) e do nitrogênio acumulado (Nac/MSR) com a matéria seca da raiz. No grupo de inoculação [F(G<sub>2</sub>)], o efeito significativo (p < 0,01) foi alcançado no rendimento de MSR. A comparação das médias mostra que as plantas de caupi do grupo co-inoculado (G<sub>1</sub>) apresentaram rendimento médio superior de MSPA (12x), de MSPA/MSR (16x), de Nac (52x) e de Nac/MSR (63x), em comparação com o grupo inoculado (G<sub>2</sub>). As plantas do grupo inoculado, entretanto, tiveram o rendimento de MSR médio significativamente superior (0,16x) ao obtido pelo grupo co-inoculado.

**Tabela 2.** Efeitos da co-inoculação de *Bradyrhizobium* sp. BR2001 com RPCP (G<sub>1</sub>) e inoculação com RPCP (G<sub>2</sub>) nos parâmetros de crescimento e nitrogênio acumulado no caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv. IPA-205: análise da variância e médias (24 repetições) dos tratamentos. As plantas (45 dias) foram cultivadas em vaso de Leonard.

Grupos de tratamentos	MSPA <sup>a</sup> g vaso <sup>-1</sup>	MSR <sup>b</sup> g vaso <sup>-1</sup>	MSPA/MSR <sup>c</sup> g MSPA g MSR <sup>-1</sup>	Nac <sup>d</sup> mg N vaso <sup>-1</sup>	Nac/MSR <sup>e</sup> mg N g MSR <sup>-1</sup>
F (G <sub>1</sub> vs, G <sub>2</sub> )	627 **	12,5 **	629 **	817 **	520 **
F (G <sub>1</sub> )	1,35 <sup>ns</sup>	2,95 **	7,34 **	2,48 **	5,10 **
F (G <sub>2</sub> )	0,04 <sup>ns</sup>	2,47 **	0,02 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>
BR2001 + RPCP (G <sub>1</sub> )	6,41 A	1,00 B	6,68 A	253,4 A	264,6 A
RPCP (G <sub>2</sub> )	0,53 B	1,19 A	0,42 B	4,7 B	4,1 B
CV (%)	23,6	17,2	24,4	23,4	29,4

<sup>a</sup>Matéria seca da parte aérea e <sup>b</sup> da raiz; <sup>c</sup> relação da MSPA/MSR; <sup>d</sup> nitrogênio acumulado e <sup>e</sup> relação Nac/MSR. <sup>ns</sup>Não-significativo, \*\*significativo em nível de 0,01 pelo teste F. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste F, CV é coeficiente de variância.

A comparação das médias entre os tratamentos de co-inoculação (Tabela 3) indicou que a estirpe Loutit (L) determinou um rendimento de MSR inferior (0,68 g vaso<sup>-1</sup>) ao tratamento controle (1,27 g vaso<sup>-1</sup>). Os demais tratamentos apresentaram valores intermediários de rendimento de MSR, não diferindo dos dois tratamentos previamente mencionados. Entretanto caupi co-inoculado com a estirpe Loutit (L) mostrou uma relação de MSPA/MSR superior aos tratamentos restantes, com exceção para plantas co-inoculadas com a estirpe LBF-410. Nos tratamentos controle e co-inoculados com P3L5, foi obtida uma menor relação de MSPA/MSR, não diferindo, contudo, daquelas plantas co-inoculadas com as estirpes P3E30, 65(E)180, S21 e RBN4. Estes últimos tratamentos não diferenciaram do tratamento co-inoculado com a estirpe LBF-410.

**Tabela 3.** Efeito da co-inoculação *Bradyrhizobium* sp., BR2001 com diferentes RPCP (G<sub>1</sub>) nos parâmetros de crescimento e de nitrogênio do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv., IPA-205: análise da variância e médias (3 repetições) dos tratamentos. As plantas (45 dias) foram cultivadas em vaso de Leonard.

Tratamentos (G <sub>1</sub> )	MSPA <sup>a</sup> g MSPA vaso <sup>-1</sup>	MSR <sup>b</sup> g MSR vaso <sup>-1</sup>	MSPA/MSR <sup>c</sup> g MSPA g MSR <sup>-1</sup>	Nac <sup>d</sup> mg N vaso <sup>-1</sup>	Nac/MSR mg N g MSR <sup>-1</sup>
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR-2001)- Controle	7,24	1,27 A	5,70 C	307,2 A	243,4 B
<i>Bacillus pumilus</i> 65(E)180	6,83	1,02 AB	6,73 BC	273,4 AB	268,8 AB
<i>Paenibacillus polymyxa</i> Loutit (L.)	6,25	0,68 B	9,21 A	250,5 AB	367,9 A
<i>Paenibacillus polymyxa</i> S21	6,17	0,99 AB	6,28 BC	224,2 B	230,9 B
<i>Paenibacillus durus</i> P3E30	6,74	1,13 AB	6,22 BC	256,2 AB	237,5 B
<i>Paenibacillus durus</i> P3L5	5,44	1,12 AB	4,91 C	221,7 B	202,0 B
<i>Paenibacillus durus</i> RBN4	6,11	0,96 AB	6,40 BC	248,9 AB	260,6 B
<i>Paenibacillus macerans</i> LBF-410	6,48	0,81 AB	8,04 AB	244,9 AB	305,7 AB
F (G <sub>2</sub> )	1,35 <sup>ns</sup>	2,95 <sup>**</sup>	7,34 <sup>**</sup>	2,48 <sup>**</sup>	5,10 <sup>**</sup>
CV (%)	23,6	17,2	24,4	23,4	29,4

<sup>a</sup>Matéria seca da parte aérea e da <sup>b</sup>raiz; <sup>c</sup>relação da MSPA/MSR; <sup>d</sup>nitrogênio acumulado e <sup>e</sup>relação Nac/MSR. <sup>ns</sup>Não-significativo, <sup>\*\*</sup>significativo em nível de 0,01 pelo teste F. Na coluna, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste de Tukey, CV é coeficiente de variância.

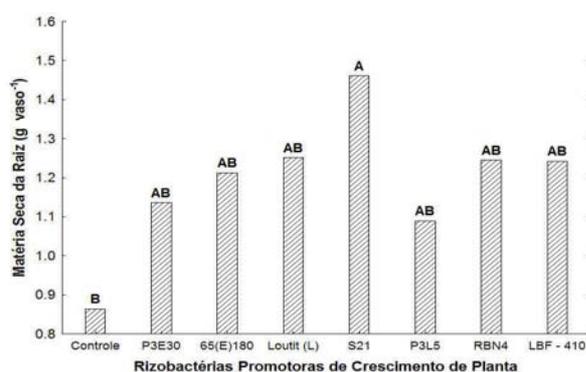
Em relação ao nitrogênio acumulado, a co-inoculação com as estirpes S21 e P3L5 induziram plantas com nível inferior (< 225 mg N vaso<sup>-1</sup>) daquele que foi alcançado no tratamento controle (307 mg N vaso<sup>-1</sup>). Caupi co-inoculado com as estirpes P3E30, 65(E)180, Loutit (L), RBN4 e LBF-410 apresentou níveis intermediários de Nac (244 – 273 mg N vaso<sup>-1</sup>), não diferindo, porém, daqueles alcançados nas plantas co-inoculadas com as estirpes S21, P3L5 e com o tratamento controle. A relação Nac/MSR mostrou que a co-inoculação com Loutit (L) foi superior (368 mg N g<sup>-1</sup>) aos tratamentos controle, P3E30, S21, P3L5 e RBN4 (< 261 mg N g<sup>-1</sup>).

As co-inoculações com as estirpes 65(E)180 e com LBF-410 induziram uma relação Nac/MSR com valor intermediário, não foram, todavia, diferentes dos tratamentos previamente mencionados.

Esses resultados indicam que existem limitações dependentes da RPCP para fixação do N<sub>2</sub> e para crescimento das plantas. Há, entretanto, favoráveis estirpes RPCP ou "*Bacillus-helper*" para essa associação simbiótica. Apesar de os rendimentos de MSPA das plantas não serem diferentes estatisticamente, as diferenças entre as médias parecem ter significado biológico. Os rendimentos de MSPA das plantas de caupi no tratamento controle tendem a ser superiores aos rendimentos obtidos nos tratamentos co-inoculados com RPCP (Tabela 3). A demanda de energia das bactérias, em termos de carboidratos (fonte da planta), pode ter sido superior em tratamentos co-inoculados. Os resultados de Nac dão indícios da fixação do N<sub>2</sub> na dependência dos efeitos de *Bradyrhizobium* e das possíveis RPCP. As plantas inoculadas com a estirpe BR2001 obtiveram os níveis mais elevados de Nac. As co-inoculações com as estirpes S21 e P3L5, contudo, foram restritivas para Nac nas plantas. Outras co-inoculações não diferiram do tratamento controle. Para rendimentos de MSR, as co-inoculações apresentaram um efeito inibidor geral de 25%. Esse efeito foi confirmado pelo comportamento da relação MSPA/MSR nas plantas co-inoculadas com as estirpes Loutit (L) e LBF-410. A inibição do crescimento da raiz, porém, não apresentou impacto na fixação simbiótica do N<sub>2</sub> no caupi. As eficiências de Nac (baseadas em MSR) ou a relação de Nac/MSR confirmam essa inferência e indicam a estirpe Loutit (L) como a estirpe RPCP favorável para a simbiose BR2001-caupi.

Os rendimentos das MSR no caupi inoculado com RPCPs (G<sub>2</sub>) são apresentados na Figura 1. A estirpe S21 mostrou ser superior (70%), quanto ao rendimento de MSR (1,46 g vaso<sup>-1</sup>), ao tratamento controle (0,86 g vaso<sup>-1</sup>). As inoculações com as demais RPCP induziram rendimentos intermediários de MSR sem se diferenciarem dos tratamentos anteriormente mencionados. Para as plantas cultivadas em meio limitado de N, a inoculação com bacilos tem mostrado diminuição do crescimento das raízes de soja e de grama verde (Camacho et al., 2001; Sindhu et al., 2002), entretanto um aumento do crescimento das raízes foi observado em canola (*Brassica campestris*) (Ghosh et al., 2003). No presente estudo, a natureza promotora de crescimento de raiz no caupi da maioria dos Bacilos testados é estabelecida. A ausência de patógenos e de limitação de nutriente (à exceção do N) contribuem para inferir o mecanismo de ação direta dessas RPCP.

Em geral, espera-se que a provável atividade de fixação de  $N_2$  das RPCPs (Tabela 1) tenha pequenos ou não detectáveis efeitos no crescimento de plantas (Vessey, 2003). Ambas as fontes limitadas de N, entretanto, permitem a manutenção das plântulas do caupi. Nessas circunstâncias, a produção de auxinas pelas bactérias e plantas, associada a uma atividade bacteriana da deaminase ACC, pode estar contribuindo para a reciclagem do N (entre plantas e bactérias) e, conseqüentemente, para o aparecimento do fenótipo observado na raiz (rendimentos elevados de MSR). Esses dois processos bioquímicos estão conectados para diminuir a produção do etileno no tecido da raiz (Glick *et al.*, 1998; Lambrecht *et al.*, 2000; Ferguson e Mathesius, 2003) e para induzir um maior crescimento das raízes (Glick *et al.*, 1998). A produção de ACC, a partir das raízes das plantas, fornece à bactéria uma fonte única de N (Glick *et al.*, 1998). Bacilos com ACC deaminase têm sido descritos (Ghosh *et al.*, 2003). Acrescente-se que a produção de citoquinina na raiz das plantas é dependente da biossíntese de purinas e, em geral, está positivamente correlacionada com a disponibilidade do N (Fei e Vessey, 2003). Na condição do experimento desenvolvido nesse trabalho, é provável que não ocorra um favorecimento para a produção das citoquininas. A promoção de crescimento da raiz de caupi induzida pela estirpe S21 pode ser um fator importante para a planta superar o estresse provisório de N, ganhando acesso ao um volume maior de solo a ser explorado. Experimentos direcionados para a síntese de auxinas e ACC deaminase pelas RPCP consideradas neste estudo poderão contribuir para elucidar o comportamento das plantas de caupi.



**Figura 1.** Efeito da inoculação ( $G_2$ ) com diferentes rizobactérias promotoras de crescimento de planta (RPCP) na produção de matéria seca de raiz em plantas de caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv. IPA-205: Médias (3 repetições) seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. As plantas (45 dias) foram cultivadas em vaso de Leonard.

Os tratamentos de co-inoculação ( $G_1$ ), entretanto, resultaram em menores rendimentos de

MSR. Os rendimentos de MSR nas plantas inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR2001) e co-inoculadas com BR2001 + Loutit (L) renderam 1,27 e 0,68 g vaso<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 3). Baseado na hipótese de controle hormonal, esses resultados podem indicar que quantidades ou relações diferentes de hormônios de planta foram produzidas nas raízes de caupi nos tratamentos inoculado e co-inoculado. A inoculação com *Bradyrhizobium* pode ter favorecido um aumento no nível de auxina ou uma baixa na relação citoquinina/auxina, o que promove o crescimento de raiz (Lambrecht *et al.*, 2000). Nos tratamentos co-inoculados, as fontes de N (fixação do  $N_2$ ) e de C (fotossíntese) não são limitantes para os organismos envolvidos. As produções de auxinas e de citoquininas da planta e das bactérias podem ter aumentado, em especial, a citoquinina de origem RPCP. Adicionalmente, é provável que a disponibilidade de N não promova a produção de ACC deaminase bacteriana ou, então, a atividade dessa enzima tenha um baixo impacto na produção de etileno, a qual foi amplificada pela produção aumentada de citoquinina. Nesse contexto, a produção de etileno (a relação citoquinina/auxina) pode ter sido estimulada (aumentada), causando o aparecimento dos fenótipos de raízes curtas ou com menores rendimentos de MSR, como previamente notificado (Lorteau *et al.*, 2001).

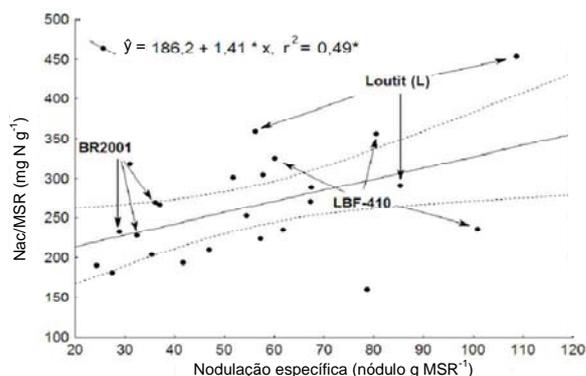
Entre os parâmetros de nodulação avaliados, houve efeitos significativos (Tabela 4) no número e na matéria seca média dos nódulos (ambos para  $p < 0,05$ ) e no número de nódulos em relação à MSR ou nodulação específica ( $p < 0,01$ ). A matéria seca total dos nódulos não mostrou efeitos de tratamentos. A comparação das médias dos tratamentos para número e matéria seca média de nódulos, entretanto, não foi diferente pelo teste de Tukey. Os resultados para nodulação específica, todavia, mostraram que a estirpe Loutit (L) estimulou a nodulação de caupi pela estirpe BR2001. O rendimento da nodulação específica das plantas co-inoculadas com Loutit (L) foi significativamente superior (84 nódulo  $mg^{-1}$  MSR<sup>-1</sup>) ao observado nos tratamentos controle (BR2001), P3E30, 65(E)180 e S21 ( $< 52$  nódulo  $mg^{-1}$  MSR<sup>-1</sup>). O estímulo induzido na nodulação pela estirpe LBF-410 (81 nódulo  $mg^{-1}$  MSR<sup>-1</sup>) não foi diferente dos induzidos pela estirpe Loutit (L) e pelas estirpes 65(E)180, S21, P3L5 e RBN4. As estirpes P3E30, 65(E)180, S21, P3L5 e RBN4 induziram estímulos na nodulação, porém esses estímulos não diferiram daqueles observados para o tratamento controle. O estudo de correlação de variáveis mostrou haver uma relação linear positiva e significativa entre a

nodulação específica e a Nac/MSR ( $y = 186,2 + 1,41x$ ;  $r^2 = 0,49^*$ ). Isso sugere que há benefícios na fixação do  $N_2$  em caupi pelo estímulo da nodulação específica realizada pela estirpe BR2001, a partir da inoculação com RPCP, principalmente com as estirpes Loutit (L) e LBF-410 (Figura 2).

**Tabela 4.** Efeito da co-inoculação *Bradyrhizobium* sp. BR2001 com diferentes RPCP ( $G_1$ ) nos parâmetros de nodulação do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv. IPA-205: análise da variância e médias (3 repetições) dos tratamentos. As plantas (45 dias) foram cultivadas em vaso de Leonard.

Tratamentos ( $G_1$ )	NÓDULOS			Número/MSR
	Número Nódulo vaso <sup>-1</sup>	MS <sub>total</sub> g MS <sub>seca</sub> vaso <sup>-1</sup>	MS Mg nódulo <sup>-1</sup>	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR-2001)-Controle	41,3	0,38	9,43	32,5 C
<i>Bacillus pumilus</i> 65(E)180	53,0	0,32	6,46	52,2 BC
<i>Paenibacillus Polymyxa</i> Loutit (L)	55,7	0,31	5,45	83,5 A
<i>Paenibacillus polymyxa</i> S21	41,0	0,35	8,90	42,1 BC
<i>Paenibacillus dumus</i> P3L5	63,0	0,29	4,75	58,4 ABC
<i>Paenibacillus dumus</i> RBN4	61,3	0,34	5,55	64,1 ABC
<i>Paenibacillus dumus</i> P3E30	34,0	0,29	9,29	30,3 C
<i>Paenibacillus Macceraans</i> LBF-410	65,3	0,31	5,02	80,6 AB
F ( $G_1$ )	2,79 *	0,87 <sup>ns</sup>	2,86 *	5,94 **
CV (%)	11,8	17,9	30,1	25,8

MS(R) e matéria seca (da raiz). <sup>ns</sup> Não-significativo, \*\* significativo em nível de 0,01 e de \* 0,05 pelo teste F. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. CV é coeficiente de variância. O número de nódulos foi transformado pela  $\sqrt{(x+1)^{0,5}}$  para análise da variância.



**Figura 2.** Correlação entre o nitrogênio acumulado (Nac) e a nodulação específica (em relação à matéria seca de raiz) na simbiose do *Bradyrhizobium* BR2001 com o caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv. IPA-205 sob efeito de diferentes rizobactérias promotoras de crescimento de planta (RPCP). As plantas foram cultivadas (45 dias) em vaso de Leonard. Os tratamentos controle (inoculação com BR2001) e com as efetivas RPCP (Loutit (L) e LBF-410) estão assinalados.

Embora tenham sido observadas diferenças significativas nos parâmetros de nodulação pelo teste F, as comparações das médias para o número e matéria seca dos nódulos não foram

significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), provavelmente devido à falta de homogeneidade de variância entre as repetições dos tratamentos (dados não-mostrados). Isso resulta em uma superestimação da variância residual (referência para o teste dos efeitos), não representando um erro aleatório experimental verdadeiro. Um dos fatores que pode contribuir para isso são as variações não-homogêneas no número e na matéria seca dos nódulos na simbiose BR2001-caupi induzidos diferentemente pelas estirpes de RPCP testadas. A variação genética existente na cultivar IPA205 para reconhecer estirpes de RPCP (de diferentes espécies) obtidas de plantas hospedeiras e áreas geográficas diferentes (Tabela 1) pode ser um fator de variação não-controlado no presente estudo. Essa constatação demonstra o potencial disponível em termo de nodulação a ser explorado pela seleção de estirpes estáveis/específicas de RPCP. Uma variância não-homogênea tem sido observada em parâmetros que avaliam a interação rizóbio x leguminosa, tornando complexa a seleção de rizóbios e justificando a inclusão dos parâmetros relacionados à nodulação e à fixação de  $N_2$  nos programas de melhoramentos de plantas leguminosas (Carvalho, 2003; Silva, 2003).

Nesse sentido, ressaltamos que, embora o resultado da análise para números de nódulos não tenha apresentado diferença estatística, a diferença média de 46% entre a inoculação com BR2001 e a co-inoculação com a Loutit (L) e a LBF-410 sugere um possível significado biológico (Tabela 4). Entretanto, na nodulação específica, foram detectados efeitos significativos das co-inoculações com as RPCP. O fato de a nodulação específica ter aumentado indica que as RPCP, em especial as estirpes Loutit (L) e LBF-410, estimulam a simbiose em caupi. Isso sugere haver efeitos indiretos e diretos na nodulação pela diminuição do crescimento das raízes e pelo aumento do número de sítios com infecção bem sucedida, respectivamente. O estímulo na nodulação de caupi, mediado aqui pelas RPCP, é diferente do observado para distintas espécies de RPCP em soja (Lambrecht et al., 2000; Vessey e Buss, 2002), feijão (German et al., 2000) e ervilha (Cooper e Long, 1994), e, em especial, em bacilos analisados por Petersen et al. (1996).

Alguns relatos da literatura podem direcionar futuros estudos que ajudem a explicar o comportamento acima descrito. Os bacilos estimulam o aumento da densidade de rizóbio e da nodulação, quando coexistem na rizosfera de plantas de feijão (Petersen et al., 1996). Os fatores Nod, que são produzidos pelos rizóbios em resposta aos flavonóides derivados das plantas hospedeiras, atuam

como inibidores do transporte das auxinas (Lambrecht *et al.*, 2000). A aplicação de IAA em concentrações na faixa de  $10^{-9}$  –  $10^{-6}$  M, no entanto, não melhora significativamente a nodulação em ervilha (Fei e Vessey, 2003). A produção de citoquinina foi observada em culturas de *P. polymyxa* (Timmusk *et al.*, 1999). A introdução de um plasmídeo com o gene da isopentenyl transferase (necessária para a biossíntese de zeatina) em mutantes de rizóbio Nod<sup>-</sup> restaurou parcialmente esse fenótipo, pela indução de pseudonódulos em plantas de feijão (Cooper e Long, 1994). As citoquininas são também importantes na ativação de vários genes codificadores de nodulinas considerados precoces (Ghosh *et al.*, 2003). A aplicação de citoquinina exógena em raízes em baixa/elevada concentração ( $10^{-9}/10^{-8}$  M) estimulou/inibiu a nodulação total e específica em plantas de ervilhas (Fei e Vessey, 2003) e de trevo branco inoculadas (Fei e Vessey, 2004), respectivamente, com *R. leguminosarum* bv. *viciae* e bv. *trifolii*. Entretanto a concentração muito elevada ( $>10^{-5}$  M) de citoquinina inibiu fortemente a nodulação e o crescimento da raiz e estimulou a produção endógena de etileno em raízes de plantas de ervilha (Lorteau *et al.*, 2001). A inibição do crescimento da raiz pela citoquinina foi induzida pelos inibidores da síntese/sensores do etileno (AVG<sup>1</sup>/Ag<sup>+</sup>) em *Lotus japonicus* (Wopereis *et al.*, 2000). A síntese de rizobiotoxinas (análogos de AVG) por *B. elkanii* tem sido observada, sugerindo-se melhora na competitividade e na nodulação de várias leguminosas (Ma *et al.*, 2002). A exposição intermitente de ervilha inoculada com níveis muito altos de citoquinina mostrou inibir a nodulação, sem, contudo, inibir o desenvolvimento dos nódulos iniciados (Fei e Vessey, 2003). A aplicação de ACC e AVG, em diferentes tempos de iniciação da infecção radicular, mostrou inibir a produção de etileno na etapa anterior à iniciação da infecção e não teve efeito inibidor após a formação dos nódulos primordiais (Wang *et al.*, 2002). Diversas possíveis RPCP, que foram positivas para a produção de IAA ou de ACC desaminase, não demonstraram, todavia, ter efeito na nodulação de soja (Cattelan *et al.*, 1999).

Nesse contexto, é possível inferir que o nível de citoquinina pode ser determinante no estímulo da nodulação específica. Para a fase inicial do desenvolvimento do caupi, níveis baixos de citoquinina [sustentado pelas estirpes Loutit (L) e LBF-410] podem estar estimulando a infecção de raízes e o desenvolvimento dos nódulos, bem como o aumento da densidade rizobiana. Conforme avança o desenvolvimento do caupi, o aumento da

produção de citoquinina, associado às estirpes de *Paenibacillus*, pode justificar o retardo no crescimento das raízes, por induzir níveis de etileno inibidores. Nessa condição, o crescimento dos nódulos não é afetado e novas infecções dependem das rizobiotoxinas produzidas pelo rizóbio. A habilidade para degradar ACC pelas RPCP pode estar sendo superada pela quantidade de ACC produzida pela leguminosa que fixa N<sub>2</sub>. O estudo da produção dos hormônios (quali/quantitativo), nas co-inoculações efetivas, está em andamento, no intuito de explicar esses efeitos na nodulação específica e no crescimento de raiz em caupi. Esses benefícios foram evidentes pela correlação positiva entre a nodulação específica da Nac/MSR em plantas de caupi co-inoculadas com as RPCP.

### Conclusão

A simbiose entre *Bradyrhizobium* e caupi, juntamente com as RPCP (Loutit (L) e LBF-410, estimula a nodulação e pode promover melhor eficiência na fixação do N<sub>2</sub>

### Referências

- ANDRADE, G. *et al.* Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. *Let. Appl. Microbiol.*, Oxford, v. 26, p. 311-316, 1998.
- BREMER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. (Ed.). *Methods of soil analysis chemical and microbiological properties*. New York: Madison, 1965. cap. 3, p. 13-84.
- CAMACHO, M. *et al.* Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 47, p. 1058-1062, 2001.
- CARVALHO, F.G. *Variabilidade de isolados de estirpes de Bradyrhizobium spp. recomendadas para cultura de soja*. 2003. Tese (Doutorado)–Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- CATTELAN, A.J. *et al.* Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, Madison, v. 63, p. 1670-1680, 1999.
- CHANWAY, C.P. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria - effects on growth and nitrogen-fixation of lentil (*Lens esculenta* moench) and pea (*Pisum sativum* L.). *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, v. 21, p. 511-517, 1989.
- COOPER, J.B.; LONG, S.R. Morphogenetic rescue of *rhizobium-meliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion. *Plant Cell.*, Rockville, v. 6, p. 215-225, 1994.
- FEI, H.M.; VESSEY, J.K. Involvement of cytokinin in the stimulation of nodulation by low concentrations of ammonium in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v. 118, p. 447-455, 2003.
- FEI, H.M.; VESSEY, J.K. Further investigation of the roles of auxin and cytokinin in the NH<sub>4</sub><sup>+</sup>- induced

- stimulation of nodulation using white clover transformed with the auxin-sensitive reporter GH3:gusA. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v. 121, p. 674-681, 2004.
- FERGUSON, B.J.; MATHESIUS, U. Signaling interactions during nodule development. *Plant Growth Regul.*, Dordrecht, v. 22, p. 47-72, 2003.
- FIGUEIREDO, M.V.B. et al. *Bradyrhizobium-Bacillus* interaction on nodulation and development of cowpea. In: MEETING BRAZILIAN MICROBIOLOGY, 21., 2001, Foz do Iguaçu. *Resumos...* Foz do Iguaçu: UFPN, 2001. p. 253.
- GERMAN, M.A. et al. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. *Biol. Fert. Soils.*, Berlin, v. 32, p. 259-264, 2000.
- GHOSH, S. et al. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiol. Biochem.*, Paris, v. 41, p. 277-281, 2003.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant-growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 41, p. 109-117, 1995.
- GLICK, B.R. et al. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.*, London, v. 190, p. 63-68, 1998.
- KLOPPER, J.W. et al. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, St. Paul, v. 70, p. 1078-1082, 1980.
- LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.*, Cambridge, v. 8, p. 298-300, 2000.
- LINE, M.A.; LOUITIT, M.W. Non-symbiotic nitrogen fixing organisms from some New-Zealand tussock grassland soils. *J. Gen. Microbiol.*, London, v. 66, p. 309-318, 1971.
- LORTEAU, M.A. et al. Effects of cytokinin on ethylene production and nodulation in pea (*Pisum sativum*) cv. Sparkle. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v. 112, p. 421-428, 2001.
- MA, W.B. et al. Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 48, p. 947-954, 2002.
- MALAVOLTA, E. *Elementos de nutrição mineral de plantas*. 1. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.
- MALAVOLTA, E. et al. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2. ed. Piracicaba: Potafós, 1997.
- MIRANDA, R.C.M. *Isolamento, seleção e caracterização de bactérias halotolerantes com atividade antimicrobiana*. 2001. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.
- PETERSEN, D.J. et al. *Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium etli* populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v. 142, p. 271-276, 1996.
- SELDIN, L. (Universidade Federal do Rio de Janeiro) Personal communication, 2004.
- SELDIN, L. et al. *Bacillus* nitrogen fixers from brazilian soils. *Plant Soil.*, Dordrecht, v. 70, p. 243-255, 1983.
- SELDIN, L. et al. *Bacillus azotofixans* sp. nov. a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, D.C., v. 34, p. 451-456, 1984.
- SILVA, L.E.S.F. *Fixação do N<sub>2</sub> no caupi (Vigna unguiculata [L.] Walp.) pela interação Bradyrhizobium sp. x Glomus darwinii sob condições de estresse hídrico*. 2003. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2003.
- SILVEIRA, J.A.G. et al. N-compound accumulation and carbohydrate shortage on N fixation in drought-stressed and rewatered cowpea plants. *Spanish J. Agric. Res.*, Madrid, v. 1, n. 3, p. 65-75, 2001.
- SINDHU, S.S. et al. Enhancement of green gram nodulation and growth by *Bacillus* species. *Biol. Plant.*, Prague, v. 45, p. 117-120, 2002.
- SRINIVASAN, M. et al. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 42, p. 1006-1014, 1996.
- TIMMUSK, S. et al. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.*, Elmsford, v. 31, p. 1847-1852, 1999.
- VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.*, Dordrecht, v. 255, p. 571-586, 2003.
- VESSEY, J.K.; BUSS, T.J. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: Controlled-environment studies. *Can. J. Plant Sci.*, Ottawa, v. 82, p. 283-290, 2002.
- VINCENT, J.M. *A manual for the practical study of Rhizobium of root nodule bacteria*. 1. ed. Oxford: Blackwells, 1970.
- WANG, K.L.C. et al. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell.*, Rockville, v. 18, p. 131-151, 2002.
- WOPEREIS, J. et al. Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J.*, Oxford, v. 23, p. 97-114, 2000.

Received on April 26, 2006.

Accepted on August 08, 2006.