

## **SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium* PARA CAUPI, RESISTENTES A TEMPERATURA ELEVADA\***

**NEWTON P. STAMFORD**

Prof. Adjunto do Dep. de Agronomia da UFRPE. Bolsista do CNPq.

**CAROLINA ETIENE DE R. S. SANTOS**

Pesquisadora do Núcleo de Fixação Biológica do N<sub>2</sub> nos Trópicos da UFRPE.

Foram coletadas 67 amostras de solos representativos da região Semi-Árida, com o objetivo de isolar estirpes de *Rhizobium* sp de nódulos formados em caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp), para avaliar a resistência a temperatura elevada. Para a seleção das estirpes foi conduzido um experimento em casa de vegetação usando vasos de "Leonard" esterilizados, mantidos em regime de temperatura elevada (média 30°C, máxima 41°C). Foram usadas 30 estirpes isoladas do Semi-Árido, uma estirpe da Zona da Mata e uma estirpe importada da Austrália, comparadas com os tratamentos sem e com nitrogênio mineral. Os resultados da nodulação, da fixação do N<sub>2</sub> e do rendimento em matéria seca das plantas mostraram o alto grau de especificidade e eficiência das estirpes NFB 09, NFB 36 e NFB 114, provavelmente estirpes de eficiência excepcional. A estirpe da Zona da Mata (NFB 01) e a importada da Austrália (CB 756) mostraram-se menos eficientes, embora com resultados apenas levemente inferior ao tratamento com nitrogênio mineral. As demais estirpes não foram eficientes na simbiose com caupi em regime de temperatura elevada. Observou-se correlação significativa entre o N-total na parte aérea e o peso de nódulos, e entre o N-total e rendimento de matéria seca da parte aérea.

---

\* Trabalho realizado com recursos do Convênio FINEP/UFRPE.

## INTRODUÇÃO

O processo da nodulação é controlado geneticamente pela leguminosa e pelo *Rhizobium*, entretanto trabalhando com quatro cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) inoculadas com estirpe formadora de nódulos pretos que permite a identificação do nódulo produzido pela bactéria do inoculante, STAMFORD & NEPTUNE (1979) mostraram que a planta parece ter maior influência no mecanismo da nodulação, e que ocorre certo grau de especificidade hospedeira nesta leguminosa.

Vários trabalhos já foram conduzidos visando a interrelação de leguminosas tropicais e do *Rhizobium* com fatores do solo, principalmente com relação ao efeito da adição de adubos e de matéria orgânica, toxidez de alumínio e manganês. Alguns pesquisadores demonstraram o efeito da temperatura em leguminosas como a soja perene, (SOUTO & DÖBEREINER, 1968); soja anual GALLETTE et alii (1971); caupi (ROBERTS et alii, 1978; DOTO & WHITTINGTON, 1981) e feijão (ARRUDA et alii, 1980).

Através de cruzamentos entre variedades trazidas da Califórnia e nativas do Senegal, foram obtidas linhagens de caupi resistentes às condições de seca e de temperatura elevada (GHADERI, 1984), e no Brasil, pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) também conseguiram selecionar linhagens adaptadas às condições de temperatura elevada do Semi-Árido nordestino. Entretanto, até o presente, poucos foram os trabalhos conduzidos com o objetivo de selecionar estirpes de *Rhizobium* capazes de realizar uma simbiose eficiente em condições de temperatura elevada. No Canadá, RENNIE & KEMP (1981) estudaram o efeito da temperatura em feijão inoculado com *Rhizobium* e observaram diferenças significativas na fixação do nitrogênio, entretanto usaram temperatura variando de 10°C a 18°C. Em condições de laboratório, OKAFOR & ALEXANDER (1975) trabalhando com caupi observaram o crescimento de duas estirpes de *Rhizobium* e verificaram que uma delas chegou a apresentar crescimento até 40°C e que o crescimento máximo das duas foi a 30°C. LEE & DÖBEREINER (1982) trabalhando com siratro estudaram a tolerância de 17 estirpes de *Rhizobium* crescendo em meio de cultura em regime de temperatura média a elevada, e observaram que cinco delas foram capazes de crescer em temperatura de 40°C, embora com diminuição na atividade da nitrogenase. Estas pesquisas permitiram concluir que torna-

se importante a obtenção de estirpes eficientes na fixação do nitrogênio em regime de temperatura elevada.

O objetivo deste trabalho foi, portanto, procurar obter estirpes de *Rhizobium* sp, eficazes na fixação do nitrogênio em regime de temperatura elevada, para serem usadas como inoculante para caupi nesta condição específica.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram coletadas 67 amostras de solos representativos da região Semi-Árida do Estado de Pernambuco (Municípios de Araripina, Parnamirim, Ouricuri, Salgueiro, Serra Talhada e Arcoverde), na profundidade de vinte centímetros. Dois quilos de cada amostra foram colocados em vasos de barro, semeando-se em cada vaso, três sementes de caupi "cv. Pitiúba". Os vasos foram conduzidos para casa de vegetação de vidro onde a temperatura diurna foi controlada na faixa de 28°C a 35°C, com uso de humidificadores. Foi feita uma adubação básica com 50ppm de K, na forma de KCl e 50ppm de P, como  $\text{CaH}_2\text{PO}_4$ . Para Mg, S, B, Zn, Cu, Mo e Fe usou-se 2ml de uma solução contendo por litro:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -150,0g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -1,0g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -8,9g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -15,8g;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -7,0g;  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -20,0g; e ácido cítrico-20,0g. Passados 45 dias após a semeadura realizou-se colheita, isolando-se de cada nódulo mais bem desenvolvido, uma estirpe por vaso. As estirpes isoladas foram mantidas em óleo nujol e catalogadas na Rhizobioteca do Núcleo de Fixação Biológica do Nitrogênio nos Trópicos (NFBNT), recentemente criado na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Em seguida foi lançado um experimento em vasos de Leonard com solução nutritiva isenta de nitrogênio (VINCENT, 1970), usando 30 estirpes isoladas dos solos do Semi-Árido, uma estirpe isolada de um solo da Zona da Mata (NFB 01) e a estirpe CB 756 enviada pelo Laboratório de Microbiologia do Solo do UAPNPBS, EMBRAPA, e que é usada para inoculação de caupi na Austrália. Foram adicionados também os tratamentos sem e com adubação nitrogenada (100mg de N/vaso), na forma de uréia. O experimento foi conduzido usando o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, observando-se o critério de uniformidade na distribuição dos vasos em função da radiação solar na casa de vegetação. Utilizou-se como planta teste a mesma culti-

var do trabalho em vasos de barro para isolamento das estirpes dos solos do Semi-Árido.

A temperatura foi avaliada com o uso de termohigrógrafo, com controle através de observações feitas nos dias úteis no horário das 8 às 17 horas, usando um termômetro comum (0° a 60°C), com escala em décimos, colocado a 60cm do nível do piso, durante todo o período experimental (tabela 1).

A colheita foi procedida 42 dias após o plantio, realizado no dia 8 de novembro de 1984, obtendo-se dados de número e peso de nódulos, coloração das folhas, nitrogênio total e peso de matéria seca da parte aérea. O nitrogênio total na parte aérea foi determinado pelo método de Kjeldhal semi-micro, seguindo a metodologia descrita por BREMNER (1965).

Tabela 1 — Variação da temperatura do ar (°C) na casa de vegetação, durante o período de cultivo de caupi no verão de 1984, e na semana com temperatura mais elevada, medida com termohigrógrafo e termômetro comum a 60cm do nível do solo

| Temperatura<br>do ar | Dias do Período sob Cultivo |      |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------------|-----------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                      | 1-5                         | 6-10 | 11-15 | 16-20 | 21-25 | 26-30 | 31-35 | 36-40 | 41-42 |
| Máxima               | 37                          | 37   | 37    | 37    | 37    | 37    | 41    | 40    | 40    |
| Mínima               | 25                          | 24   | 26    | 26    | 26    | 26    | 26    | 25    | 26    |
| Média                | 29                          | 29   | 30    | 30    | 30    | 31    | 33    | 32    | 32    |

| Dias da Semana com Temperatura mais Quente |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                            | seg. | ter. | qua. | qui. | sex. | sab. | dom. |
| Máxima                                     | 37   | 41   | 41   | 39   | 38   | 40   | 41   |
| Mínima                                     | 25   | 26   | 27   | 25   | 25   | 26   | 27   |
| Média                                      | 30   | 34   | 34   | 31   | 31   | 32   | 34   |

1/ Foi observada também a variação da temperatura com termômetro comum, para controle do termohigrógrafo, com coleta de dados no horário das 8 às 17 horas, com intervalo de aproximadamente 1 hora.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nodulação, a eficiência da fixação do  $N_2$  e o rendimento em matéria seca da parte aérea foi observada em caupi-“cv. Pitiúba”, inoculada com 32 estirpes de *Rhizobium* sp, em comparação com o tratamento com adubação nitrogenada (tabelas 2 e 3), para seleção em temperatura excessiva.

A grande maioria das estirpes não mostraram ser eficientes na fixação do nitrogênio, através da observação visual de coloração das folhas e desenvolvimento da parte aérea, permanecendo até a colheita com sintomas típicos de deficiência de nitrogênio, idênticos ao tratamento controle sem nitrogênio. As estirpes NFB 01, NFB 09, NFB 21, NFB 23, NFB 36, NFB 43, NFB 114 e CB 756 a partir do vigésimo dia após a semeadura apresentaram crescimento variável, mas eficiente fixação do nitrogênio, embora com desenvolvimento da parte aérea inferior ao tratamento com adubação nitrogenada.

Aos 40 dias após o plantio as plantas inoculadas com as estirpes NFB 01, NFB 09, NFB 36, NFB 114 e CB 756 mostraram crescimento vegetativo visivelmente superior ao tratamento com adubação nitrogenada. As plantas com nitrogênio mineral, na última semana de cultivo, apresentaram coloração verde pálido nas folhas mais velhas e redução no crescimento, provavelmente por efeito da temperatura no metabolismo do nitrogênio.

As estirpes usadas na seleção para resistência a alta temperatura mostraram a ocorrência de grupos com acentuada diferença na quantidade de nitrogênio fixado, avaliado pela regressão entre o N total na planta e o peso de nódulos (figura 1). No grupo I foram incluídas as estirpes com elevada eficiência na fixação (NFB 114, NFB 36 e NFB 09); no grupo II encontram-se as estirpes NFB 01 e CB 756, com razoável fixação de nitrogênio, e no grupo III as estirpes com baixa eficiência de fixação e aquelas que não formaram nódulos na cultivar “Pitiúba”.

As estirpes NFB 36 e NFB 114 foram mais eficientes na eficiência da fixação do nitrogênio por unidade de peso nodular, sendo provavelmente estirpes excepcionais em caupi, como foi também observado por DÖBEREINER et alii (1970) em soja.

É interessante observar o comportamento das estirpes NFB 10, NFB 12 e NFB 13, que formaram poucos nódulos mas que fixaram certa quantidade de nitrogênio, indicando que o efeito da

temperatura excessiva foi na formação dos nódulos. Por outro lado, as estirpes NFB 48 e NFB 51 apresentaram razoável número de nódulos, mas baixa eficiência na fixação do nitrogênio no regime de temperatura elevada (tabelas 2 e 3). LEE & DÓBEREINER (1982) em condição de laboratório também verificaram, em siratro, resposta diferenciada das estirpes, e que só ocorreu paralização do crescimento em temperatura superior a 40°C. Estes autores concluíram que todas as estirpes cresceram melhor a 32°C, resultados estes semelhantes aos obtidos por OKAFOR & ALEXANDRE (1975) trabalhando com caupi.

Os resultados destes trabalhos preliminares demonstraram necessidade de seleção de estirpes eficientes em regime de temperatura elevada, para leguminosas com potencial de cultivo em solos de Semi-Árido.

O rendimento em matéria seca foi diretamente relacionado com a eficiência da estirpe na fixação do nitrogênio (tabela 2). Observou-se evidência do adequado suprimento de nitrogênio através da fixação, quando foram comparadas as estirpes mais eficazes com o tratamento com adição de nitrogênio mineral.

O efeito da elevada temperatura do solo no crescimento vegetativo e na produção de matéria seca da parte aérea também foi observado por MINCHIN et alii (1976) em duas cultivares de caupi, inoculadas com *Rhizobium*, evidenciando a necessidade de obtenção de estirpes resistentes a temperatura excessiva.

Tabela 2 — Efeito da inoculação com estirpes em regime de temperatura elevada na atividade da nitrogenase e na nodulação de caupi-“cv. Pitiúba”

| Estirpes | Atividade da                                    | Nodulação      |                 |
|----------|-------------------------------------------------|----------------|-----------------|
|          | Nitrogenase                                     | N.º de nódulos | Peso de nódulos |
|          | $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{planta/h}$ | —mg/planta—    | —mg/planta—     |
| NFB 01   | 43 b                                            | 51 b           | 227 a           |
| 09       | 67 a                                            | 63 b           | 263 a           |
| 10       | 0 c                                             | 23 c           | 13 c            |
| 12       | 0 c                                             | 3 c            | 7 c             |
| 13       | 0 c                                             | 2 c            | 5 c             |
| 21       | 4 c                                             | 56 b           | 57 bc           |
| 23       | 5 c                                             | 37 bc          | 133 b           |
| 25       | 1 c                                             | 28 c           | 57 bc           |
| 29       | 0 c                                             | 4 c            | 7 c             |
| 33       | 0 c                                             | 2 c            | 7 c             |
| 36       | 66 a                                            | 50 b           | 203 a           |
| 37       | 7 c                                             | 92 a           | 7 c             |
| 38       | 0 c                                             | 68 b           | 50 c            |
| 44       | 0 c                                             | 3 c            | 7 c             |
| 48       | 28 bc                                           | 76 b           | 187 b           |
| 51       | 10 c                                            | 118 a          | 103 b           |
| 114      | 83 a                                            | 50 b           | 233 a           |
| CB 756   | 45 b                                            | 52 b           | 216 a           |

1/ As demais estirpes (NFB 11, 17, 18, 19, 22, 27, 28, 34, 35, 40, 42, 52, 53, 55) não formaram nódulos na cultivar Pitiúba.

2/ Os números seguidos de letra diferente são diferentes entre si.

Tabela 3 — Efeito da inoculação com estirpes, em regime de temperatura elevada, no rendimento de matéria seca e no teor e quantidade total de nitrogênio da parte aérea de caupi — “vc. Plitiúba” comparado com adubação nitrogenada

| Estirpe         | Parte Aérea                |        | Nitrogênio<br>Acumulado |
|-----------------|----------------------------|--------|-------------------------|
|                 | Rendimento<br>Matéria Seca | Teor   |                         |
|                 | —g/planta—                 | —%—    | —mg/planta—             |
| NFB 01          | 1,00 b                     | 3,2 b  | 32 b                    |
| NFB 09          | 1,21 ab                    | 3,8 a  | 46 ab                   |
| 10              | 0,10 d                     | 1,6 c  | 16 c                    |
| 12              | 0,12 d                     | 1,7 c  | 17 c                    |
| 13              | 0,14 d                     | 1,5 c  | 15 c                    |
| 21              | 0,39 b                     | 1,7 c  | 7 c                     |
| 23              | 0,70 b                     | 3,1 b  | 22 bc                   |
| 25              | 0,26 bc                    | 3,0 b  | 9 cd                    |
| 29              | 0,11 d                     | 1,5 c  | 2 d                     |
| 33              | 0,12 d                     | 1,5 c  | 2 d                     |
| 36              | 1,58 a                     | 3,4 ab | 54 ab                   |
| 37              | 0,33 c                     | 1,9 c  | 6 cb                    |
| 38              | 0,25 c                     | 2,0 c  | 6 cd                    |
| 44              | 0,12 c                     | 1,5 c  | 2 d                     |
| 48              | 0,37 bc                    | 2,0 c  | 8 cd                    |
| 51              | 0,22 cd                    | 1,6 c  | 3 d                     |
| 114             | 1,44 a                     | 4,2 a  | 60 a                    |
| NFB 756         | 1,16 b                     | 3,0 b  | 35 b                    |
| Corn Nitrogênio | 1,00 b                     | 3,9 a  | 39 b                    |
| Sem Nitrogênio  | 0,13 d                     | 0,9 d  | 1 d                     |

1/ Os valores seguidos de letra diferente são diferentes entre si.



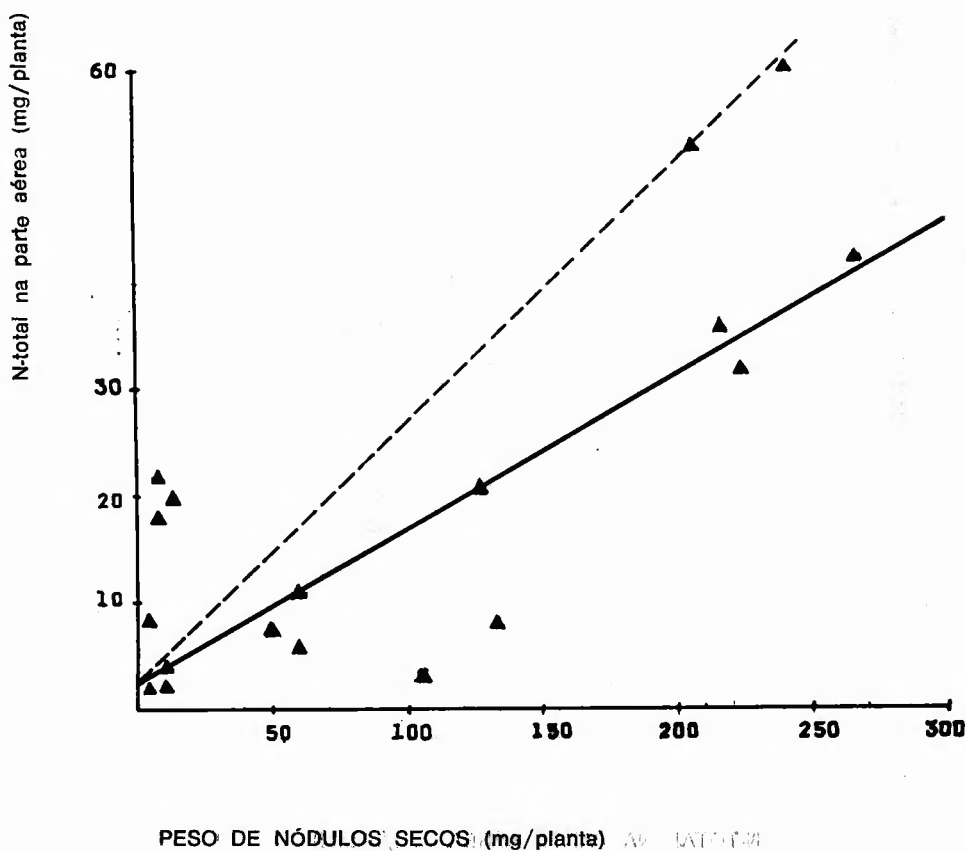


Figura 1 — Correlação do N-total na parte aérea e peso de nódulos secos, em caupi "cv. Pitiúba" inoculado com estirpes de diferentes eficiências em regime de temperatura elevada (30°C).

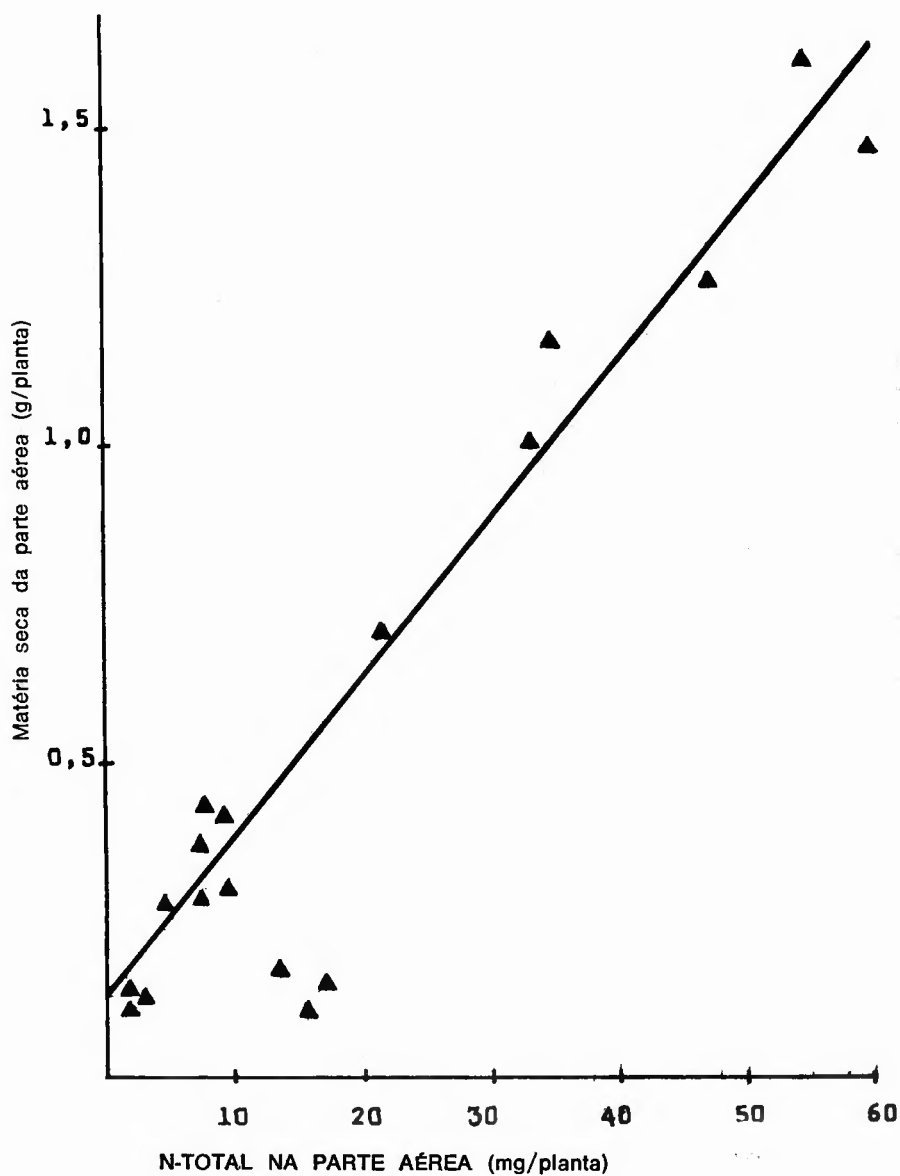


Figura 2 → Correlação entre matéria seca e N-total da parte aérea em caupi "cv Pitiúba", inoculada com 17 estirpes de *Rhizobium* sp. em regime de temperatura elevada.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- a) a temperatura elevada influenciou diferentemente a nodulação e a fixação do nitrogênio pelas estirpes usadas para inoculação de caupi;
- b) foram selecionadas estirpes de *Rhizobium* sp específicas para inoculação de caupi em regime de temperatura elevada;
- c) ocorreu correlação altamente significativa entre a quantidade de nitrogênio total fixada e o peso de matéria seca dos nódulos, e entre o N total e o rendimento da parte aérea.

## ABSTRACT

Sixty seven different soils representing a wide range of semiarid soils of the Northeast of Brazil were sampled to isolate strains of cowpea grown in clay pots. A glasshouse experiment was conducted with cowpea "cv Pitiluba", using "Leonard jars", to select rhizobia strains for efficient dinitrogen-fixing ability at excessive temperature regime. Plants were grown at excessive temperature with diurnal average of 30°C and maximum temperature 41°C, evaluated by thermohygrograph during growth period. It was used thirty semiarid strains, a "Zona da Mata" strain and an Australian strain, compared with mineral nitrogen treatment (100mg N/pot), replicated three times. Strain differed in dinitrogen-fixing ability at excessive temperature regime. Strains NFB 09, NFB 36 and NFB 114 showed best results to all parameters studied. Efficiency evaluated by the regression between N total and nodules weight recommended NFB 36 and NFB 114 to be exceptional strains. "Zona da Mata" strain (NFB 01) and Australian strain (CB 756) were of moderate efficiency showing total nitrogen amount and by matter yield quite similar to mineral nitrogen treatment. The other ones strains were inefficient in nitrogen-fixing ability. Significant correlation between N total and nodule weight and between N total and dry matter yield were observed.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ARRUDA, F. B.; TUBELIS, A.; NASCIMENTO, F. J. L. Efeito da temperatura média diária do ar na produtividade do feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 15(4):413-7, out. 1980.

- 2 — BREMNER, J. M. Total nitrogen. In: BLACK, C. A., ed. *Methods of soil analysis*; chemical and microbiological properties. Madison, American Society of Agronomy, 1965. (Agronomy, 9). Part. 2, cap. 83, p. 1149-78.
- 3 — DÖBEREINER, J.; FRANCO, A. A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 5:155-61, 1970.
- 4 — DOTO, A. L. & WHITTINGTON, W. J. Responses of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties and their hybrids to variation in day and night temperature regimes. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 97(2): 213-9, Mar., 1981.
- 5 — GALLETTI, P.; FRANCO, A. A.; AZEVEDO, H.; DÖBEREINER, J. Efeito da temperatura do solo na simbiose da soja anual. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 6:1-8, 1971.
- 6 — GHADERI, A. Developing cowpea varieties with improved yield under conditions of extreme drought and heat. *Research Highlights*, Manila, 1(1):1-4, 1984.
- 7 — GUIMARÃES, C. M.; ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. Variabilidade de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*) para resistência à seca. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, 1982. 5 p. (EMBRAPA CNPAP, 32).
- 8 — LEE, K. & DÖBEREINER, J. Effect of excessive temperatures of rhizobia growth nodulation and nitrogen fixing activity in symbiosis with siratro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 17(2):181-4, fev., 1982.
- 9 — MINCHIN, F. R.; HUXLEY, P. A.; SUMMERFIELD, R. J. Effect of root temperature on growth and seed yield in cowpea (*Vigna unguiculata*). *Expl. Agric.* 12:279-88, 1976.
- 10 — OKAFOR, N. & ALEXANDER, M. Preliminary physiological studies on cowpea rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, 7(6):405-6, Nov., 1975.
- 11 — ROBERTS, H.; SUMMERFIELDS, R. J.; MINCHIN, F. R.; KATRINE, A. S.; NDUNGURU, B. J. Effects of air temperature on seed growth and maturation in cowpea (*Vigna unguiculata*). *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 90:437-46, 1978.
- 12 — RENNIE, R. J. & KEMP, G. A. Selection for dinitrogen-fixing ability in *Phaseolus vulgaris* L. at two low temperature regimes. *Euphytica*, Wageningen, 30:87-95, 1981.
- 13 — SOUTO, S. M. & DÖBEREINER, J. Efeito do fósforo, temperatura e umidade do solo na nodulação e no desenvolvimento de duas variedades de soja perene (*Glycine javanica* L.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 3(1):215-21, 1968.

- 14 — STAMFORD, N. P. & NEPTUNE, A. M. L. Especificidade hospedeira e competição entre estirpes de *Rhizobium* sp em inoculação cruzada com quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp. *Caderno Ômega da Universidade Federal Rural de Pernambuco*, Recife, 3(1/2):25-34, jan./dez., 1979.
- 15 — VINCENT, J. M. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. Oxford, Blackwell, 1970. 164 p.

Recebido para publicação no dia 25 de julho de 1985