

**ESPECIFICIDADE HOSPEDEIRA E COMPETIÇÃO ENTRE ESTIRPES DE
Rhizobium EM INOCULAÇÃO CRUZADA COM QUATRO CULTIVARES
DE *Vigna unguiculata* (L.) Walp**

NEWTON P. STAMFORD

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

ANDRÉ M.L. NEPTUNE

Prof. Titular da Escola Superior de Agricul-
tura Luiz de Queiroz da Universidade de São
Paulo (ESALQ-USP)

Com a finalidade de estudar a especificidade hospedeira Rhizobium – Vigna unguiculata (L) Walp., e a competição entre estirpes, foi realizado um experimento em vasos de Leonard, usando quatro cultivares inoculadas com três estirpes aplicadas isoladamente e em mistura, e mais o tratamento testemunha sem inoculação. Os tratamentos foram distribuídos em blocos ao acaso, com três repetições. Os resultados mostraram que o número e peso de nódulos foram influenciados pelas estirpes, mas não pelas cultivares. Foi observada especificidade hospedeira, com a estirpe C-101 fixando mais nitrogênio com a cultivar “Cariri”, e as demais cultivares com a estirpe 5.000. A estirpe C-102 formou nódulos pretos em todas as cultivares e C-101 nas cultivares “Sempre Verde” e “Cariri”, o que permite sugerir que o caráter nódulo deve ser promovido pela planta. A regressão linear entre o N total absorvido e o peso dos nódulos mostrou duas retas distintas, uma para a cultivar “Garoto” e outra para as demais cultivares, com grande diferença entre as duas retas. Na competição entre as estirpes não observou-se efeito específico na formação dos nódulos, embora a estirpe 5000 tenha mostrado maior grau de competição na formação dos nódulos.

INTRODUÇÃO

O feijão Vigna unguiculata (L) Walp., é uma cultura antiga, originária da África (JOHNSON & RAYMOND⁶) cultivada nos trópicos e subtropicais, onde é denominada vulgarmente cowpea, feijão macáçar, feijão de corda, feijão baiano, feijão

verde. O elevado valor nutritivo desta leguminosa, sua marcante adaptação a solos com baixa fertilidade, aliada à capacidade de resistência e estiagem prolongada, foram as principais causas para a sua implantação nos países de clima tropical, onde constitui a alimentação básica na dieta humana.

Poucas pesquisas foram realizadas com esta cultura até muito recentemente, e em especial com referência à fixação do dinitrogênio e nodulação, embora devam ser encarados como de relativa importância considerando-se a economia do nitrogênio que pode advir da fixação por bactérias do gênero *Rhizobium*.

A organização das leguminosas foi proposta por FRED⁴ et alii em 20 grupos de inoculação cruzada e atualmente existem apenas seis, sendo *Vigna unguiculata* (L) Walp. incluída no grupo de inoculação cruzada cowpea, que nodula com a espécie *Rhizobium* sp (ALLEN & BALDWIN¹). Algumas leguminosas tropicais mostram-se altamente específicas, formando nódulos com estirpes homólogas, outras mostram inoculação unilateral e a maioria apresenta-se bastante promíscua formando nódulos eficientes com estirpes isoladas das demais espécies.

Com respeito à especificidade hospedeira *Rhizobium-Vigna unguiculata* (L) Walp. não há conclusões definitivas quando se considera apenas a formação de nódulos. Tem-se uma melhor visualização do quadro da relação simbiótica quando é observada a proposição de WILSON¹¹ que considera a diferenciação entre plantas sem nodulação, com nodulação ineficiente e com nodulação eficiente; ou melhor ainda, a avaliação diferenciada em excelente nodulação (75% a 100% das plantas apresentam nódulos), boa nodulação (50% a 75% das plantas estão noduladas) e nodulação fraca (cerca de 50% das plantas com nódulos).

A grande maioria das leguminosas tropicais nodulam facilmente com estirpes nativas, desde que ocorram condições satisfatórias, e mesmo quando inoculadas, apenas uma insignificante proporção dos nódulos formados são provenientes do inoculante (DOBEREINER³). A existência de um pequeno número de estirpes que produzem nódulos pretos, e que são restritas a algumas espécies de leguminosas tropicais, é uma certa compensação, pois representa diretamente uma solução para o estudo da competição entre estirpes, um dos problemas mais importantes para o sucesso da inoculação (STAMFORD⁹ et alii).

O grau de incompatibilidade *Rhizobium* hospedeiro parece ser importante no estudo da competição entre estirpes sendo necessário a realização de estudos para determinar se a bactéria ou o hospedeiro, ou a combinação de ambos é que controla o problema.

Com relação a especificidade hospedeira *Rhizobium Vigna unguiculata* (L) Walp., não consta na literatura nenhum trabalho. Deve ser salientado, também, que nada se sabe a respeito da competição entre as estirpes recomendadas para a inoculação e as existentes no solo, sendo este aspecto essencial com vistas ao estabelecimento de

uma simbiose realmente eficiente.

No presente trabalho procuramos estudar a eficiência de algumas estirpes de *Rhizobium*, de diferentes origens, na fixação do dinitrogênio cruzada com cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., e o grau de competição entre estas estirpes.

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental usado foi um fatorial 4x5, em blocos ao acaso, com 3 repetições, utilizando quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp. e cinco tratamentos com estirpes de *Rhizobium* sp (grupo cowpea) incluindo o controle sem inoculação (testemunha).

As estirpes C-101 e C-102 foram isoladas do *Centrosema pubescens* Benth., pela Dra. Johanna Dobereiner em 1965, e possuem a característica especial de produzir nódulos pretos em algumas leguminosas forrageiras tropicais (STAM FORD⁹ et alii. A estirpe 5.000, enviada pelo Dr. Eaglesham da Estação Experimental de Rothamsted, Inglaterra, é uma estirpe homóloga, que forma nódulos de coloração normal e é recomendada para inoculação de *Vigna unguiculata* (L) Walp. na região de origem.

As cultivares usadas foram "Seridó", "Sempre Verde", "Garôto" e "Cariri", obtidas na Estação Experimental do Curado (EMBRAPA-PE).

O trabalho foi conduzido em vasos de Leonard, com areia lavada e esterilizada, recebendo a solução nutritiva de Norris, modificada por Dobereiner e descrita em detalhes por STAMFORD⁸.

Foram adicionados 250 ml da solução nutritiva na parte inferior de cada vaso e 50 ml na parte superior, por ocasião do plantio. Duas semanas após a primeira aplicação foram colocados mais 200 ml da solução nutritiva, e daí em diante foi adicionado água destilada e fervida, sempre que necessário.

Antes do plantio as sementes foram esterilizadas, primeiro com álcool a 95% e logo após com HgCl₂ (1:500) e em seguida lavadas cinco vezes com água fervida.

Uma e duas semanas após o plantio foram feitos dois desbastes, deixando primeiro 5 plantas e finalmente 2 plantas, por vaso.

O inoculante foi preparado usando-se cultura líquida com o meio específico para *Rhizobium* (meio 79) mantido por 7 dias em agitador rotativo, com rotação média de 100 rotações por minuto. A inoculação foi realizada com a adição de 1 ml da cultura líquida, por planta, uma semana após a germinação.

As plantas foram colhidas 60 dias após o plantio, separando-se a parte aérea das raízes mais nódulos. De cada vaso foi colhida uma amostra de raízes mais nódulos, acondicionadas em frasco de vidro para estudo da fixação do dinitrogênio, através do processo da redução do acetileno.

Posteriormente, os nódulos foram separados das raízes e contados. A seguir, raízes e nódulos foram cuidadosamente lavados em água corrente, água destilada e água deionizada. Os nódulos, acondicionados em vidros, e as raízes e a parte aérea em sacos de papel, foram colocados em estufa para secagem a 65°C. Após a secagem foi feita a pesagem da parte aérea, raízes, nódulos pretos e normais.

Para a análise química, a parte aérea e as raízes foram previamente moídas sendo a determinação do nitrogênio realizada seguindo o método semimicro Kjeldhal, como descrito por BREMNER².

O método usado para o estudo da fixação do dinitrogênio foi a da redução do acetileno, que se baseia na capacidade do sistema enzimático nitrogenase de reduzir o acetileno a etileno (HARDY⁵ et alii) descrito detalhadamente por SUHET¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados das tabelas 1 e 2, o número e crescimento dos nódulos não apresentaram diferença significativa entre as cultivares usadas. O número de nódulos, e especialmente o peso total dos nódulos variou com as estirpes. Esta variação foi mais notante na cultivar “Garôto” inoculada com a estirpe homóloga 5.000. Esta estirpe foi mais eficaz nas cultivares “Seridó”, “Sempre Verde”, e “Garôto”. Nesta última foram produzidos nódulos extremamente grandes quando em simbiose eficiente.

É interessante observar que os níveis mais elevados de fixação do dinitrogênio foram sempre obtidos com a estirpe 5.000, o que está de acordo com o sugerido por NORRIS⁷, que considerou que a melhor forma de obtenção de estirpes de *Rhizobium* eficientes deve ser através da seleção entre isolamentos feitos na própria espécie, ou em espécies botanicamente relacionadas. Além disso, estas estirpes, quando inoculadas em leguminosas tropicais, cultivadas nestas condições climáticas, são capazes de fixar maiores quantidades de dinitrogênio.

Observou-se certa especificidade hospedeira, tendo a cultivar “Cariri”, mostrado características diferentes das demais (tabela 1). Esta cultivar fixou mais nitrogênio e apresentou maior número e peso de nódulos quando inoculada com a estirpe C-101. As cultivares “Seridó”, “Garôto” e “Sempre-Verde” mostraram comportamento semelhante na inoculação cruzada, apresentando-se com menor especificidade hospedeira (tabela 3).

Os dados apresentados na tabela 2 indicaram que as estirpes pretas produzi-

ram nódulos pretos em todas as cultivares usadas e mostraram diferenças na especificidade hospedeira, indicando que o caráter nódulo deve ser promovido pela planta. A distinção de cor nos nódulos completamente desenvolvidos foi facilmente observada, mas nos nódulos jovens foi dificultada, razão pela qual estes foram incorporados aos nódulos de cor normal. As cultivares "Garôto" e "Seridó" formaram nódulos pretos apenas com a estirpe C-101, enquanto as demais foram mais promíscuas produzindo nódulos pretos com as duas estirpes com esta característica.

A correlação entre o nitrogênio total absorvido e o peso dos nódulos demonstrou que as cultivares "Seridó" e "Cariri" fixaram maior quantidade de nitrogênio, em contraste com a cultivar "Garôto". Foram obtidas duas curvas distintas, sendo uma para as cultivares "Seridó", "Sempre-Verde" e "Cariri", e outra para a cultivar "Garôto" que fixou menor quantidade de nitrogênio por unidade de tecido nodular (figura 1).

Verificou-se, pelos dados da tabela 2, que, de uma maneira geral, com relação à competição entre as estirpes aplicadas no inoculante, a formação dos nódulos e a fixação do nitrogênio não foram influenciados pela mistura das estirpes. A estirpe homóloga 5.000 foi mais competitiva na formação dos nódulos nas cultivares "Seridó" e "Cariri". Na cultivar "Garôto" cerca de 40% dos nódulos foram formados pela estirpe C-102, e na cultivar "Sempre-Verde" mais de 70% dos nódulos foram formados pelas estirpes C-101 e C-102, que produziram nódulos pretos.

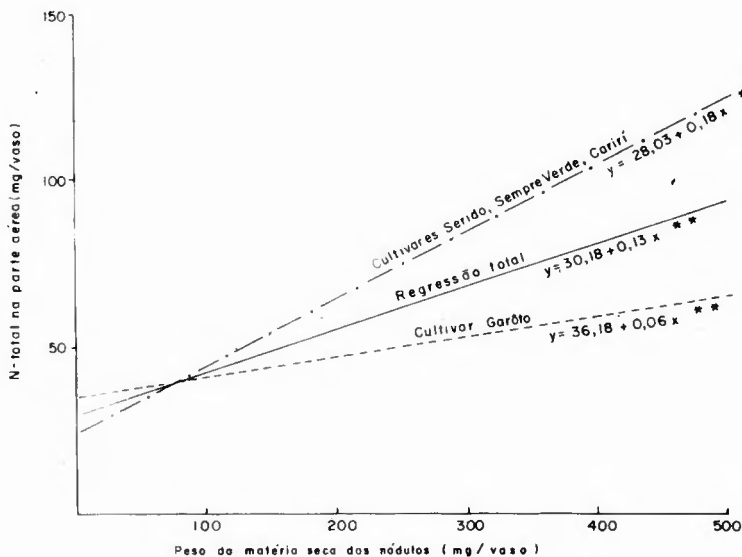


Figura 1 — Correlações entre o nitrogênio total da parte aérea e o peso da matéria seca dos nódulos, em quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp. (média de 3 repetições)

Tabela 1 — Nodulação e fixação de nitrogênio atmosférico por quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., em inoculação cruzada com três estirpes de *Rhizobium* (média de três repetições)

Cultivares	Estirpes	Número (vaso)	N ó d u l o s		P l a n t a s	
			Peso (mg/vaso)	Peso Médio (mg)	Mat. Seca (g/vaso)	N. Total (mg/vaso)
Seridó	Testemunha	10	23	2,3	2,3	34
	C-101	79	213	2,7	2,5	100
	C-102	91	317	3,5	2,4	86
	5.000	104	413	4,0	3,3	123
	mistura	50	267	5,3	2,5	97
Sempre Verde	Testemunha	0	0	0	1,8	9
	C-101	91	327	3,6	2,8	101
	C-102	102	360	3,5	2,2	38
	5.000	21	366	17,4	2,6	105
	mistura	74	497	6,7	2,8	104
Garoto	Testemunha	2	4	2,0	1,4	17
	C-101	95	283	3,0	2,3	69
	C-102	78	403	5,2	2,0	39
	5.000	15	450	30,0	2,7	94
	mistura	99	424	4,3	1,8	54
Cariri	Testemunha	10	37	3,7	1,7	33
	C-101	84	463	5,5	3,2	133
	C-102	47	303	6,5	4,4	109
	5.000	56	275	4,9	2,7	84
	mistura	71	396	5,6	2,8	96

Tabela 2 – Formação de nódulos pretos e normais em quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., inoculada com estirpes formadoras de nódulos normais e pretos (média de três repetições)

Cultivar	Estirpe	Número/Vaso		N ó d u l o Peso total (mg/vaso)		Peso médio (mg)	
		Preto	Normal	Preto	Normal	Preto	Normal
Seridó	testemunha	0	10	0	23	0	2,3
	C-101	0	79	0	213	0	2,7
	C-102	91	0	317	0	3,5	0
	5.000	0	104	0	413	0	4,0
	mistura	0	50	0	267	0	5,3
Sempre Verde	testemunha	0	0	0	0	0	0
	C-101	78	13	307	20	3,9	1,5
	C-102	83	19	341	19	4,1	1,0
	5.000	0	21	0	366	0	17,4
	mistura	53	21	388	109	7,3	5,2
Garoto	testemunha	0	2	0	4	0	2,0
	C-101	0	95	0	283	0	3,0
	C-102	68	10	344	59	5,1	5,9
	5.000	0	15	0	450	0	30,0
	mistura	38	61	142	282	3,7	4,6
Cariri	testemunha	0	10	0	37	0	3,7
	C-101	84	0	463	0	5,5	0
	C-102	35	12	287	16	8,2	1,3
	5.000	0	36	0	275	0	4,9
	mistura	0	71	0	396	0	5,6

Tabela 3 – Especificidade hospedeira de quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., inoculadas com três diferentes estirpes

Cultivares	Especificidade Hospedeira		N Fixado 75 a 50%
	100%	75%	
Seridó	5.000	C-101	C-102
Sempre Verde	5.000	C-101	C-102
Garoto	5.000	C-101	C-102
Cariri	C-101	C-102	5.000

Tabela 4 – Análise de variância parcial do experimento em vasos de Leonard

Fonte de Variação	G.L.	Planta Mat. Seca (g/vaso)	Nódulo		Nitrogênio	
			Número	Peso (mg/vaso)	%	Total (mg/vaso)
Cultivares	33	17,626**	0,394	0,378	3,627*	1,691
Tratamentos	4	27,212**	17,952**	23,078**	12,731**	10,013**
Cult. x Trat.		8,720*	1,427	0,996	1,091	0,855
Repetição		4,469*	1,554	0,119	3,710	3,630
Resíduo	38					
C.V. (%)		17,41	34,82	31,00	28,08	26,11

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo do nível de 1% de probabilidade

ABSTRACT

Vigna unguiculata (L) Walp. may nodulate with *Rhizobium* strains isolated from other tropical plant specie of the so called "cowpea cross inoculated group". With respect to host specificity *Rhizobium-Vigna unguiculata* there are no definite conclusions, especially related with strain competition. A greenhouse experiment was conducted in order to test the specificity of *Rhizobia* strains from different origins in cross inoculation with four *Vigna unguiculata* cultivars. The experimental design was a factorial 4x5 with 3 replicates, carried out with Leonard jars. The results indicate that nodules number as well nodules weight were not influenced by the cultivars tested.

The nodules number and the total nodule weight varies with the origin of the strains and also with individual strains. Strain 5.000 (Rothamsted) was more effective on the cultivars "Seridó", "Sempre Verde" and "Garôto" and highest nitrogen fixation was obtained with that homologue strain. Certain host specificity was observed and only the cultivar "Cariri" showed a different behaviour, with strain C-101 fixing more nitrogen. The cultivars "Seridó", "Sempre Verde" and "Garôto" showed a closed relationship in cross inoculation. The black nodule forming strain C-102 produced black nodules in all cultivars and the other black nodule forming strain C-101 formed pink colors nodules with the cultivars "Seridó" and "Garôto", suggesting that nodule character is plant induced. The linear regression of total plant N versus nodule weight demonstrate that two different lines were obtained, the first one for cultivar "Garôto" and the other for cultivars "Seridó", "Sempre Verde" and "Cariri", with high difference between the two slopes. The cultivar "Garôto" showed a low amount of N fixed per unit nodule tissue. When all strains used were applied in mixture there was no effect on both nodule formation and nitrogen fixation. It seems that the homologue strain 5.000 was more competitive in nodule formation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – ALLEN, O. N. & BALDWIN, I. C. Rhizobia legume relationships. *Soil Science*, Baltimore, 78:415-27, 1954.
- 2 – BREMNER, J. M. Total nitrogen. In: BLACK, C. A. ed. *Methods of soil analysis*. Madison, American Society of Agronomy, 1965. (Agronomy, 9). part. 2, cap. 83, p. 1149-78.
- 3 – DOBEREINER, J. Legumes in latin american agriculture. *Proc. Ind. Nat. Sci. Acad. B. Biol. Sci.*, 40: 768-94, 1964.
- 4 – FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; McCOY, E. *Root nodule bacteria and leguminous plants*. Madisom. University Wisconsin, 1932. 343 p.
- 5 – HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C. ; HERBERT, R. R.; HOSLTEN, R. D.; JACKSON, E. K. Biological nitrogen fixation; a key to world protein. *Plant and Soil*, The Hague, (special vol.): 561-90, 1971.
- 6 – JOHNSON, R. M. & RAYMOND, W. D. The chemical composition of some tropical food plants. II. Pigeons peas and cowpeas. *Tropical Science*, London, 6(2): 68-73, 1964.
- 7 – NORRIS, O. D. The intelligent use of inoculants and lime pelleting for tropical legumes. *Tropical Grasslands*, Brisbane, 1(2): 107-21, 1967.
- 8 – STAMFORD, N. P. *Nódulos pretos no estudo da inoculação cruzada e da competição entre estirpes de Rhizobium em leguminosas forrageiras tropicais*. Rio de Janeiro, 1971. 112 p. Mestrado-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- 9 – —; CAMPELO, A.B; DOBEREINER, J. Nódulos pretos eficientes e ineficientes e sua inoculação cruzada em algumas leguminosas. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA DE INOCULAÇÃO E LEGUMINOSAS, 4., Porto Alegre, 1968.
- 10 – SUHET, A. R. *Efeito do ⁵⁹Fe e do ⁶⁵Zn na produção de matéria seca e na composição química do feijoeiro (Phaseolus vulgaris L) cv. Carioca e na fixação de nitrogênio atmosférico, em três solos*. Piracicaba, 1976. 73 p. Mestrado-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo.
- 11 – WILSON, J. K. Symbiotic promiscuity in the leguminosae. *Trans. III Comm. Int. Soc. Soil Sci.* A: 49-63. 1939.