

## Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe<sup>(1)</sup>

Marcelo Ferreira Fernandes<sup>(2)</sup>, Roberta Pereira Miranda Fernandes<sup>(3)</sup> e Mariângela Hungria<sup>(4)</sup>

Resumo – A inoculação de estirpes de rizóbios em sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), caupi (*Vigna unguiculata*) e guandu (*Cajanus cajan*), recomendadas para outras regiões do País, não tem resultado em incrementos nas taxas de fixação biológica de N<sub>2</sub> nem no crescimento dessas leguminosas em solos dos tabuleiros costeiros de Sergipe. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros associados a essas leguminosas e a tolerância deles a estresses. Das 17 estirpes de rizóbios isoladas e analisadas em casa de vegetação, quatro foram selecionadas para o guandu, sete para o caupi e três para o feijão-de-porco. O número e a massa de nódulos secos por planta correlacionaram-se com a massa da parte aérea seca, a área foliar e o N total acumulado nas folhas das três leguminosas. Os mesmos rizóbios foram eficientes para o caupi e para o guandu. Três estirpes do guandu (R35, R43 e R45) e duas do caupi (R10 e R17) foram caracterizadas in vitro e todas apresentaram tolerância às concentrações elevadas de ácido nalidíxico, cloranfenicol e tetraciclina, porém, foram sensíveis à estreptomicina e à kanamicina. Todas as estirpes cresceram a 35°C e, exceto a R17, toleraram o alumínio (10 mg L<sup>-1</sup>).

Termos para indexação: *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis*, *Vigna unguiculata*, biologia molecular, fixação de nitrogênio.

### Selection of indigenous rhizobia to the cowpea, pigeonpea and jackbean crops in the coastal tableland of Sergipe, Brazil

Abstract – The inoculation of rhizobial strains in jackbean (*Canavalia ensiformis*), cowpea (*Vigna unguiculata*) and pigeonpea (*Cajanus cajan*), recommended for other regions of Brazil, has not resulted in increases of biological nitrogen fixation rates and plant growth in soils of the coastal tableland of Sergipe (Brazilian Northeast). The objectives of this work were to evaluate the symbiotic effectiveness of indigenous rhizobia from that coastal tableland associated to these three legumes and their tolerance to stresses. Seventeen rhizobia strains were isolated and evaluated in a greenhouse. Four strains were selected for pigeonpea; seven for cowpea and three for jackbean. Nodules number and dry weight were related to shoot dry weight, leaf area and leaf N content, in all three legumes. The same strains were efficient for both cowpea and pigeonpea. Three pigeonpea (R35, R43 and R45) and two cowpea (R10 and R17) rhizobia were characterized in vitro and all showed tolerance to high levels of nalidix acid, chloramphenicol and tetracycline; however, they were sensitive to streptomycin and kanamycin. All strains were able to grow at 35°C and, except for R17, were tolerant to aluminium (10 mg L<sup>-1</sup>).

Index terms: *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis*, *Vigna unguiculata*, molecular biology, nitrogen fixation.

### Introdução

A inoculação de estirpes de rizóbios em sementes de feijão-de-porco, caupi e guandu, recomendadas para outras regiões do País, não tem resultado em incrementos no crescimento vegetativo, nos teores de N na planta e na nodulação das raízes em solos dos tabuleiros costeiros de Sergipe (Barreto & Fernandes, 1998). Esta ausência de resposta à inoculação pode ser consequência da baixa adapta-

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 7 de abril de 2003.

<sup>(2)</sup> Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros, Caixa Postal 44, CEP 49025-040 Aracaju, SE. E-mail: Marcelo.Fernandes@orst.edu

<sup>(3)</sup> Universidade Federal de Sergipe, Dep. de Fisiologia, Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, s/nº, Jardim Rosa Elze, CEP 49100-000 São Cristóvão, SE. E-mail: fermanro@onid.orst.edu

<sup>(4)</sup> Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. Bolsista do CNPq. E-mail: hungria@cnpso.embrapa.br

bilidade das estirpes às condições edafoclimáticas da região ou incapacidade para colonizar efetivamente as raízes na presença de populações de rizóbios já estabelecidas no solo. Além disso, pelo caráter promíscuo da nodulação destas leguminosas, várias estirpes nativas podem se associar às raízes, dificultando ainda mais a introdução de estirpes alóctones e, com frequência, tem sido relatada uma relação inversa entre resposta à inoculação e tamanho da população de rizóbios nativos no solo (Weaver & Frederick, 1974; Thies et al., 1991b).

Além da eficiência simbiótica, a capacidade de sobrevivência no solo e a habilidade competitiva com a população rizobiana nativa ou naturalizada do solo são características altamente desejáveis em estirpes de rizóbios recomendadas para inoculação em leguminosas (Brockwell, 1981). Essas características têm sido freqüentemente relacionadas à maior resistência das estirpes a antibióticos, ao Al e a temperaturas elevadas (Oliveira & Graham, 1990; Wolff et al., 1991; Xavier et al., 1998). As temperaturas elevadas, que ocorrem freqüentemente nos trópicos, afetam diversos estágios da fixação biológica do N<sub>2</sub> (FBN), como o crescimento e sobrevivência do rizóbio no solo, troca de sinais moleculares entre os simbioss, processo de infecção e nodulação e atividade do aparato enzimático para redução do N<sub>2</sub> e assimilação da amônia formada (Hungria & Vargas, 2000). Do mesmo modo, concentrações tóxicas de Al ocorrem em diversos solos intemperizados dos trópicos e afetam todas as etapas da FBN (Hungria & Vargas, 2000). Contudo, existe variabilidade entre estirpes de rizóbio quanto à tolerância a temperaturas elevadas e ao Al tóxico (Ayanaba et al., 1983; La Favre & Eaglesham, 1986; Karanja & Wood, 1988; Wood, 1995; Hungria et al., 1997; Hungria & Vargas, 2000; Campo & Wood, 2001).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros de Sergipe inoculados em guandu, caupi e feijão-de-porco e a tolerância deles a estresses.

### Material e Métodos

O isolamento dos rizóbios foi feito em meio de cultura semi-sólido contendo extrato-de-levedura e manitol (YMA, yeast manitol agar), tendo o vermelho Congo como indica-

dor (Vincent, 1970), a partir de nódulos de raízes de guandu (*Cajanus cajan*), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), caupi (*Vigna unguiculata*) e crotalárias (*Crotalaria juncea* e *C. spectabilis*), leguminosas que vêm sendo utilizadas e que foram coletadas em diferentes áreas dos tabuleiros costeiros de Sergipe.

Dos isolados obtidos, foram selecionadas 17 estirpes (Tabela 1), que foram avaliadas quanto aos seus efeitos sobre o crescimento, nodulação e acúmulo de N em guandu, feijão-de-porco e caupi.

As estirpes foram avaliadas em experimentos realizados em casa de vegetação da Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE, empregando-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Além dos 17 rizóbios nativos, foram incluídos um tratamento sem inoculação e outro com inoculação de estirpes recomendadas comercialmente para essas culturas. As estirpes, enviadas pela Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica, RJ, foram as seguintes: para o caupi, SEMIA 6145 (=BR2001); para o guandu, uma mistura com SEMIA 6156 (=CPAC-IJ) e SEMIA 6157 (=BR 2801); para o feijão-de-porco, uma mistura de SEMIA 6156 + SEMIA 6158 (=CPAC 42).

Os procedimentos de implantação, condução e coleta dos experimentos foram idênticos com as três leguminosas, exceto quando mencionado. Utilizaram-se vasos de Leonard

**Tabela 1.** Estirpes de rizóbios isoladas de plantas de guandu, caupi e feijão-de-porco, locais no Estado de Sergipe, velocidade de crescimento e alteração do pH em meio de cultura YMA com indicador de azul de bromotimol.

Estirpe	Planta hospedeira	Local	Velocidade de crescimento <sup>(1)</sup>	pH <sup>(2)</sup>
R04	Guandu	Aracaju	MR	Neutro
R06	Guandu	Umbaúba	L	Alcalino
R10	Caupi	Umbaúba	R	Neutro
R14	Feijão-de-porco	Umbaúba	L	Alcalino
R17	Caupi	Umbaúba	L	Alcalino
R18	Guandu	Aracaju	MR	Neutro
R26	Caupi	N. S. Dores	R	Ácido
R28	Feijão-de-porco	N. S. Dores	R	Neutro
R30	Guandu	Umbaúba	R	Ácido
R31	Guandu	Aracaju	R	Neutro
R33	Caupi	Aracaju	R	Ácido
R35	Guandu	N. S. Dores	L	Neutro
R39	Guandu	Queimadas	I	Alcalino
R43	Guandu	N. S. Dores	L	Neutro
R45	Guandu	Aracaju	L	Alcalino
R50	<i>Crotalaria juncea</i>	Umbaúba	MR	Ácido
R51	<i>C. spectabilis</i>	Umbaúba	MR	Ácido

<sup>(1)</sup>Classes de crescimento determinadas de acordo com o número de dias para que colônias isoladas atingissem 1 mm de diâmetro: menos de três dias, muito rápido (MR); de três a cinco dias, rápido (R); de seis a sete dias, intermediário (I); de oito a dez dias, lento (L). <sup>(2)</sup>pH avaliado ao final de cinco ou dez dias de crescimento das estirpes de crescimento rápido ou lento, respectivamente.

modificados (Vincent, 1970) com capacidade de 1 L em cada compartimento. O compartimento superior foi preenchido com vermiculita e o inferior com solução nutritiva isenta de N (Weaver & Frederick, 1982), sendo o conjunto autoclavado. Três sementes de cada leguminosa, desinfestadas com hipoclorito de sódio a 10% (6 min), lavadas com água estéril foram semeadas em cada vaso. Uma semana após a semeadura, o desbaste foi realizado, deixando-se apenas uma planta por vaso.

A preparação e padronização dos inóculos foram feitas de acordo com Fernandes & Fernandes (2000) e a inoculação foi realizada no momento da semeadura utilizando-se 3 mL de suspensões de rizóbios (aproximadamente  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>). Os vasos dos tratamentos sem inoculação receberam 3 mL de uma suspensão de rizóbio previamente autoclavada, como controle de nutrientes que pudessem estar disponíveis no meio de cultura. Os compartimentos inferiores dos vasos de Leonard foram completados, a cada quatro dias, com solução nutritiva esterilizada e isenta de nitrogênio. O experimento de caupi foi colhido aos 50 dias após a semeadura (DAS); o de feijão-de-porco aos 55 DAS e o de guandu aos 60 dias após a semeadura.

A área foliar (AF) foi obtida utilizando-se um aparelho Li-Cor (EUA) e a massa da parte aérea seca (MPAS) foi determinada após secagem em estufa a 65°C por 72 horas. Os teores de N nas folhas (NF) foram determinados pelo método de Kjeldhal. Os nódulos foram retirados, contados (NN) e, após secagem em estufa a 65°C, por 72 horas, pesados para determinação da massa de nódulos secos (MNS).

A estirpe de rizóbio foi considerada eficiente quando os valores médios de AF, MPAS, NN, MNS e NF das plantas submetidas à inoculação foram superiores aos obtidos no tratamento sem inoculação e, simultaneamente, iguais ou superiores aos das leguminosas que receberam inóculos dos rizóbios recomendados para as respectivas espécies.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram determinados os coeficientes de correlação entre as espécies estudadas com relação a MPAS, AF, NN, MNS e NF.

As estirpes R10, R17, R35, R43 e R45, que apresentaram alta eficiência simbiótica para, pelo menos, uma das leguminosas avaliadas, foram selecionadas para a etapa de avaliação da tolerância a estresses.

As avaliações da tolerância dos isolados ao Al e às temperaturas elevadas, assim como os testes de tolerância aos antibióticos kanamicina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina e ampicilina, foram realizadas conforme descrito por Fernandes & Fernandes (2000).

Os teores de Al testados no meio YMA foram de 0, 5, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>, fornecido na forma de AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O, e os diâmetros das colônias medidos após sete dias de incubação a 28°C. Os testes de temperatura também foram realizados em meio YMA e as avaliações do diâmetro das colônias realizadas após sete dias de incubação a 28°C, 35°C e 45°C. Os resultados foram expressos em porcentagem do diâmetro das colônias nos diferentes tratamentos, em comparação aos tratamentos controle (0 mg de Al e 28°C).

A tolerância intrínseca das cinco estirpes aos antibióticos foi determinada pela técnica de gradiente de concentração (0 a 500 µg mL<sup>-1</sup>) em placa de Petri com meio YMA. A avaliação foi feita após quatro dias de incubação a 28°C. Quando o crescimento bacteriano ocorreu, atribuíram-se notas de 0 a 3, respectivamente, às faixas de concentrações de antibióticos de 0 a 125 µg mL<sup>-1</sup>; 126 a 250 µg mL<sup>-1</sup>; 251 a 375 µg mL<sup>-1</sup> ou 376 a 500 µg mL<sup>-1</sup>.

## Resultados e Discussão

Houve diferenças significativas entre as estirpes de rizóbio quanto à capacidade de promover o crescimento vegetativo (MPAS e AF), ao teor de N foliar (NF) e à nodulação das raízes (NN e MNS) de guandu, caupi e feijão-de-porco (Tabela 2). Quatro estirpes de rizóbios nativos (R45, R14, R35 e R33) foram consideradas eficientes quanto à FBN para o guandu (Tabela 3); sete (R33, R45, R10, R43, R35, R51 e R14) para o caupi (Tabela 4) e três (R43, R17 e R35) para o feijão-de-porco (Tabela 5). As estirpes utilizadas nos inoculantes comerciais foram consideradas eficientes para o guandu (Tabela 3) e para o caupi (Tabela 4), mas não para o feijão-de-porco (Tabela 5). Comparativamente aos rizóbios nativos considerados eficientes, porém, a mistura comercial para o feijão-de-porco foi inferior apenas ao melhor isolado nativo, o R43, com relação à MPAS, AF e NN (Tabela 5). Os resultados obtidos confirmam diferenças na eficiência de estirpes de rizóbios em promover benefícios a diferentes plantas hospedeiras (Peres & Vidor, 1980; Santillana et al., 1998; Carvalho & Stamford, 1999; Fernandes & Fernandes, 2000).

Como o NF dos tratamentos com rizóbios eficientes nas três leguminosas estudadas foi superior ao das plantas sem inoculação, considerou-se que a grande parte do N das plantas tenha origem na FBN. Os valores mais elevados de N nas plantas de feijão-

de-porco não submetidas à inoculação foram provenientes da grande reserva de N nas sementes desta espécie, avaliada entre 46 e 70 mg.

Os valores obtidos para MNS e NN apresentaram alta correlação com as variáveis MPAS, AF e NF, nas três leguminosas estudadas (Tabela 6); na análise destas correlações, os dados das plantas sem inoculação foram desconsiderados. Correlações positivas e significativas entre a massa nodular e a quantidade de N fixado biologicamente foram relatadas também por Döbereiner et al. (1966), Santos (1987), Bohrer & Hungria (1998) e Fernandes & Fernandes (2000).

Os valores de MPAS, AF, MNS e NF de caupi e guandu mostraram-se significativa e positivamente correlacionados, indicando que os isolados benéficos para uma dessas leguminosas também o são para a outra (Tabela 7). Correlações significativas foram observadas em relação a algumas variáveis, por exemplo, MNS, quando os dados de caupi e guandu foram correlacionados aos do feijão-de-porco. Diferenças no grau de compartilhamento de rizóbios eficientes entre leguminosas também foram observadas por Thies et al. (1991a). Segundo esses autores, *Macrotium atropurpureum* foi, quando compa-

**Tabela 2.** Análise de variância da massa da parte aérea seca (MPAS), da área foliar (AF), da massa de nódulos secos (MNS), do número de nódulos (NN) e do N total acumulado nas folhas (NF) de guandu, caupi e feijão-de-porco submetidos à inoculação de diferentes isolados de rizóbios.

Fonte de variação	GL	MPAS	AF	MNS	NN <sup>(1)</sup>	NF
Feijão-de-porco						
Rizóbio	18	9,923**	125.464,041**	0,07287**	48,0197**	8.445,26**
Resíduo	57	1,213	19.821,474	0,00530	7,1926	1.027,43
CV (%)		17,59	16,13	29,42	31,35	32,83
Caupi						
Rizóbio	18	3,486**	129.109,722**	0,00793**	15,3484**	2.336,49**
Resíduo	57	0,205	10.671,145	0,00075	2,1331	184,32
CV (%)		27,37	26,10	31,62	27,75	32,52
Guandu						
Rizóbio	18	2,509**	57.211,11**	0,01458**	29,5518**	1.692,13**
Resíduo	57	0,273	7.594,06	0,00148	7,1926	161,46
CV (%)		49,09	51,56	53,10	35,34	53,27

<sup>(1)</sup> Dados transformados para  $\sqrt{NN}$  Significativo a 1% de probabilidade.

**Tabela 3.** Massa da parte aérea seca (MPAS), área foliar (AF), número e massa de nódulos secos (NN e MNS) e N total acumulado nas folhas (NF) de guandu submetido à inoculação de diferentes rizóbios e cultivado em vasos de Leonard<sup>(1)</sup>.

Estirpe <sup>(2)</sup>	MPAS (g planta <sup>-1</sup> )	AF (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	NN <sup>(3)</sup> (n <sup>o</sup> planta <sup>-1</sup> )	MNS (g planta <sup>-1</sup> )	NF (mg planta <sup>-1</sup> )
T1	2,68a	388a	47ab	0,130abc	66,66a
R45	2,12ab	365a	66a	0,170a	52,07ab
R14	2,08ab	310ab	42abc	0,160a	51,26abc
R35	1,68abcd	255abc	35abcd	0,120abc	43,02abcd
R33	1,75abc	315ab	37abcd	0,140ab	41,97abcd
R06	1,80abc	251abcd	43ab	0,130abc	37,83abcde
R17	1,45abcde	227abcd	32abcd	0,120abc	37,54abcde
R43	1,66abcd	229abcd	36abcd	0,120abc	33,37bcdef
R26	0,86bcde	164abcd	8defg	0,070abcd	18,47cdef
R28	0,48cde	89bcd	17bcdef	0,030cd	14,78def
R10	0,67cde	125bcd	26abcde	0,060bcd	13,79def
R50	0,65cde	114bcd	10cdefg	0,050bcd	11,76def
R51	0,57cde	102bcd	6efg	0,030cd	10,08def
R18	0,53cde	76cd	1fg	0,001d	5,85ef
R39	0,32de	50cd	2fg	0,010d	4,11f
R04	0,33de	53cd	2fg	0,030cd	4,01f
T2	0,23e	34cd	0g	0,000d	2,75f
R31	0,22e	36cd	0g	0,000d	2,40f
R30	0,11e	24d	0g	0,000d	1,40f

<sup>(1)</sup> Em cada coluna, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup> T1: testemunha submetida à inoculação de estirpes recomendadas comercialmente (SEMIA 6156 + SEMIA 6157); T2: testemunha sem inoculação. <sup>(3)</sup> Análise estatística realizada com dados convertidos para  $\sqrt{NN}$ .

rada a *Arachis hypogaea* e *Phaseolus lunatus*, a espécie que apresentou maior grau de semelhança com o caupi quanto à resposta à inoculação de rizóbios isolados desta última espécie. O grau de compartilhamento de rizóbios eficientes entre leguminosas do “grupo miscelânea do caupi” foi, inclusive, sugerido como parâmetro na separação dessas espécies em grupos de efetividade (Burton,

1979). De acordo com essa separação, hospedeiros pertencentes a um mesmo grupo de efetividade responderiam de modo similar à inoculação de um dado isolado de rizóbio.

As cinco estirpes selecionadas na avaliação da tolerância a estresses *in vitro* apresentaram tolerância elevada ao ácido nalidíxico, ao cloranfenicol e à tetraciclina, e sensibilidade à kanamicina e à

**Tabela 4.** Massa da parte aérea seca (MPAS), área foliar (AF), número e massa de nódulos secos (NN e MNS) e N total acumulado nas folhas (NF) de caupi submetido à inoculação de diferentes rizóbios e cultivado em vasos de Leonard<sup>(1)</sup>.

Estirpe <sup>(2)</sup>	MPAS (g planta <sup>-1</sup> )	AF (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	NN <sup>(3)</sup> (n <sup>o</sup> planta <sup>-1</sup> )	MNS (g planta <sup>-1</sup> )	NF (mg planta <sup>-1</sup> )
T1	2,78ab	617ab	29abc	0,09abcde	80,96a
R33	3,24a	668a	38ab	0,16a	69,00ab
R45	3,06a	645a	59a	0,16a	66,67abc
R10	2,97a	619ab	42ab	0,13abc	74,84ab
R43	2,43abcd	450abcd	44ab	0,14ab	72,38ab
R35	2,65abcc	587ab	37ab	0,14ab	65,37abc
R51	1,44def	359bcd	38ab	0,09abcde	46,78abcd
R14	1,77bcde	455abc	39ab	0,11abcd	46,39abcd
R06	1,65bcde	458abc	12bcd	0,07bcdefg	45,27bcd
R50	1,50cdef	409abcd	54a	0,08bcde	39,69bcde
R17	1,28def	353bcd	64a	0,07bcdefg	32,75cde
R31	1,30def	355bcd	38ab	0,09abcde	32,63cde
R30	1,24ef	369bcd	25abc	0,07bcdefg	28,61de
R04	1,00ef	268cde	19abcd	0,06cdefg	25,65de
R26	0,97ef	291cde	33ab	0,08bcdef	24,03de
R28	0,73ef	184de	9bcd	0,04efg	19,83de
R39	0,59ef	283cde	13bcd	0,05defg	12,14de
R18	0,37f	70e	4cd	0,01fg	5,78e
T2	0,41f	77e	1d	0,00g	4,37e

<sup>(1)</sup>Em cada coluna, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup>T1: testemunha submetida à inoculação de estirpe recomendada comercialmente (SEMIA 6145); T2: testemunha sem inoculação. <sup>(3)</sup>Análise estatística realizada com dados convertidos para  $\sqrt{NN}$ .

**Tabela 5.** Massa da parte aérea seca (MPAS), área foliar (AF), número e massa de nódulos secos (NN e MNS) e N total acumulado nas folhas (NF) de feijão-de-porco submetido à inoculação de diferentes rizóbios e cultivado em vasos de Leonard<sup>(1)</sup>.

Estirpe <sup>(2)</sup>	MPAS (g planta <sup>-1</sup> )	AF (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	NN <sup>(3)</sup> (n <sup>o</sup> planta <sup>-1</sup> )	MNS (g planta <sup>-1</sup> )	NF (mg planta <sup>-1</sup> )
R43	11,30a	1.299a	246a	0,43ab	186,78a
R17	7,62b	895bcd	101abcd	0,37abc	157,30ab
R35	7,61b	1.064ab	211ab	0,29bc	145,93ab
R10	7,07bc	1.010abcd	74bcd	0,24bcde	148,05ab
R30	7,07bc	1.014abc	86abcd	0,28bcd	142,20abc
R06	6,58bc	1.079ab	79abcd	0,37abc	125,17abcd
R33	6,07bc	970abcd	96abcd	0,21cdef	124,88abdd
T1	5,25bc	827bcde	63bcde	0,33abc	106,81abcde
R50	5,91bc	860bcde	70bcd	0,28bcd	101,56bcde
R51	5,37bc	813bcde	97abcd	0,32abc	94,48bcde
R45	6,40bc	916bcd	138abc	0,49a	92,83bcde
R14	6,48bc	898bcd	90abcd	0,28bcd	81,04bcde
R31	6,28bc	810bcde	70bcd	0,30abc	79,17bcde
R39	4,20c	725bcde	27cde	0,22cdef	60,31cde
R18	6,25bc	802bcde	56cde	0,08efg	56,58de
R28	4,71c	685cde	58bcde	0,07efg	42,90de
R26	4,88bc	644de	11de	0,04fg	39,85e
T2	4,71c	550e	1e	0,01g	35,69e
R04	5,19bc	717bcde	33cde	0,10defg	33,31e

<sup>(1)</sup>Em cada coluna, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup>T1: testemunha submetida à inoculação de estirpes recomendadas comercialmente (SEMIA 6156 + SEMIA 6158); T2: testemunha sem inoculação. <sup>(3)</sup>Análise estatística realizada com dados convertidos para  $\sqrt{NN}$ .

estreptomicina (Tabela 8). Com exceção da R10, todos os demais rizóbios também foram tolerantes a concentrações elevadas de ampicilina ( $>250 \text{ mg L}^{-1}$ ). Resultados semelhantes foram obtidos por Xavier et al. (1998) com rizóbios de caupi isolados no Nordeste do Brasil. Conforme esses autores, das 17 classes de rizóbios, agrupadas de acordo com a resistência a oito antibióticos, 14 foram sensíveis a doses superiores a  $125 \text{ mg L}^{-1}$  de estreptomicina e kanamicina. Destas 17 classes, seis foram sensíveis a  $125 \text{ mg L}^{-1}$  de cloranfenicol e de tetraciclina, e sete foram sensíveis à mesma concentração do ácido nalidíxico.

As estirpes R10, R35, R43 e R45 não apresentaram redução do crescimento na presença de 5 e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Al, em comparação ao controle isento de Al; no entanto, nenhum crescimento foi observado com  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de alumínio. A estirpe R17 foi a mais sensível dos cinco rizóbios caracterizados, não apresentando crescimento em  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de alumínio. Não houve relação entre a reação ácida ou alcalina

em meio de cultura contendo manitol (Tabela 1) como fonte de C e a tolerância ao alumínio. Diferenças entre estirpes de rizóbio quanto à tolerância ao Al têm sido relatadas (Ayanaba et al., 1983; Hungria & Vargas, 2000; Campo & Wood, 2001), contudo, os mecanismos envolvidos nessa tolerância ainda não estão totalmente esclarecidos. Estudos compilados por Johnson & Wood (1990) e Wood (1995) indicaram que a ação dos íons Al ocorreria pela sua ligação ao DNA, interferindo na divisão celular. Contudo, tanto estirpes tolerantes como não tolerantes não apresentaram diferenças na ligação ao DNA, de modo que devem existir outros mecanismos de reparo do DNA em estirpes tolerantes (Johnson & Wood, 1990; Wood, 1995). O mais provável, porém, é que o Al interfira em vários mecanismos do rizóbio, tanto em vida livre como em simbiose (Hungria & Vargas, 2000), podendo atuar, até mesmo, como agente mutagênico (Octive et al., 1991).

Quanto à temperatura, o crescimento das cinco estirpes não foi alterado a  $35^\circ\text{C}$ , comparativamente à temperatura de  $28^\circ\text{C}$ . Apenas a estirpe R10 cresceu a  $45^\circ\text{C}$  e o diâmetro das colônias nesta temperatura foi equivalente à metade do observado quando a bactéria foi incubada a  $28^\circ\text{C}$ . Temperaturas elevadas têm, freqüentemente, representado um dos principais fatores limitantes à FBN em regiões tropicais, uma vez que afetam praticamente todas as etapas de crescimento do rizóbio e das plantas hospedeiras, sendo os efeitos ainda mais drástico na simbiose (Hungria & Vargas, 2000). Tem-se considerado, tradicionalmente, que os limites de temperatura para a FBN com leguminosas tropicais se situam entre  $27^\circ\text{C}$  e  $40^\circ\text{C}$  (Gibson, 1971; Hungria & Vargas, 2000). Existem diversos relatos sobre diferenças entre espécies e estirpes de rizóbio quanto à tolerância a temperaturas elevadas (La Favre & Eaglesham, 1986; Karanja & Wood, 1988; Hungria et al., 1997; Hungria & Vargas, 2000), contudo, uma relação entre a localização geográfica (locais com temperaturas elevadas) e essa tolerância não é evidente (Karanja & Wood, 1988). Embora haja indicação de que a habilidade de crescimento in vitro de uma estirpe não está necessariamente relacionada com a sua capacidade de FBN nas mesmas condições (La Favre & Eaglesham, 1986; Karanja & Wood, 1988), a tolerância excepcional de algumas estirpes, como a R10, observada neste tra-

**Tabela 6.** Coeficientes de correlação do número e massa de nódulos secos por planta (NN e MNS) com a massa da parte aérea seca (MPAS), a área foliar (AF) e o N total acumulado nas folhas (NF) de guandu, caupi e feijão-de-porco<sup>(1)</sup>.

Correlação	Guandu	Caupi	Feijão-de-porco
MNS x MPAS	0,918**	0,876**	0,518**
MNS x AF	0,917**	0,885**	0,628**
MNS x NF	0,904**	0,818**	0,671**
NN x MPAS	0,842**	0,542**	0,645**
NN x AF	0,848**	0,607**	0,686**
NN x NF	0,860**	0,555**	0,641**

<sup>(1)</sup>Com relação à variável NN a análise de correlação foi realizada com os dados convertidos para  $\sqrt{\text{NN}}$ . \*\*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

**Tabela 7.** Coeficientes de correlação dos dados da massa de nódulos secos (MNS), do número de nódulos (NN), da massa da parte aérea seca (MPAS), da área foliar (AF) e do N total acumulado nas folhas (NF) entre guandu e caupi (GxC), guandu e feijão-de-porco (GxFP) e caupi e feijão-de-porco (CxFP)<sup>(1)</sup>.

Parâmetro	GxC	GxFP	CxFP
MNS	0,69**	0,52*	0,57*
NN	0,46 <sup>ns</sup>	0,54*	0,34 <sup>ns</sup>
MPAS	0,65**	0,44 <sup>ns</sup>	0,47 <sup>ns</sup>
AF	0,69**	0,45 <sup>ns</sup>	0,60*
NF	0,63**	0,40 <sup>ns</sup>	0,69**

<sup>(1)</sup>Com relação à variável NN a análise de correlação foi realizada com os dados convertidos para  $\sqrt{\text{NN}}$ . <sup>ns</sup>Não-significativo. \* e \*\*Significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste t, respectivamente.

**Tabela 8.** Tolerância intrínseca a antibióticos de cinco isolados de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros, determinada pelo método do gradiente em placa, com concentrações variando de 0 a 500 µg mL<sup>-1</sup> <sup>(1)</sup>.

Estirpe	Ácido nalidíxico	Cloranfenicol	Tetraciclina	Ampicilina	Estreptomina	Kanamicina
R10	3	3	3	0	0	0
R17	3	3	3	3	0	0
R35	3	3	3	3	1	0
R43	3	3	3	2	0	0
R45	3	3	3	3	0	0

<sup>(1)</sup>0: resistente de 0 a 125 µg mL<sup>-1</sup>; 1: resistente de 126 a 250 µg mL<sup>-1</sup>; 2: resistente de 251 a 375 µg mL<sup>-1</sup>; 3: resistente de 376 a 500 µg mL<sup>-1</sup>.

balho representa o primeiro estágio de seleção para a região dos tabuleiros costeiros de Sergipe, onde freqüentemente o solo atinge temperaturas consideradas limitantes à fixação biológica do nitrogênio. O desempenho simbiótico observado em substrato estéril neste trabalho deve ser confirmado, a campo, para que as estirpes possam ser recomendadas como inoculantes para o guandu, o caupi e o feijão-de-porco.

### Conclusão

É possível selecionar estirpes de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros capazes de estabelecer uma simbiose efetiva com guandu, caupi e feijão-de-porco.

### Agradecimentos

À Fundação Banco do Brasil, pelo financiamento de parte deste trabalho; a J.A. Nascimento, C.A. Oliveira e H.B. Santos, pelo apoio na condução do experimento na casa de vegetação e nas análises laboratoriais; às Dras. Maria de Fátima Loureiro (Universidade Federal de Mato Grosso) e Iêda de C. Mendes (Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados), pelas sugestões no manuscrito.

### Referências

AYANABA, A.; ASANUMA, S.; MUNNS, D. N. An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to acid-aluminium stress. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 47, p. 256-258, 1983.

BARRETO, A. C.; FERNANDES, M. F. **Recomendação de leguminosas para adubação verde em solos dos tabuleiros costeiros**. Aracaju: Embrapa-CPACT, 1998. 5 p. (Comunicado Técnico, 28).

BOHRER, T. R. J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pes-**

**quisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 937-952, jun. 1998.

BROCKWELL, J. Can inoculant strains ever compete successfully with established soil populations? In: GIBSON, A. H.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Current perspectives in nitrogen**. Amsterdam: North Holland/Elsevier, 1981. p. 277-315.

BURTON, J. C. *Rhizobium* species. In: PEPLER, H. J.; PERLMAN, D. (Ed.). **Microbial technology: microbial processes**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Academic, 1979. v. 1, p. 29-58.

CAMPO, R. J.; WOOD, M. Residual effects of successive exposure of soybean *Bradyrhizobium* strains to aluminum on solid defined medium. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1399-1407, nov. 2001.

CARVALHO, F. G.; STAMFORD, N. P. Fixação do N<sub>2</sub> em leucena (*Leucaena leucocephala*) em solo da região semi-árida brasileira submetido à salinização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 23, p. 237-243, 1999.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B.; PENTEADO, A. F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do N total das plantas sobre o peso de nódulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 233-237, 1966.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, p. 321-327, 2000.

GIBSON, A. H. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, p. 139-152, 1971. Special volume.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.

- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. p. 189-295.
- JOHNSON, A. C.; WOOD, M. DNA: a possible site of action of aluminium in *Rhizobium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 3629-3633, 1990.
- KARANJA, N. K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: tolerance of high temperature and antibiotic resistance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 112, p. 15-22, 1988.
- LA FAVRE, A. K.; EAGLESHAM, A. R. J. The effects of high temperatures on soybean nodulation and growth with different strains of bradyrhizobia. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 32, p. 22-27, 1986.
- OCTIVE, J. C.; WOOD, M.; JOHNSON, A. C. Mutagenic effects of aluminium. **Mutation Research - DNA Repair**, Amsterdam, v. 264, p. 135-137, 1991.
- OLIVEIRA, L. A.; GRAHAM, P. H. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* using a nod+ fix- natural mutant. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 54, p. 305-310, 1990.
- PERES, J. R. R.; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em estirpes de soja. **Agronomia Sulriograndense**, Santa Maria, v. 16, p. 205-219, 1980.
- SANTILLANA, N.; FREIRE, J. R. J.; SÁ, E. L. S.; SATO, M. Avaliação de estirpes de rizóbios para a produção de inoculantes para trevo vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 22, p. 231-237, 1998.
- SANTOS, D. R. Seleção de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. para fixação de dinitrogênio em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), em solos salinizados do semi-árido. 1987. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1987.
- THIES, J. E.; BOHLOOL, B. B.; SINGLETON, P. W. Subgroups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea* and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 1540-1545, 1991a.
- THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 19-28, 1991b.
- VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.
- WEAVER, R. W.; FREDERICK, L. R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill - I: greenhouse studies. **Agronomy Journal**, Madison, v. 66, p. 229-232, 1974.
- WEAVER, R. W.; FREDERICK, L. R. *Rhizobium*. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (Ed.). **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. 2<sup>nd</sup> ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. part 2, p. 1043-1070.
- WOLFF, A. B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J. A.; VARGAS, H.; WERNER, D. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 12, p. 170-176, 1991.
- WOOD, M. A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. In: DATE, R. A.; GRUNDON, N. J.; RAYMENT, G. E.; PROBERT, M. E. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH: principles and management**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p. 173-179.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, p. 386-392, 1998.