

SELEÇÃO DE CULTIVARES DE FEIJÃO E ESTIRPES DE *RHIZOBIUM* PARA NODULAÇÃO PRECOCE E SENESCÊNCIA TARDIA DOS NÓDULOS (1)

C. A. BARRADAS (2), L. H. BODDEY (3) & M. HUNGRIA (4)

RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro tem, como um dos principais fatores limitantes, o ciclo curto da cultura, devendo-se então procurar maximizar o período ativo de fixação. Tem-se observado, porém, um período inicial de deficiência de N, que ocorre entre os 15 e os 22 dias após a emergência do feijoeiro nodulado, bem como uma aceleração no processo de senescência dos nódulos logo após o florescimento. Por isso, procurou-se identificar, em dois experimentos sob condições de casa de vegetação, cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* que apresentassem nodulação e fixação do N₂ precoce e senescência tardia dos nódulos. Dentre 14 estirpes eficientes usadas, H-20, H-24, CNPAF 126, CNPAF 233 + 234, CIAT 899 e CFN 299 se destacaram por um maior período ativo de fixação quando comparadas com as demais estirpes, inclusive com as recomendadas nos inoculantes comerciais, até então: SEMIA 487, CO5 II e CNPAF 146. Entretanto, a comparação com plantas que receberam 10mg N.planta⁻¹.dia⁻¹ mostrou que as plantas inoculadas com essas estirpes ainda estavam limitadas pelo N no início do ciclo vegetativo e no período médio de enchimento dos grãos. A inoculação de vinte cultivares de feijão com uma mistura de cinco estirpes eficientes de *Rhizobium* mostrou pequena variabilidade nos parâmetros de fixação do N₂. Houve destaque para os cultivares Carioca e Negro Argel, que apresentaram maior período de fixação, mas somente Preto Cariri, IAPAR 16 e Rio Piquiri não se mostraram boas plantas hospedeiras. Os resultados indicam que existe um potencial para seleção de cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* que apresentem nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos.

Termos de indexação: fixação de N, senescência de nódulos, nodulação precoce, *Phaseolus vulgaris*.

SUMMARY: SELECTION OF BEAN CULTIVARS AND RHIZOBIUM STRAINS FOR EARLY NODULATION AND LATE SENESCENCE OF NODULES

One of the main limitations for biological nitrogen fixation in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) is the short growth cycle of most economically important cultivars. Therefore, it is necessary to maximize the active period of nitrogen fixation. However, an initial period of N

(1) Resumo apresentado no I Congresso e Feira Nacional de Biotecnologia, Rio de Janeiro, 4-8 de abril de 1988. Recebido para publicação e aprovado em 7 de junho de 1989.

(2) Engenheiro-Agrônomo, bolsista do CNPq, Rio de Janeiro.

(3) Bióloga, bolsista do CNPq, Rio de Janeiro.

(4) Pesquisadora, EMBRAPA/UAPNPBS, km 47, CEP 23851, Itaguaí, RJ.

stress is often observed in nodulated beans, between 15 and 22 days after emergence, as well as an acceleration in the process of nodule senescence, soon after flowering. Consequently, in two experiments performed under greenhouse conditions, an attempt was made to identify bean cultivars and *Rhizobium* strains showing early nodulation and nitrogen fixation, and late nodule senescence. Among fourteen efficient strains used, some of them, H-20, H-24, CNPAF 126, CNPAF 233 + 234, CLAT 899 and CFN 299 showed longer periods of nitrogen fixation, including the strains recommended in commercial inoculants, SEMIA 487, CO5 II and CNPAF 146. However, compared to the plants receiving $10\text{mg N.plant}^{-1}.\text{day}^{-1}$, the plants inoculated with these strains were still limited by N at the beginning of the growth cycle and at the mid-pod filling stage. The inoculation of twenty bean cultivars with a mixture of the efficient strains showed small variability in the parameters related to nitrogen fixation. Cultivars Carioca and Negro Argel presented a longer period of N fixation, and Preto Cariri, LAPAR 16 and Rio Piquiri were poor hosts. The results obtained in these experiments indicated that there is a selection potential for bean cultivars and *Rhizobium* strains for early nodulation and late senescence of nodules.

Index terms: nitrogen fixation, nodule senescence, early nodulation, Phaseolus vulgaris.

INTRODUÇÃO

As leguminosas produtoras de grãos têm grande importância nos países tropicais, representando a principal fonte de proteína das populações de baixa renda, além de seu valor econômico, relacionado com as exportações. Entre os fatores que contribuem para o incremento da produtividade das leguminosas, o aumento na disponibilidade de nitrogênio nos estádios críticos do crescimento das plantas é um dos mais importantes. A fixação do nitrogênio passa, então, a representar um papel relevante, particularmente nos trópicos, pois permite o desenvolvimento adequado das plantas, enquanto mantém os custos de produção baixos, além de diminuir os problemas de poluição causados pelo uso indiscriminado dos fertilizantes nitrogenados (Döbereiner, 1977, 1979).

O potencial para a obtenção de produções elevadas via fixação biológica do nitrogênio existe para a maioria das leguminosas. No caso do feijoeiro, porém, os programas de seleção até recentemente conduzidos não consideraram sua capacidade de fixar N_2 . Isso foi provavelmente devido às suposições iniciais de que a planta apresentaria baixa capacidade de fixação do N_2 , relacionada com o ciclo curto da cultura, sua sensibilidade aos fatores ambientais (Burton, 1974) e pequena percentagem de células infectadas nos nódulos (Vincent, 1974), o que causaria baixa atividade específica e queda abrupta da fixação após o florescimento (Westerman & Kolar, 1978, e Franco et al., 1979).

A utilização de cultivares e estirpes mais adequadas, porém, tem mostrado que o feijoeiro nodulado pode acumular N nos tecidos em quantidades comparáveis às das plantas recebendo N mineral (Hungria et al., 1985b, e Dubois & Burris, 1986), indicando, portanto, que os estudos devem concentrar-se nos fatores limitantes à maximização da fixação biológica de nitrogênio.

Uma das principais limitações está justamente no ciclo curto da cultura, devendo-se prolongar o período ativo de fixação do N_2 . Deve-se procurar, pois, encontrar combinações simbióticas com nodulação e

fixação biológica precoces do N_2 . Isso porque tem sido observado um período inicial de estresse de N, que ocorre devido à falta de sincronização entre o esgotamento das reservas de N dos cotilédones da planta hospedeira e o início da fixação e exportação do N_2 fixado pelos nódulos (Sprent & Thomas, 1984, Hungria & Thomas, 1987). Essa deficiência inicial de N pode prejudicar o desenvolvimento das plantas, o que tem levado à recomendação de uma dose de arranque de fertilizante nitrogenado (Rigaud, 1981), mas que pode prejudicar seriamente a nodulação e fixação do N_2 , particularmente no caso do feijoeiro nodulado, que é considerado como extremamente sensível ao N mineral (Cartwright, 1967, Hungria et al., 1985a, e Hungria & Thomas, 1987).

A senescência precoce dos nódulos é outro fator importante que restringe a otimização do processo de fixação do N_2 no feijoeiro. Nessa cultura foi observado, sob condições de campo, que logo após o florescimento ocorre uma queda na atividade da nitrogenase (Franco et al., 1979, CNPAF, 1984). Os fatores ambientais, como temperatura e umidade exercem um papel muito importante na senescência dos nódulos (Sutton, 1983), mas também já foi detectada grande variabilidade entre cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* no grau de senescência dos nódulos após o florescimento (Hungria & Franco, 1988).

Este trabalho teve como objetivo avaliar cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* que apresentassem nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos. Os cultivares usados foram escolhidos entre material genético proveniente de programas de seleção para fixação do N_2 . As estirpes de *Rhizobium* foram as que se haviam destacado em três experimentos anteriores (Barradas & Hungria⁽⁵⁾ e Boddey & Hungria⁽⁶⁾).

(5) BARRADAS, C.A.A. & HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. I - Precocidade para nodulação e fixação do nitrogênio. Turrialba, Costa Rica (in press, 1988).

(6) BODDEY, L.H. & HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. II - Senescência tardia dos nódulos. Turrialba, Costa Rica, (in press, 1988).

MATERIAL E MÉTODOS

Em dois experimentos em casa de vegetação, na EMBRAPA-UAPNPBS, km 47, Rio de Janeiro, de agosto a dezembro de 1987, utilizaram-se catorze estirpes, selecionadas entre as que haviam obtido, em experimentos anteriores, melhor desempenho em relação à nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos:

ESTIRPES DE <i>Rhizobium leguminosarum</i> Biovar <i>phaseoli</i>	PROCEDÊNCIA
H-20	EMBRAPA/CPAC, Brasília
H-24	EMBRAPA/CPAC, Brasília
H-41	EMBRAPA/CPAC, Brasília
H-20 + H-41	EMBRAPA/CPAC, Brasília
CNPAF 109	EMBRAPA/CNPAF, Goiânia
CNPAF 119	EMBRAPA/CNPAF, Goiânia
CNPAF 126	EMBRAPA/CNPAF, Goiânia
CNPAF 146	EMBRAPA/CNPAF, Goiânia
CNPAF 233	EMBRAPA/CNPAF, Goiânia
CNPAF 233 + CNPAF 234	EMBRAPA/CNPAF, Goiânia
CNPAF 512	EMBRAPA/CNPAF, Goiânia
SEMIA 487	IPAGRO, Porto Alegre
CO5 (II)	CENA, Piracicaba
CIAT 899	CIAT, Colômbia
CFN 299 (= UMR 1026)	CIAT, Colômbia
N mineral	(10mg N.planta ⁻¹ .dia ⁻¹)

No segundo experimento, utilizaram-se vinte cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., proveniente de diversos programas de seleção de cultivares para a fixação do N₂ (Quadro 1).

Os cultivares foram inoculados com uma mistura de cinco estirpes (H-20, CIAT 899, CNPAF 119, CNPAF 126 e SEMIA 487) crescidas em meio YMA líquido sem ágar (Vincent, 1970) por quatro dias a 28°C, com agitação. As sementes de feijão foram desinfetadas com HgCl₂ 0,2% (Vincent, 1970). O HgCl₂ foi utilizado nessa concentração para possibilitar uma redução do tempo em que as sementes ficaram em contato com o agente desinfetante. Colocou-se, então, 1ml de inoculante (com cerca de 10⁸ células.ml⁻¹) para cada quinze sementes, empregando-se vasos de Leonard esterilizados (Vincent, 1970). Após contato com o inoculante por uma hora, colocaram-se cinco sementes por vaso, cobrindo-as, em seguida, com uma camada de areia esterilizada de 3cm aproximadamente. Cinco dias após a emergência, realizou-se o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Semanalmente, foi fornecida às plantas solução nutritiva isenta de N, contendo: NaH₂PO₄ (0,725mM), KH₂PO₄ (0,725mM), MgSO₄.7H₂O (3,1mM), CaSO₄.2H₂O (2,9mM), K₂SO₄ (1,5 mM), MnSO₄.4H₂O (1mM), CuSO₄ 5H₂O (0,1 μM), ZnSO₄.7H₂O (0,1 μM), H₃BO₃ (5,0 μM), NaCl (10,0 μM), NaMoO₄.2H₂O (0,5 μM), CoSO₄.6H₂O (0,02 μM) e FeEDTA (5,0 μM), pH 6,0-6,2.

Quadro 1. Cultivares de feijão *Phaseolus vulgaris* L., provenientes de diversos programas de seleção de cultivares para a fixação do N₂

Cultivares	Peso de cem sementes	Nitrogênio na semente	Origem
	g	%	
22-14	20,10	3,75	Ica Pijão x Puebla 152
22-24	19,52	3,16	F1 retrocruzada duas vezes para o Ica Pijão e autofecundada três vezes
Preto Cariri	18,41	2,99	Raça crioula do Nordeste de Honduras
SNC 480	26,19	2,99	Raça crioula > Nordeste de Honduras
Puebla 152	27,83	2,88	Raça crioula do México
Ica Pijão	20,27	3,32	Inst. Colombiano de Agronomia
1896	20,04	2,92	Honduras
IAPAR 16	29,43	3,24	Carioca x Great Nort Nebrasca, Seleção 27
CPP ₂ 48	26,35	4,01	
Rio Piquiri	23,12	3,09	Aruana (IAC-SP) x Cornell 49242 (EUA, linhagem resistente à antracnose. Desc. x retroc.)
Col 513	21,40	3,42	
Carioca	21,27	3,00	Seleção do IAC, SP
Carioca 80	21,38	3,09	Carioca x Cornell 242
Negro Argel	23,34	3,31	Raça crioula do Chile
Xodó	21,38	2,78	PESAGRO, RJ

No primeiro experimento, o delineamento experimental usado foi o de blocos ao acaso, com três repetições e três coletas, respectivamente, aos 17 (início da fixação), aos 38 (florescimento pleno) e aos 52 dias após a emergência (período médio de enchimento dos grãos). No segundo, o mesmo delineamento, com três repetições e duas coletas, aos 17 e aos 45 dias após a emergência (início de enchimento dos grãos).

Em cada coleta, cortou-se a parte aérea na altura do nó cotiledonar e uma raiz de cada vaso foi empregada para determinar a atividade da nitrogenase e, a outra, para determinar a evolução do H₂ pelos nódulos.

Avaliou-se a atividade da nitrogenase em raízes noduladas destacadas, pelo método de redução de acetileno. Colocaram-se as raízes em frascos de 270ml, fechando-se hermeticamente e incubando-se por quatro minutos com 15% de acetileno (Hungria & Neves, 1986a). Analisaram-se as amostras num cromatógrafo Perkin Elmer F11 com detector de ionização de chama, usando-se uma coluna de aço inoxidável com 0,32cm (diâmetro interno) por 50cm de comprimento contendo

Poropak N (80-100 mesh) e operada a 40°C, com N₂ como gás carregador a um fluxo de 40ml/minuto.

Determinou-se a evolução do H₂ em raízes destacadas (Schubert & Evans, 1976), incubando-as por quinze minutos em frascos de 70ml (início da fixação) ou 270ml (período final da fixação), sob atmosfera normal. Avaliou-se o H₂ produzido mediante um detector de condutividade térmica. Analisaram-se as leituras em cromatógrafo Varian modelo 1420, usando uma coluna de aço inoxidável com 0,32cm de diâmetro externo por 100cm de comprimento, contendo peneira molecular 5 A° (80-100 mesh), a 40°C, usando-se o argônio como gás de arraste a um fluxo de 25ml.min⁻¹.

A eficiência relativa (ER) dos elétrons destinados à nitrogenase foi calculada pela equação de Schubert & Evans (1976):

$$ER = \frac{H_2 \text{ evoluído (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzido}}$$

Após essas determinações, as raízes foram lavadas e secas em papel absorvente, e os nódulos destacados, cortados para exame da coloração interna e classificados, de acordo com a coloração e textura, em três seguintes grupos: nódulos róseos ativos, nódulos em início de senescência e nódulos completamente senescentes.

Colocaram-se as folhas, caules, raízes, vagens e nódulos para secar em estufa a 60-70°C até atingirem peso constante, determinando-se, então, o peso seco. O N total dos tecidos foi determinado segundo Boddey et

al. (1987), e as médias dos tratamentos, comparadas, pelo teste de Duncan a 5%.

RESULTADOS

Os resultados do primeiro experimento relativos à nodulação do feijoeiro inoculado com diferentes estirpes podem ser vistos no quadro 2. De modo geral todas as estirpes proporcionaram boa nodulação inicial, apresentando acima de 50mg de nódulos por planta aos 17 dias após a emergência. As estirpes CNPAF 109, CNPAF 146, SEMIA 487 e CFN 299 tiveram uma nodulação um pouco inferior, mas somente a CO5 II apresentou uma nodulação inicial fraca. Nessa primeira coleta algumas estirpes se destacaram pelas taxas de redução do acetileno bastante elevadas: H-20, H-24 e CIAT 899. Taxas baixas de redução de acetileno ocorreram nas plantas inoculadas com a CO5 II, SEMIA 487, CNPAF 126, CNPF 146, CNPAF 233 e CFN 299 (Quadro 3). A CNPAF 233 e a CNPAF 126 porém, apresentaram boa nodulação (Quadro 2) e acumularam teores elevados de N total na parte aérea até os 17 dias após a emergência (Figura 1).

A eficiência relativa da nitrogenase (ER) foi bastante elevada para a maioria das estirpes nessa primeira coleta. Os valores obtidos, maiores do que 0,75, indicam a ação da hidrogenase, com exceção da CFN 299, onde a eficiência relativa foi de 0,71 (Quadro 3).

O N total das raízes variou pouco aos 17 dias após a emergência: de 2,12mg N.planta⁻¹ (CNPAF 146) a

Quadro 2. Peso seco e N total dos nódulos de feijão, cv. Negro Argel, inoculado com quinze estirpes de *Rhizobium*. Médias de três repetições⁽¹⁾

Estirpes de <i>Rhizobium</i>	17 DAE ⁽²⁾		38 DAE		52 DAE	
	Peso seco	N total	Peso seco	N total	Peso seco	N total
	mg planta ⁻¹					
H-20	59a-d	3,48a	476ab	25,08ab	353b-c	19,87a-c
H-24	65ab	3,55a	308ab	16,22a-c	464a-c	25,79a-c
H-41	61a-c	2,63a-d	468ab	18,76a-c	704a	21,41a-c
H-20 + H-41	55a-d	2,76a-d	476ab	21,16a-c	587a-c	24,95a-c
CNPAF 109	37c-e	1,56c-e	418ab	22,00a-c	606ab	27,02a-c
CNPAF 119	72a	3,58a	315ab	15,00a-c	457a-c	21,03a-c
CNPAF 126	57a-d	3,06ab	332ab	18,00a-c	622ab	33,26a
CNPAF 146	32de	1,68b-e	286b	13,62bc	260c	13,70bc
CNPAF 233	62a-c	3,27a	371ab	16,58a-c	470a-c	24,60a-c
CNPAF 233 + 234	56a-d	2,90a-c	587a	28,94a	496a-c	26,83a-c
CNPAF 512	57a-d	2,87a-c	340ab	16,53a-c	434a-c	19,44a-c
SEMIA 487	43b-e	2,48a-d	240b	9,26c	471a-c	17,30a-c
CO5 (II)	18e	0,96c	225b	9,26c	257c	9,82c
CIAT 899	52a-d	2,15a-c	352ab	19,70a-c	291bc	16,61a-c
CFN 299 (= UMR 1026)	35c-e	1,37de	344ab	22,24a-c	463a-c	29,85ab

(1) Valores seguidos pela mesma letra dentro de cada coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

(2) DAE: dias após a emergência.

3,44mg N.planta⁻¹ (CIAT 899) e os maiores teores, de 4,0mg N.planta⁻¹, foram obtidos pelas plantas que receberam N mineral (Figura 1). Entretanto, diferenças significativas indicaram que as estirpes mais eficientes conseguiram, nessa fase inicial, acumular o dobro do N

total na parte aérea (Figura 1). Apesar de algumas plantas inoculadas não terem apresentado os sintomas clássicos de estresse de N, as que receberam N mineral acumularam o dobro do N total em relação às plantas inoculadas com as melhores estirpes (Figura 1). A par-

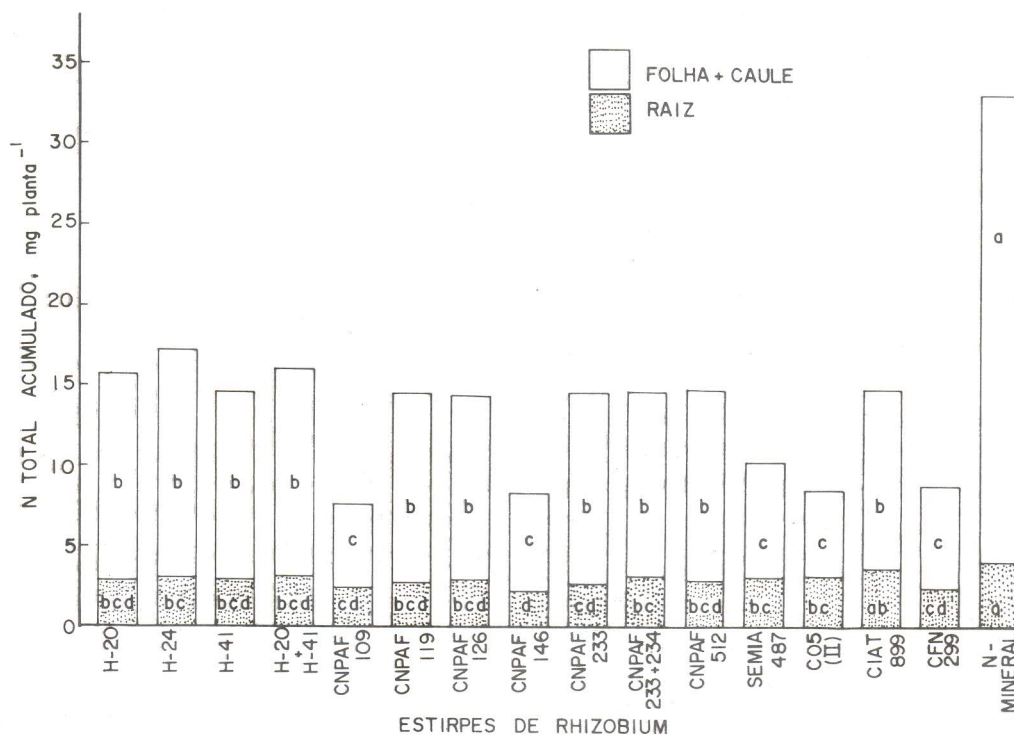
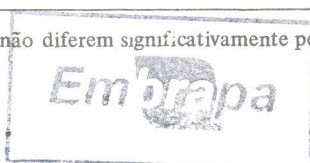


Figura 1. N total acumulado, até os 17 dias após a emergência, na parte aérea e nas raízes de feijão, cv. Negro Argel, inoculado com quinze espécies de *Rhizobium* ou recebendo 10mg N. planta⁻¹.dia⁻¹. Média de três repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

Quadro 3. Atividade da nitrogenase, avaliada pelo método da redução de acetileno e eficiência relativa (ER), aos 17, 38 e 52 dias após a emergência (DAE) de feijão, cv. Negro Argel, inoculado com quinze estirpes de *Rhizobium*. Médias de três repetições⁽¹⁾

Estirpes de <i>Rhizobium</i>	Atividade da nitrogenase			ER		
	17 DAE	38 DAE	52 DAE	17 DAE	38 DAE	52 DAE
	μmoles.planta ⁻¹ .hora ⁻¹					
H-20	22,02a	72,62a	11,90d-g	0,93ab	0,85ab	0,67e
H-24	19,70ab	46,84b-d	14,79c-f	0,88ab	0,67d	0,88a-c
H-41	16,00bc	64,91ab	24,88a	0,91ab	0,73b-d	0,90a-c
H-20 + H-41	16,17a-c	45,86b-e	16,25c-e	0,89ab	0,72cd	0,69de
CNPAF 109	12,02c-e	26,92d-g	19,86a-c	0,89ab	0,69d	0,83bc
CNPAF 119	12,26cd	26,98e-g	9,76e-g	0,92ab	0,83a-c	0,88a-c
CNPF 126	7,62d-f	26,58d-g	17,26b-d	0,93ab	0,89a	0,91a-c
CNPAF 146	6,61d-f	37,16c-f	6,61g	0,95a	0,86ab	0,81c
CNPAF 233	7,47d-f	48,45bc	23,27ab	0,88ab	0,90a	0,91a-c
CNPAF 233 + 234	10,75c-e	51,71bc	21,20a-c	0,95a	0,87a	0,93ab
CNPAF 512	11,66c-e	21,72fg	18,74a-d	0,76c	0,61d	0,85a-c
SEMIA 487	5,95ef	17,26fg	9,19fg	0,85b	0,83a-c	0,93ab
CO5 (II)	4,12f	9,96g	5,88g	0,92ab	0,61d	0,82bc
CIAT 899	16,59a-c	49,72bc	14,18c-f	0,89ab	0,73b-d	0,96a
CFN 299	8,46d-f	43,79c-e	15,82c-f	0,71c	0,73b-d	0,80cd

(1) Valores seguidos pela mesma letra dentro de cada coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.



tir dos dados de N total da parte aérea, raiz (Figura 1) e nódulos (Quadro 2), pode-se concluir que todas as estirpes, exceto CNPAF 109, CNPAF 146, SEMIA 487, CO5 II e CFN 299, podem ser consideradas como precoces em relação à nodulação e fixação do N₂, destacando-se, porém, as estirpes H-20, H-24 e CIAT 899.

Nessa primeira coleta, os nódulos acumularam, em média, 2,55mg N.planta⁻¹, semelhante aos 2,79mg N.planta⁻¹ acumulados nas raízes, e representaram 16,6% do N total das plantas (Quadro 2 e Figura 1).

Houve grande incremento no peso seco de nódulo entre a coleta inicial e o florescimento, e todas as estirpes apresentaram excelente nodulação, mas que continuou inferior nas plantas inoculadas com a CO5 II, SEMIA 487 e CNPAF 146 (Quadro 2).

No florescimento, as estirpes H-20 e H-41 conseguiram um desempenho excepcional em relação à atividade da nitrogenase, mas a combinação dessas duas estirpes apresentou atividade um pouco inferior. Atividades da nitrogenase bastante elevadas também foram relacionadas, nessa época, com as estirpes H-24, CNPAF 233, CNPAF 233 + 234, CIAT 899 e CFN 299 (Quadro 3). Em alguns casos, como o da CNPAF 233, chegou a haver um aumento de seis vezes na atividade da nitrogenase entre os 17 e os 38 dias após a emergência. A eficiência relativa caiu consideravelmente no florescimento, e somente a CNPAF 233 manteve a mesma eficiência. Em média, a eficiência relativa caiu de 0,88 aos 17 dias após a emergência para 0,77 no florescimento (Quadro 3).

No florescimento, a porcentagem de nódulos completamente senescidos foi inferior a 10% (Figura 2). Algumas estirpes, como a SEMIA 487, CNPAF 512 e CO5 II, que foram menos eficientes, apresentaram alta porcentagem (respectivamente 48, 37 e 33%) de seus nódulos no estágio de início de senescência. As estirpes mais eficientes apresentaram, em média, 70% de nódulos ativos, com coloração interna nessa coleta (Figura 2).

Houve, para a maioria das estirpes, um incremento no peso seco de nódulos entre o florescimento (38 dias após a emergência) e o período médio de enchimento dos grãos (52 dias após a emergência), com exceção da H-20, CNPAF 146 e CIAT 899 (Quadro 2). A atividade da nitrogenase, porém, caiu drasticamente nesse período, embora os níveis relativos às estirpes H-41, CNPAF 109, CNPAF 233, CNPAF 233 + CNPAF 234 e CNPAF 512 ainda se tenham mantido elevados (Quadro 3). Essa queda nas taxas de redução foi um reflexo da aceleração no processo de senescência dos nódulos (Figura 2). Algumas estirpes, como a H-20, que foram bastante precoces na fixação do N₂, apresentaram uma senescência drástica, com 91% de seus nódulos no estágio de início de senescência ou completamente senescidos aos 52 dias após a emergência (Figura 2), e as estirpes CNPAF 233 e CNPAF 233 + CNPAF 234, com boas taxas de redução do acetileno aos 52 dias após a emergência (Quadro 3) apresentaram maior porcentagem de nódulos róseos ativos nessa mesma época, respectivamente 40 e 35% (Figura 2). Com exceção das

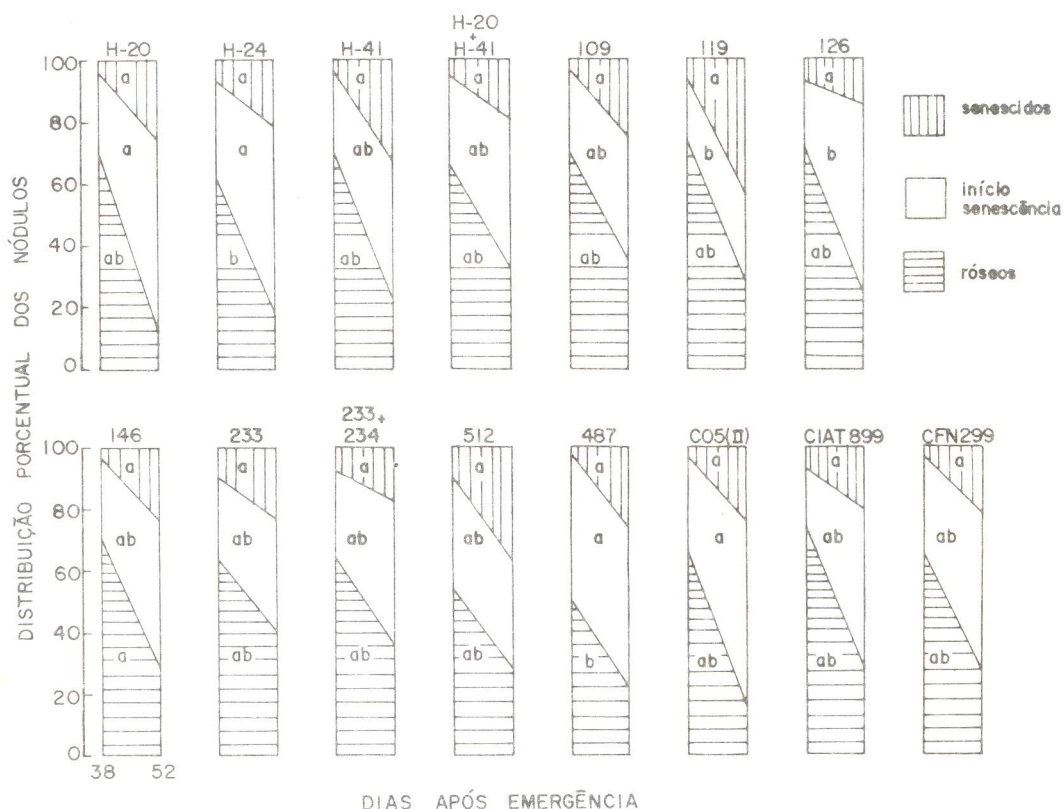


Figura 2. Efeito de quinze estirpes de *Rhizobium* na distribuição percentual das classes de nódulos, segundo seu grau de senescência, no ciclo reprodutivo de feijão cv. Negro Argel. Médias de três repetições. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

estirpes H-20, H-20 + H-41 e CNPAF 146, a eficiência relativa voltou a subir aos 52 dias após a emergência, apresentando valores bastante elevados para o feijoeiro (Quadro 3).

O N total das raízes, folhas, caules e vagens foi maior nas plantas que receberam N mineral (Figuras 3 e 4). Aos 52 dias após a emergência, essas plantas acumularam nas vagens 192,87mg N.planta⁻¹, enquanto nas estirpes que apresentaram melhor desempenho, CIAT 899, H-24 e CNPAF 126, os valores foram, respectivamente, 101,28, 96,57 e 92,35mg N. planta⁻¹ (Figura 4). Considerando-se o somatório do N total das raízes, folhas, caules e vagens, pode-se verificar que a maior fixação do N₂ ocorreu com as estirpes H-20, H-24, CNPAF 126, CNPAF 233 + CNPAF 234, CIAT 899 e CFN 299, que acumularam entre 255 e 236mg N.planta⁻¹, cerca de 36% a menos do que as plantas que receberam N mineral. Dessas, H-20, H-24 e CIAT 899 apresentaram fixação do N₂ precoce, e a combinação de CNPAF 233 + CNPAF 234 apresentou boas taxas de redução do acetileno no período médio de enchimento dos grãos.

No segundo experimento, onde se procurou avaliar o desempenho de vinte cultivares de feijão, observou-se que todos apresentaram ótima nodulação inicial, avaliada aos 17 dias após a emergência, e mesmo a nodulação de Puebla 152, de 41mg de nódulos, pode ser considerada como bastante satisfatória (Quadro 4).

Essa relativa homogeneidade na nodulação refletiu na atividade da nitrogenase, podendo-se considerar que somente os cultivares IAPAR 16, Carioca 80 e 22-24 apresentaram menores taxas de redução do acetileno

Quadro 4. Peso seco de nódulos aos 17 e 45 dias após a emergência (DAE) e distribuição percentual dos nódulos (aos 45 DAE) segundo o grau de senescência em vinte cultivares de feijão inoculados com cinco estirpes de *Rhizobium* (H-20, CIAT 899, CNPAF 119, CNPAF 126 e SEMIA 487). Médias de três repetições⁽¹⁾

Cultivar de feijão	Peso seco de nódulos		Classificação dos nódulos		
	17 DAE	45 DAE	Róseos	Início de senescência	Senescidos
	mg.planta ⁻¹		%		
22-14	73a-c	447a-d	56a	32a	12a
22-24	66a-d	312b-d	47ac	41a	12a
22-34	51a-d	371a-d	40ac	25a	35a
22-50	53a-d	319b-d	44ac	35a	21a
22-52	59a-d	328b-d	56a	34a	10a
22-55	50b-d	465ab	54a	34a	12a
21-58	66a-d	457a-c	61a	33a	6a
Preto Cariri	49cd	263b-d	27c	23a	50a
SNC 480	62a-d	217cd	28bc	37a	35a
Puebla 152	41d	369a-d	49a-c	31a	20a
Ica Pijão	63a-d	396a-d	39bc	26a	35a
1896	58a-d	263b-d	43a-c	45a	12a
IAPAR 16	49cd	204d	43a-c	46a	11a
CPP ₂ 48	80a	394a-d	42a-c	40a	18a
Rio Piquiri	59a-d	288b-d	53ab	35a	12a
Col 13	53a-d	401a-d	38a-c	42a	20a
Carioca	62a-d	583a	55a	31a	14a
Carioca 80	65a-d	417a-d	35a-c	43a	22a
Negro Argel	79ab	443a-d	44a-c	34a	22a
Xodó	62a-d	431a-d	48a-c	30a	22a

(1) Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

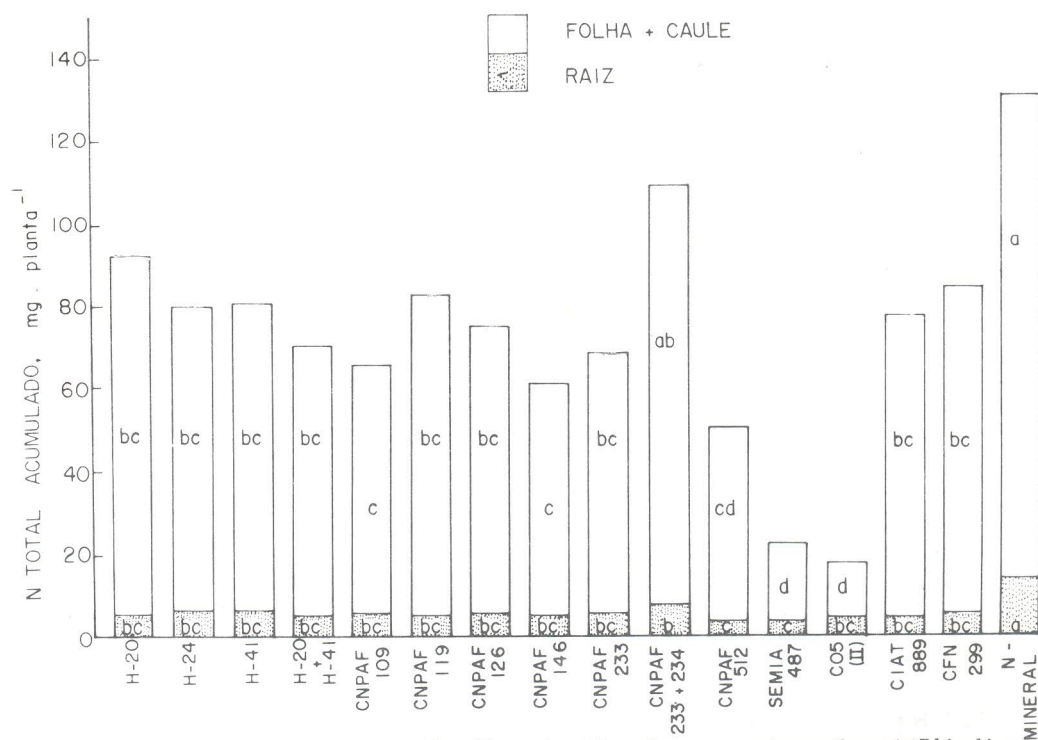


Figura 3. N total acumulado em feijão, cultivar Negro Argel, inoculado com quinze estirpes de *Rhizobium*. Plantas coletadas no florescimento, aos 38 dias após a emergência. Médias de três repetições. Letras iguais indicam que os valores não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

nessa fase inicial. As maiores atividades foram obtidas com os cultivares 22-14, 22-34, 22-50, 21-58 e, principalmente, com o 'CPP248' cujas taxas foram bastante elevadas para os 17 dias após a emergência (Quadro 5). As eficiências relativas também foram bastante elevadas nessa primeira época, com índices superiores a 0,80 (Quadro 5).

A elevada nodulação, atividade da nitrogenase e eficiência relativa conseguidas pelo 'CPP248' implicaram maior acúmulo de N total na parte aérea e raízes nessa coleta, indicando-o como mais precoce para fixação do N₂ (Figura 5). Os cultivares 22-14, 22-34, 22-50 e 21-58, que haviam apresentado taxas de redução de acetileno e eficiência relativa elevadas, porém, não acumularam teores elevados de N total na parte aérea, o que pode indicar deficiência na assimilação ou transporte do N₂ fixado nessa fase inicial. Os cultivares SNC 480, Carioca 80 e Xodó também acumularam teores elevados de N total na parte aérea nessa época (Figura 5).

No período inicial de enchimento dos grãos, aos 45 dias após a emergência, todos os cultivares revelaram boa nodulação; somente o 'SNC 480' e o 'IAPAR 16' apresentaram menos de 250mg de nódulos.planta⁻¹ (Quadro 4), o que provavelmente implicou menor atividade da nitrogenase (Quadro 5). Os cultivares 22-14 e 22-52 destacaram-se nessa época pelas taxas de redução do acetileno mais elevadas. Bom desempenho também foi obtido por 21-58, Ica Pijão, Carioca e Negro Argel. Os demais demonstraram atividades semelhantes, à exceção de SNC 480 e IAPAR 16, com

Quadro 5. Atividade da nitrogenase, avaliada pelo método da redução do acetileno e eficiência aos 17 e 45 dias após a emergência (DAE) de vinte cultivares de feijão inoculados com uma mistura de cinco estirpes de *Rhizobium* (H-20, CIAT 899, CNPAF 119, CNPAF 126 e SEMIA 487). Médias de três repetições⁽¹⁾

Cultivar de feijão	Atividade total		Eficiência relativa	
	17 DAE	45 DAE	17 DAE	45 DAE
	$\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$			
22-14	24,80a-c	55,79a	0,90a-c	0,82a-c
22-24	14,00e	20,15gh	0,93ab	0,80c
22-34	24,23a-c	26,15e-h	0,90a-c	0,84a-c
22-50	2,3ab	40,64b-d	0,92ab	0,90a-c
22-52	22,03b-d	49,67ab	0,92ab	0,89a-c
22-55	20,37b-e	35,81c-f	0,90a-c	0,80bc
21-58	23,90a-c	42,38bc	0,90a-c	0,80bc
Preto Cariiri	20,60b-e	23,92f-h	0,92ab	0,83a-c
SNC 480	18,90b-e	14,29h	0,90a-c	0,91a-c
Puebla 152	21,90b-d	28,30d-g	0,94a	0,86a-c
Ica Pijão	18,70b-e	40,37b-d	0,94a	0,88a-c
1896	17,50c-e	20,35gh	0,90a-c	0,90a-c
IAPAR 16	6,83f	13,82h	0,86c-e	0,90a-c
CPP ₂ 48	29,27a	20,13gh	0,94a	0,89a-c
Rio Piquiri	17,33c-e	21,36gh	0,91a-c	0,94a
Col 13	20,57b-e	23,56f-h	0,88b-d	0,91a-c
Carioca	18,77b-e	37,23b-e	0,82ef	0,85a-c
Carioca 80	13,43e	35,34c-e	0,81f	0,83a-c
Negro Argel	18,90b-e	39,78b-d	0,83d-f	0,93ab
Xodó	17,40c-e	28,88d-g	0,84d-f	0,85a-c

(1) Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

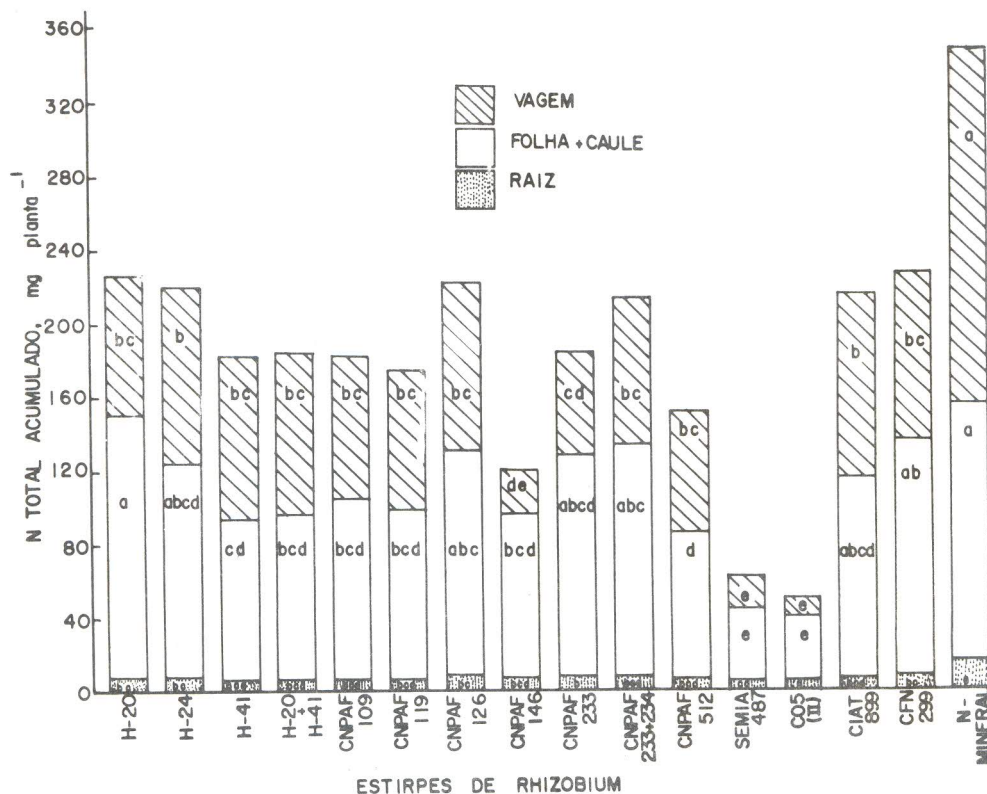


Figura 4. N total acumulado, até os 52 dias após a emergência, nas raízes, folhas, caules e vagens de feijão cv. Negro Argel, inoculado com quinze estirpes de *Rhizobium* ou recebendo 10mg N. planta⁻¹. Médias de três repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

baixa atividade (Quadro 5). Nessa coleta, a eficiência relativa ainda continuou bastante elevada (Quadro 5). Os cultivares também diferiram pouco em relação ao processo de senescência dos nódulos. Preto Cariri e SNC 480 apresentaram, em média, 77% dos nódulos ativos (Quadro 4).

O N total das plantas nessa época (folha + caule + raiz + vagem) mostrou que os cultivares que mais se destacaram foram Carioca e Negro Argel (Figura 6), acumulando cerca de 170mg N.planta⁻¹. A grande maioria deles, ou seja, 22-14, 22-24, 22-34, 22-50, 22-55, 21-58, SNC 480, Puebla 152, CPP₂48, Col 513, Carioca 80 e Xodó acumularam quantidades semelhantes de N, entre 120 e 155mg N.planta⁻¹. Mostraram também bom desempenho Ica Pijão, 1896 e 22-52, que acumularam entre 108 e 118mg N.planta⁻¹. O pior desempenho ficou com Preto Cariri, IAPAR 16 e Rio Piquiri, que acumularam entre 44 e 70mg N.planta⁻¹.

DISCUSSÃO

Algumas estirpes de *Rhizobium* empregadas, como a H-20, H-24 e CIAT 899, não mostraram os sintomas visuais típicos de deficiência de N no início do ciclo vegetativo, e suas taxas de redução do acetileno foram bastante elevadas aos 17 dias após a emergência, quando comparadas com as estirpes usadas amplamente e

recomendadas nos inoculantes comerciais: SEMIA 487 e CO5 II. Quando comparadas com as plantas que receberam N mineral, porém, essas estirpes acumularam cerca de 50% menos N total na planta, mostrando que tais plantas ainda estavam limitadas nessa fase inicial pelo N, conforme foi observado por Williams et al. (1981).

Logo após essa coleta, houve um incremento acentuado na atividade da nitrogenase até o florescimento, o que também foi observado por Hungria et al. (1985a) e Hungria & Neves (1986) e que provavelmente ocorre devido a um estímulo hormonal (Graham & Halliday, 1977). Aos 38 dias após a emergência, o N total acumulado por estirpes eficientes, como CNPAF 233 + 234, não foi estatisticamente diferente (P = 0,05) do N total acumulado pelas plantas que receberam N mineral (Figura 3), já sendo observado, porém, um início de senescência dos nódulos.

No período médio de enchimento dos grãos, aos 52 dias após a emergência, constatou-se uma aceleração drástica no processo de senescência dos nódulos, resultando na queda da atividade da nitrogenase. Esse declínio após o florescimento é ainda mais drástico sob condições de campo (Franco et al., 1979, CNPAF, 1984) e, embora tenha sido atribuído, desde os anos trinta, a uma competição por fotossintetizados entre os nódulos e os órgãos reprodutivos, hoje se acredita que esteja relacionado com estímulos hormonais (Neves & Hungria, 1987). As estirpes, porém, também podem afetar a taxa de senescência dos nódulos (Hungria &

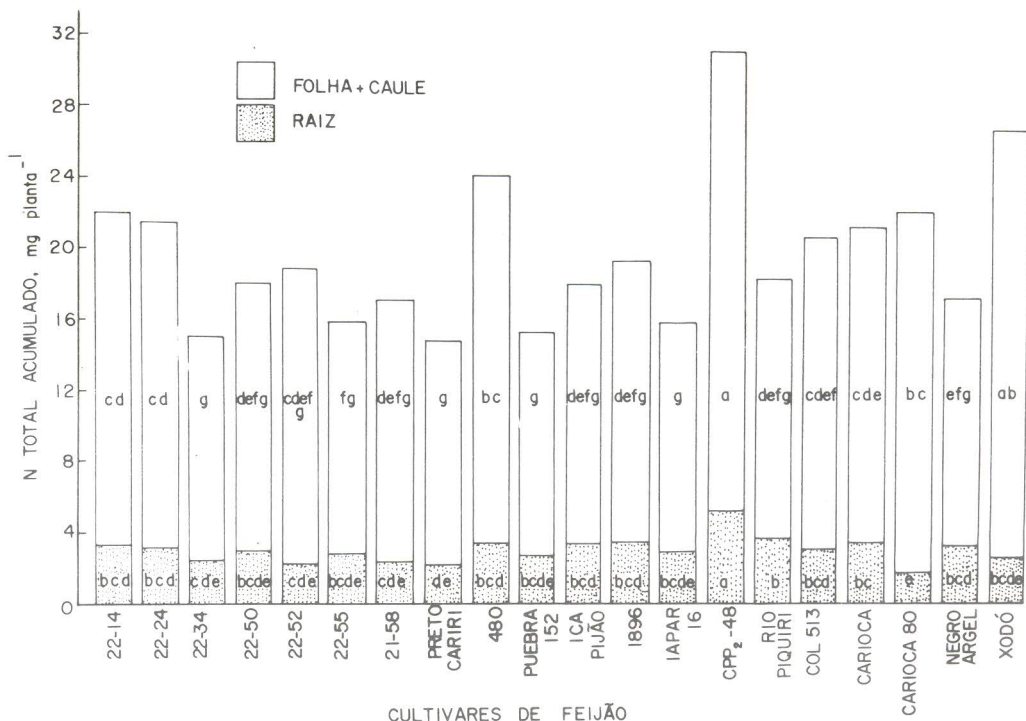


Figura 5. N total acumulado, até os 17 dias após a emergência, em vinte cultivares de feijão inoculados com cinco estirpes de *Rhizobium* (H-20, CIAT 899, CNPAF 119, CNPAF 126 e SEMIA 487). Médias de três repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

Franco, 1988, e Boddey & Hungria⁽⁶⁾ e algumas delas, como H-41 e CNPAF 233 + 234, caracterizaram-se pela maior atividade da nitrogenase e menor senescência dos nódulos.

Nessa coleta, constatou-se novamente que as plantas estavam limitadas, embora menos drasticamente, pelo N, e que as melhores estirpes acumularam cerca de 30% menos N do que as plantas que receberam fertilizantes, mostrando haver certa recuperação dessas estirpes em relação à testemunha nitrogenada.

As condições deste experimento, porém, foram extremas, uma vez que se pretendia selecionar estirpes altamente eficientes. Por isso, não se adicionou nenhum N mineral às plantas noduladas. Em um experimento conduzido anteriormente, com a adição de 2,5mg N.planta⁻¹, representando o N do solo que é liberado durante o crescimento das plantas, não se encontrou diferença no N total entre essas plantas e as não noduladas recebendo 10mg de N.planta⁻¹.dia⁻¹ (Hungria et al., 1985a). Devido às condições estéreis em vasos de Leonard, que limitam o crescimento das plantas até o final do ciclo, também não se pôde colher as sementes, mas diversos experimentos, contudo, têm mostrado que o N proveniente da fixação é mais facilmente incorporado nas sementes do que o N mineral, tanto em feijão (Hungria et al., 1985b, Dubois & Burris, 1986) como em soja (Imsande, 1986).

Os resultados deste experimento, porém, confirmam que existe o potencial de seleção de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* que apresentam fixação e translocação do N fixado mais precoces

(Voss, 1981, Barradas & Hungria⁽⁵⁾ e senescência mais tardia dos nódulos (Hungria & Franco, 1988, Boddey & Hungria⁽⁶⁾).

A avaliação de vinte cultivares de feijão promissores para a fixação de N₂ e inoculados com uma mistura de boas estirpes mostrou que, embora houvesse um destaque pequeno para o 'Carioca' e 'Negro Argel', o desempenho dos demais foi relativamente uniforme e somente 'Preto Cariri', 'IAPAR 16' e 'Rio Piquiri' apresentaram baixa fixação do N₂. Embora estejam sendo conduzidos alguns programas de seleção do feijoeiro para a fixação do N₂, os resultados aqui obtidos confirmam a complexidade dessa seleção, uma vez que os dois cultivares com melhor fixação, Carioca e Negro Argel, como observado anteriormente (Hungria & Neves, 1986b) não são provenientes dos cruzamentos resultantes desses programas.

Conforme foi apresentado, a fixação do N₂ em feijoeiro tem como uma de suas principais limitações o ciclo curto da cultura (Hungria & Neves, 1986). Os dados obtidos nos dois experimentos feitos em condições de casa de vegetação com vasos de Leonard,

(5) BARRADAS, C.A.A. & HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. I - Precocidade para nodulação e fixação do nitrogênio. Turrialba, Costa Rica (in press, 1988).

(6) BODDEY, L.H. & HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. II - Senescência tardia dos nódulos. Turrialba, Costa Rica (in press, 1988).

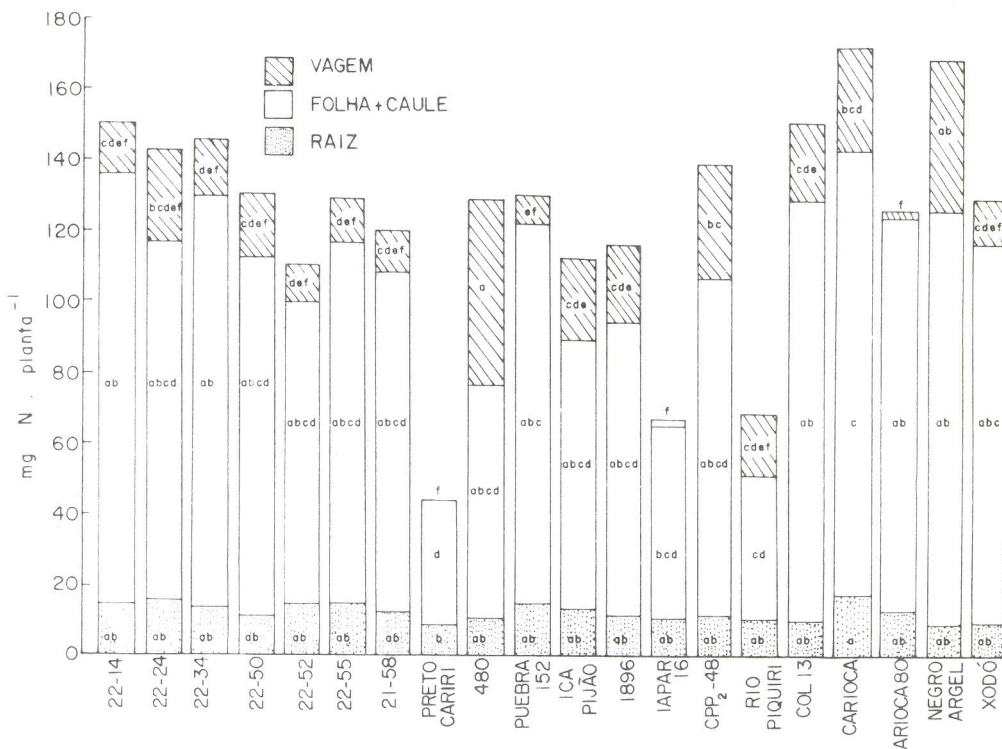


Figura 6. N total acumulado, até os 45 dias após a emergência, em vinte cultivares de feijão inoculados com cinco estirpes de *Rhizobium* (H-20, CIAT 899, CNPAF 119, CNPAF 126 e SEMIA 487). Médias de três repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

mostraram, porém, que existe um potencial muito grande para seleção tanto de cultivares como de estirpes que apresentem nodulação e fixação do N_2 precoces e senescência tardia dos nódulos, indicando um caminho para tornar essa cultura, a exemplo da soja, independente da aplicação de N mineral. Uma avaliação do material contrastante se faz necessária em campo, para confirmação dos resultados obtidos, inclusive em condições de competição com outras estirpes de *Rhizobium* e com a microflora nativa do solo.

AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo auxílio financeiro.

LITERATURA CITADA

- BODDEY, R.M.; PEREIRA, J.A.R.; HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J. & NEVES, M.C.P. Methods for the study of nitrogen assimilation and transport in grain legumes. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotech.*, Hull, UK, 3:3-32, 1987.
- BURTON, J.C. Pragmatic aspects of the Rhizobium: leguminous plant association. In: NEWTON, W.E. & NYMAN, C.J., eds. *Proceeding of the First International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington, State Univ. Press., 1974. v.1, p.429-446.
- CARTWRIGHT, P.M. The effect of combined nitrogen on the growth and nodulation of excised roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Bot.*, London, 31:309-321, 1967.
- CNPAF (Centro de Pesquisa de Arroz e Feijão). Relatório Científico. Goiânia, EMBRAPA, 1984. p.313-332.
- DÖBEREINER, J. Present and future opportunities to improve the nitrogen nutrition of crops through biological fixation. In: AYANABA, A. & DART, P.J., eds. *Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics*. New York, John Wiley, 1977. p.1-12.
- DÖBEREINER, J. Fixação biológica do nitrogênio em gramíneas. *Interciência*, Caracas, 4:200-205, 1979.
- DUBOIS, J.D. & BURRIS, R.H. Comparative study of N uptake and distribution in three lines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at early pod filling stage. *Pl. Soil*, Hague, 93:79-86, 1986.
- FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C. & NEYRA, C.A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. *Pl. Physiol.*, Bethesda, 63:421-424, 1979.
- GRAHAM, P.H. & HALLIDAY, J. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. In: VINCENT, J.M., ed. *Exploiting the legume - Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. Hawaii, College of Tropical Agriculture, 1977. p.313-334. (Miscel. Publ., 145)
- HUNGRIA, M. & FRANCO, A.A. Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris*. *Trop. Agric.*, Trinidad, 65(4):341-346, 1988.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 21:127-140, 1986a.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Ontogenia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 21:715-730, 1986b.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. & VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio em feijoeiro. I - Atividade da nitrogenase, da nitrate redutase e transporte de N seiva do xilema. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 9:193-200, 1985a.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. & VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. II - Absorção e translocação do N mineral e do N_2 fixado. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 9:201-209, 1985b.
- HUNGRIA, M. & THOMAS, R.J. Effects of cotyledons and nitrate on the nitrogen assimilation of *Phaseolus vulgaris*. *MIRCEN J.*, *Appl. Microbiol. Biotech.*, Hull, UK, 3:411-419, 1987.
- IMSANDE, J. Ineffective utilization of nitrate by soybean during pod fill. *Physiol. Plant*, Copenhagen, 689-694, 1986.
- NEVES, M.C.P. & HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *CRC Crit. Rev. Pl. Sci.*, Boca Raton, 6:267-321, 1987.
- RIGAUD, J. Comparison on the efficiency of nitrate and nitrogen fixation in crop yield. In: BEWLEY, J.S., ed. *Nitrogen and carbon metabolism*. The Hague, Martinus Nijhoff, p.2405-2408, 1981.
- SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulation symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington, 73:1207-1211, 1976.
- SPRENT, J. & THOMAS, R.J. Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. *Pl. Cell Environ.*, Oxford, 7:637-645, 1984.
- SUTTON, W.D. Nodule development and senescence. In: BROUGHTON, W.J., ed. *Nitrogen fixation*. Oxford, Clarendon Press, 1983. v.3, p.144-212.
- VINCENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell, 1970. 164p. (Int. Biol. Program handb., 15)
- VINCENT, J.M. Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In: QUISPÉL, A. *The Biology of nitrogen fixation*. Amsterdam, North Holland Publishers, 1974. p.265-341.
- VOSS, M. Seleção de *Rhizobium phaseoli* de regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, UFRGS, 1981. 75p. Tese (Mestrado)
- WESTERMAN, D.T. & KOLAR, J.J. Symbiotic N_2 (C_2H_2) fixation by bean. *Crop. Sci.*, Madison, 18:986-990, 1978.
- WILLIAMS, L.E.; de JONES, T.M. & PHILLIPS, D.A. Carbon and nitrogen limitations on soybean seedling development. *Pl. Physiol.*, Bethesda, 68:1206, 1981.