**INTERAÇÃO *Rhizobium*/FEIJOEIRO SOB AS CONDIÇÕES DE
AGRICULTURA DE SUBSISTÊNCIA NA REGIÃO DE CUNHA-SP**

WLADECIR SALLES DE OLIVEIRA
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz” da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Microbiologia
Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Oliveira, Wladecir Salles de

Interação *Rhizobium* feijoeiro sob as condições de agricultura de subsistência na região de Cunha-SP / Wladecir Salles de Oliveira. -- Piracicaba, 1996.

68p. : il.

Dissertação (mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Rizóbio - Feijão - Interação 2. Bactéria fixadora de nitrogênio 3. Feijão - Nutrição
I. Título

CDD 635.652
589.95

**INTERAÇÃO *Rhizobium*/FEIJOEIRO SOB AS CONDIÇÕES DE
AGRICULTURA DE SUBSISTÊNCIA NA REGIÃO DE CUNHA-SP**

WLADECIR SALLES DE OLIVEIRA

Aprovado em 30.10.96

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Domingos Fornazzieri

FMVJA/UNESP

Prof. Dr. Antonio Luiz Fancelli

ESALQ/USP

Prof^ª Dr^ª Siu Mui Tsai

CENA/USP

Prof^ª Dr^ª Siu Mui Tsai

Orientador

Dedico a

Minha esposa, Patrícia, minha
filha, Bia e a meus pais, Rubens e
Leticia, pelo apoio e estímulo.

Agradeço

- À Dra Siu Mui Tsai, pela orientação;
- Aos Agricultores do município de Cunha-SP, que participaram do trabalho;
- À Casa da Lavoura de Cunha-SP, pelo apoio e incentivo;
- À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade;
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelo apoio ao trabalho desenvolvido;
- Ao Chiquinho e Seu Mário pela ajuda durante os experimentos;
- Aos Mestrandos e Doutorandos da Seção de Microbiologia e Biologia Molecular;
- A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 - O município de Cunha e a cultura do feijoeiro.....	3
2.2 - Nutrição mineral do feijoeiro.....	5
2.3 - Hospedeiro.....	8
2.4 - Microssimbionte.....	12
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 - Experimento 1 - Comportamento produtivo de uma cultivar crioula de feijoeiro sob condições melhoradas de solo na região de Cunha - SP.....	15
3.2 - Experimento 2 - Monitoramento da infectividade nodular de estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> geneticamente transformadas em uma cultivar crioula e uma comercial de feijoeiro.....	18
3.2.1 - Obtenção de estirpes de <i>Rhizobium</i> geneticamente marcadas.....	20
3.2.2 - Identificação da estirpe formadora do nódulo.....	22
3.3 - Experimento 3 - Cultivares de feijoeiro sob condições controladas de casa-de-vegetação.....	23
3.4 - Experimento 4 - Cultivares de feijoeiro sob condições parcialmente controladas de solo.....	25
4- RESULTADO E DISCUSSÃO.....	28
4.1 - Experimento 1 - Capacidade produtiva de uma cultivar crioula de feijoeiro sob condições melhoradas de solo na região de Cunha - SP.....	28
4.2 - Experimento 2 - Monitoramento da infectividade nodular de estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> geneticamente transformadas em uma cultivar crioula e uma comercial de feijoeiro.....	30

4.3 - Experimento 3 - Cultivares crioulas de feijoeiro sob condições controladas de casa-de-vegetação.....	36
4.4 - Experimento 4 - Cultivares crioulas de feijoeiro sob condições parcialmente controladas de solo.....	42
5 - CONCLUSÕES.....	58
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Porcentagens de nódulos de feijoeiro, cultivares Carioca 80 SH e Serro Azul, infectadas pela estirpe CM-255 CelB, inoculada em solo de baixada (1) e de morro (2). Média de quatro repetições.....	34
2. Porcentagens de nódulos de feijoeiro, cultivares Carioca 80 SH e Serro Azul, infectadas pela etirpe CIAT-899 Cel B, inoculada em solo de baixada (1) e de morro (2). Média de quatro repetições.....	34
3. Porcentagens de nódulos de feijoeiro, cultivares Carioca 80 SH e Serro Azul, infectadas pela estirpe CM-255 GusA e CIAT-899 CelB, inoculadas em solo de baixada. Média de quatro repetições.....	35
4. Porcentagens de nódulos de feijoeiro, cultivares Carioca 80 SH e Serro Azul, infectadas pela estirpe CM-255 GusA e CIAT-899 CelB, inoculadas em solo de morro. Média de quatro repetições.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Análise química das amostras de solo das quinze propriedades escolhidas para instalação do experimento no município de Cunha-SP. (1) solo de baixada, (2) , solo de morro.....	16
2. Necessidade de calcário e fertilizante, para a correção da acidez e deficiência mineral, do solo das quinze propriedades estudadas no município de Cunha-SP.	17
3. Solução nutritiva (-) nitrogênio, proposta por SARRUGE (1970).....	19
4. Meios de cultura utilizados para o processo de conjugação bacteriana (SESSITSCH, 1995).....	21-22
5. Solução tampão para coloração dos nódulos formados pelas bactérias geneticamente marcadas.....	23
6. Concentrações de antibióticos (kanamicina, cloranfenicol, neomicina e estreptomicina), em meio de cultura para isolamento de células resistentes.....	27
7. Efeito dos fatores cultivar, calagem e molibdênio, sobre os parâmetros matéria seca da parte aérea, número de nódulos e rendimento de grãos, sob condições de campo, Média de quinze repetições.....	28
8. Análise da variância dos dados de nodulação obtidos em três tempos de amostragens, no experimento 2. Média de quatro repetições.....	31

9. Dados médios relativo ao efeito dos fatores sobre a variável número de nódulos avaliada aos 21, 35 e 45 dias após semeadura. Média de quatro repetições.....	32
10. Análise da variância dos dados de nodulação obtidos aos 25 e 45 dias após semeadura, no experimento 3. Média de quatro repetições.....	37
11. Dados médios relativos ao efeito dos fatores cultivares e estirpes sobre as variáveis número de nódulos, matéria seca dos nódulos, peso médio dos nódulos, atividade da enzima nitrogenase, matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio da parte aérea, nitrogênio total e eficiência relativa, aos 25 dias após semeadura, obtidos no experimento 3. Média de quatro repetições.....	38-39
12. Dados médios relativos ao efeito dos fatores cultivares e estirpes sobre as variáveis número de nódulos, atividade da enzima nitrogenase, matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio da parte aérea, nitrogênio total e eficiência relativa, aos 45 dias após semeadura, obtidos no experimento 3. Média de quatro repetições.....	40
13. Análise da variância dos dados de nodulação obtidos aos 21, 45 e 90 dias após semeadura, no experimento 4. Média de quatro repetições.....	43
14. Dados médios relativos ao efeito dos fatores solo, estirpe e cultivar sobre os parâmetros número de nódulos, atividade da enzima nitrogenase, matéria seca da aérea, porcentagem de nitrogênio, nitrogênio total e eficiência relativa, aos 21 dias após semeadura, obtidos no experimento 4. Média de quatro repetições.....	44

15. Estudo da capacidade produtiva de três cultivares crioulas e uma comercial, sob condições parcialmente controladas. Dados médios relativos ao efeito dos fatores solo, estirpe e cultivar sobre os parâmetros número de nódulos, atividade da enzima nitrogenase, matéria seca da aérea, porcentagem de nitrogênio, nitrogênio total e eficiência relativa, aos 45 dias após semeadura, obtidos no experimento 4. Média de quatro repetições.....	45
16. Estudo da capacidade produtiva de três cultivares crioulas e uma comercial, sob condições parcialmente controladas. Dados médios relativos ao efeito dos fatores solo, estirpe e cultivar sobre o parâmetro rendimento de grãos, aos 90 dias após semeadura, obtidos no experimento 4. Média de quatro repetições.....	46
17. Efeito da interação solo x estirpe sobre o número de nódulos, atividade da nitrogenase e porcentagem do nitrogênio, aos 21 dias após semeadura, obtida no experimento 4.....	51
18. Efeito da interação solo x estirpe sobre o número de nódulos, atividade da nitrogenase, matéria seca da parte aérea, porcentagem do nitrogênio e nitrogênio total , aos 45 dias após semeadura, obtida no experimento 4.....	52
19. Efeito da interação solo x estirpe sobre a produção de grãos, aos 90 dias após semeadura, obtida no experimento 4.....	53
20. Efeito da interação solo x cultivar sobre a atividade da nitrogenase e porcentagem de nitrogênio, aos 21 dias após semeadura e atividade da nitrogenase, aos 45 dias após semeadura, obtida no experimento 4.....	54
21. Efeito da interação estirpe x cultivar sobre a atividade da nitrogenase aos 21 e 45 dias após semeadura, obtida no experimento 4.....	55

INTERAÇÃO *Rhizobium*/FEIJOEIRO SOB AS CONDIÇÕES DE AGRICULTURA DE SUBSISTÊNCIA NA REGIÃO DE CUNHA-SP

Autor: Wladecir Salles de Oliveira

Orientadora: Siu Mui Tsai

RESUMO

O baixo rendimento do feijoeiro na região de Cunha-SP, está associada a problemas locais como topografia acidentada, doenças endêmicas, baixa fertilidade natural dos solos e técnicas de cultivo rudimentares. Foram estudadas práticas agronômicas convencionais a fim de se identificar técnicas de cultivo que viessem minimizar as doenças, maximizar a fixação biológica de nitrogênio, diminuir os efeitos da baixa fertilidade do solo, sobre o rendimento e nodulação do feijoeiro. Resultados encontrados em 15 propriedades estudadas, demonstraram que a utilização do calcário associada a aplicação do molibdênio, via foliar, foi suficiente para aumentar o rendimento da cultivar crioula Serro Azul e da comercial Carioca 80 SH. Em adição ao aumento de produtividade, foi observado aumento substancial da nodulação.

Estirpes recombinantes de *Rhizobium tropici* (CM-255 GusA e CIAT-899 CelB) foram testadas em amostras do solo provenientes do município de Cunha-SP, sob condições controladas. Os resultados indicaram que as estirpes estudadas tiveram boa capacidade em se associar com as quatro cultivares de feijoeiro estudadas. A utilização da adubação básica, molibdênio e calagem foi essencial para o aumento da nodulação das estirpes introduzidas bem como das estirpes nativas do solo. Ainda, sob condições de baixa fertilidade do solo, foi observada baixa nodulação e produção de grãos para as cultivares crioulas Serro Azul e Serro Azul Brilhante, quando associadas as estirpes indicadoras ou as estirpes nativas. Todavia, a melhoria das condições de fertilidade propiciou significativo aumento, da nodulação e rendimento do feijoeiro.

ANALYSIS OF *Rhizobium*/BEAN INTERACTIONS UNDER SUBSISTENCE FARMING SYSTEM IN THE CUNHA-SP REGION.

Author: Wladecir Salles de Oliveira

Adviser: Siu Mui Tsai

SUMMARY

Poor bean yield associated with low agronomic inputs, plant disease, and soil erosion lead to slash-and-burn farming in the Cunha region of Mata Atlântica ecosystem in the state of São Paulo, Brazil. To identify sustainable farming practices that minimize bean disease and maximize biological N₂ fixation, the effects of soil fertility and plant cultivar on seed yield and root nodule formation were measured under standard agronomic practices. Results from 15 sites showed that fertilizing with lime and molybdenum increased seed yields for the landrace Serro Azul. In addition to increased yields, plants grown with fertilizer had more nodules.

A recombinant derivative of *Rhizobium tropici* (CM-255 GusA and CIAT-899 CelB) was tested under controlled environments. Our results indicate that the studied strains had a great capability to associate with the four bean varieties tested. Fertilization with PKS+ molybdenum and liming were essential for a better nodulation of the indicator strains and native rhizobia. We observed that under low fertility, the landrace cultivars Serro Azul and Serro Azul Brilhante (variant of Serro Azul) were poorly nodulated and seed yield, when associated with native strains or with the indicator strain (CM-255 and CIAT-899). However, nodulation and seed yield of landrace cultivars under better soil fertility were increased.

1 - INTRODUÇÃO

O feijoeiro é cultivado, praticamente, em todos os estados brasileiros, com o objetivo de garantir a subsistência dos agricultores e de seus familiares ou, de forma intensiva, sob condições de média a alta tecnologia. Estima-se que, aproximadamente, 34% da produção do feijoeiro no Brasil origina-se de propriedades menores que 10 ha, em sistemas de produção rudimentar, refletindo em baixa produtividade (CIAT, 1989). Na região do Vale do Paraíba, mais especificamente no município de Cunha, dos 4.000 produtores rurais cadastrados junto ao INCRA, 95% são pequenos produtores, que em função do isolamento e condições topográficas locais mantiveram as mesmas atividades econômicas da época colonial (feijão, milho e pecuária). A produção comercial do feijoeiro, através deste sistema tem apresentado forte redução devido a vários fatores. Por outro lado, vem crescendo o número de produtores de feijão mais tecnificados, nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Goiás (BANNO, 1995).

Tendo em vista as exigências na melhoria do rendimento, o programa de melhoramento do feijoeiro tem priorizado determinadas características agronomicamente desejáveis, muitas vezes, em detrimento de características essenciais, como adaptação local ou fixação biológica de nitrogênio (BULISANI, 1987; HUNGRIA & ARAUJO, 1994). A partir de 1975, com o lançamento de sementes de feijão, grupo Carioca, no estado de São Paulo, e sua ampla aceitação pelo mercado consumidor, levou ao relativo abandono de cultivares de outros grupos, entretanto, em determinadas regiões o grupo carioca não se adaptou adequadamente. A baixa produtividade de cultivares do grupo Carioca na região de Cunha-SP, grupo este recomendado pela Secretaria de Agricultura do Estado, é consequência da acidez do solo, baixa fertilidade e doenças fúngicas endêmicas,. Este quadro tem desestimulado o agricultor devido as constantes frustrações

de safras com o passar dos anos. Até a década de 80 a área cultivada com o feijoeiro no município de Cunha era de 4.500 ha, já no ano de 1993, apenas 450 ha.

Os poucos agricultores que continuam com a cultura do feijoeiro cultivam parte de sua lavoura com cultivar do grupo Carioca, guardando outra parte para cultivares de comprovada adaptação local que, garantidamente, lhe proveem o sustento, mas que dificilmente alcançam bons preços no mercado. Tais cultivares são semeadas com sementes próprias, e que, ano a ano vêm desaparecendo. Esta contínua substituição de cultivares locais, associada ao melhoramento visando única e exclusivamente, atender fatores de preferência mercadológicos tem levado a forte erosão genética que poderá, num futuro próximo, vir a fazer falta. Contudo, Também a presença de Al^{+3} tóxico, elevada acidez e baixa fertilidade natural dos solos são fatores limitantes a cultura na região, sendo que a maioria absoluta dos agricultores não utilizam a prática da calagem e de fertilizante minerais, por implicar em custos financeiros, além de suas posses.

O estudo de formas alternativas para o cultivo do feijoeiro sob condições comumente ocorrentes em Cunha-SP e no alto Vale do Paraíba, em função do caráter social da cultura, é essencial para a melhoria da produtividade.

Entre os produtores locais, existe grande heterogeneidade no que diz respeito ao conhecimento e aceitação de novos conceitos. Muitas vezes, conceitos como: semeadura em linha, adubação verde, aração em nível, vão na contra-mão dos seus conceitos tradicionais de uso do solo, transformando-se numa difícil tarefa de convencimento.

O uso de técnicas culturais como controle fitossanitário de pragas e doenças, adubação com macro e micronutrientes, inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio e outros, necessitam de estudo local para a comprovação dos seus resultados, para que possam ser adaptados por parte dos agricultores.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi o de identificar alternativas para a produção do feijoeiro sob as condições edafo-climáticas do município de Cunha-SP, utilizando técnicas de baixo custo capazes de proporcionarem aumento econômico de produção. Para isso os trabalhos serão conduzidos sob condições naturais de campo, em condições de casa-de-vegetação. Da mesma forma, comparou-se a capacidade produtiva de cultivares de adaptação comprovada no local com cultivar Carioca 80 SH.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - O município de Cunha e a cultura do feijoeiro

O município de Cunha está localizado na região leste do estado de São Paulo, no alto Vale do Paraíba, próximo à divisa do estado do Rio de Janeiro (URURARY, 1975). Sua distribuição fundiária é representada basicamente por pequenas propriedades rurais onde as culturas de feijão e milho, e atividades como a pecuária, vieram em substituição à cultura do café, as quais são mantidas nos dias atuais nos mesmos níveis tecnológicos de exploração dos tempos antigos (SOUZA, 1975). Assim como nas regiões circunvizinhas, sul de Minas Gerais e sul do Rio de Janeiro (OLIVEIRA *et al.*, 1980), o agricultor de Cunha mantém a tradição do plantio do feijão “casado” (consorciado com o milho) e, em menor proporção, o feijão solteiro no plantio das águas, ambos cultivados com sementes próprias. O uso de técnicas rudimentares, na cultura do feijoeiro, implica em baixa produtividade e, conseqüente, reduzida lucratividade. No entanto, estima-se que 34% da produção de feijão no Brasil seja originária de propriedades menores que 10 ha, cultivadas com sementes próprias e sob tecnologia rudimentar. O consumo per capita do feijão no Brasil, é de 14 kg/ano, sendo importante fonte de proteína e energia, principalmente para a população de baixa renda, incluindo neste contexto os próprios agricultores que praticam o cultivo de subsistência (CIAT, 1989).

A moderna tecnologia disponível para a produção do feijoeiro implica em troca drástica de tradição de cultivo (SORIA *et al.*, 1975), ou muitas vezes é, simplesmente inexequível, por seus custos financeiros e/ou condições climáticas e topográficas de algumas regiões vigentes.

FRANCIS & SANDERS (1978), trabalhando com o cultivo do feijoeiro e milho consorciado ou solteiro, observaram elevada vantagem econômica (4:1) do cultivo solteiro em relação ao cultivo consorciado, com melhor aproveitamento da mão-de-obra

familiar. Os autores observaram ainda, que a falta de estudos mais aprofundados em relação as interações da cultura com o solo e clima, para tais condições, implica em alta probabilidade de quebra de safra por doenças, distúrbios nutricionais ou adaptação de cultivares.

A contribuição dos pequenos agricultores, embora em franco declínio, ainda é de extrema importância, e no caso do fornecimento de tecnologia apropriada para seus recursos e necessidade, sua contribuição poderia aumentar consideravelmente.

O valor médio pago pela saca do feijão vem se mantendo em patamares estáveis a partir da década de 80, em torno de 35 dólares a saca (FEALQ, 1996). No entanto, os preços em moeda corrente deflacionada do Brasil, apresentaram redução de 60% do valor da saca no mesmo período. Por outro lado, os insumos, registraram aumento de até 40% em dólar, durante o mesmo período.

Em áreas rurais como as de Cunha, onde é comum a prática da agricultura de subsistência o uso de fertilizantes é muito reduzido, (BRODRICK *et al.*, 1992) ou muitas vezes, quando utilizado, este o é de forma inadequada. VARGAS (1987), estudando a aplicação de N em solos de topografia acentuada, não obteve êxito devido a fatores climáticos. Por outro lado, o autor aponta que a exportação de macro e micronutrientes, não repostos via adubação, poderão vir a inviabilizar áreas para cultivo futuro devido a deficiências nutricionais. O acúmulo de fatores que interferem nos processos biológicos, a perda da matéria orgânica e as alterações físicas, provocam a degradação do solo no sistema de subsistência, sendo definida por SIQUEIRA *et al.* (1994), como: “Declínio da qualidade e da capacidade produtiva do solo causado pelo mau uso do mesmo pelo homem”.

Sob condições de cultivo de subsistência, a melhoria na disponibilidade de nutrientes, como o nitrogênio, através da fixação biológica, apresenta, sem dúvida, aumento significativo na produtividade (VARGAS, 1987). Segundo BANNO, (1995), a somatória dos fatores adversos no cultivo do feijoeiro é responsável pela baixa produtividade no Brasil, ou seja, 700 kg/ha na safra das águas e 400 kg/ha na safra da seca. Em linhas gerais, o cultivo de subsistência, segundo BONETTI *et al.* (1984), é limitante para o aumento da fixação biológica de nitrogênio e consequente aumento da

produtividade devido aos índices de produtividade alcançados, em função do nível tecnológico utilizado.

2.2 - Nutrição mineral do feijoeiro

Na região de Cunha-SP os solos se caracterizam-se por baixa fertilidade natural, pH em torno de 4,5 e topografia acentuada. Segundo VINCENT (1975), deficiências minerais são fatores limitantes à produtividade e da fixação biológica de nitrogênio. Além das necessidades nutricionais para o seu próprio desenvolvimento, as leguminosas, mais especificamente o feijoeiro, necessitam de uma certa concentração de nutrientes, suficiente para o equilíbrio da simbiose feijoeiro-*Rhizobium*. Para O'HARA (1988), a baixa concentração de cálcio, limita a multiplicação do *Rhizobium* na rizosfera do feijoeiro; a de cobalto afeta a formação dos nódulos; a de boro afeta o desenvolvimento dos nódulos e a de molibdênio ou ferro afeta a eficiência da fixação biológica.

Vários trabalhos relacionam a fixação biológica de nitrogênio com a utilização de nutrientes minerais em feijoeiro. TSAI *et al.* (1993 b), verificaram elevada correlação entre a fertilização com P, K e S e fixação biológica de nitrogênio. TEIXEIRA (1994) também mostra a forte relação simbiótica entre feijoeiro e *Rhizobium* em função de diferentes níveis de P no solo. Outros trabalhos demonstraram a eficiência da calagem tanto para a correção da acidez do solo quanto ao fornecimento de cálcio para o macro e microsimbionte (FRANCO & DAY, 1980; FRANCO & MUNNS, 1981). No entanto, pouco tem sido realizado visando solucionar o problema para o cultivo de subsistência. A adição de nitrogênio na forma de fertilizante é dispendiosa e, muitas vezes, ineficiente principalmente devido a perdas do elemento causada por práticas culturais inadequadas. Segundo RUSCHEL *et al.* (1979) e GRAHAM (1981), o uso de 40 a 60 kg de N/ha, é suficiente para suprimir a fixação biológica do nitrogênio. Por outro lado, conforme demonstrado por SISTACHS (1970), sob baixas concentrações de nitrogênio poderá ocorrer estímulo ao processo de nodulação. Em trabalho realizado com solução nutritiva, VAKHANIYA *et al.* (1991), observaram aumento da eficiência relativa da

fixação biológica de nitrogênio, quando aplicada à solução pequena quantidade de nitrogênio (5,25 mg/L de N).

Existem várias cultivares de feijoeiro com alto potencial para a interação efetiva com o *Rhizobium*, no entanto, exigem a adição de pequenas quantidades de nitrogênio e outros nutrientes na fase inicial do desenvolvimento da cultura. TSAI *et al.* (1993 a), encontraram correlação significativa para os parâmetros número de nódulos e matéria seca da parte aérea, em função do aumento da fertilização com P, K e S e baixas concentrações de N. Com o incremento da concentração de N, encontraram supressão da fixação do nitrogênio atmosférico.

Segundo RONZELLI *et al.* (1984), existem várias fórmulas de adubo comercial utilizados na cultura do feijoeiro, porém, nenhuma tão difundida entre os pequenos agricultores como a fórmula 4 - 14 - 8. Tendo em vista que a aplicação média de adubo é de 200 kg/ha, concluíram que, embora desconhecendo o fato, os pequenos agricultores fazem a adubação, valendo-se de pequenas quantidades de nitrogênio, o que é favorável à fixação biológica desse elemento.

Para estudos do aumento da eficiência da fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro é de grande importância a avaliação da influência de fatores exógenos que determinam a eficiência do processo tais como: concentração de nitrato no solo, responsável pela repressão ao processo de nodulação e molibdênio, responsável pela eficiência da absorção do nitrato e fixação do nitrogênio atmosférico, via simbiose (VAKHANIYA *et al.*, 1991).

Em solo com concentração satisfatória de molibdênio, porém ácido, pode ocorrer a carência do molibdênio pela sua fixação no solo e consequente indisponibilidade à planta e aos microrganismos (VIEIRA *et al.*, 1992). A calagem por sua vez, é suficiente para liberar o Mo, no entanto, pode ser mais fácil e barato controlar sua carência através de aplicação foliar.

AMANE (1994), trabalhando com adubação nitrogenadas (0, 20 no sulco, 20 em cobertura, 20 no sulco + 20 em cobertura, kg/ha) e molíbdica (0 e 20 g/ha) aplicada no sulco de plantio e/ou em cobertura, encontrou diferenças significativas para o teor de nitrogênio da folha e na produção de grãos a favor do tratamento com nitrogênio em

cobertura e molibdênio na semeadura. Por outro lado, VIEIRA *et al.* (1994), não encontraram resposta à adubação molíbdica e nitrogenada para o plantio do feijoeiro, sob pivô central, para a cultivar Carioca comum.

Para VIEIRA (1994), a aplicação do molibdênio na concentração de 40 g/ha, via foliar, utilizada nas condições de solo da região de Viçosa e Coimbra - MG, suficiente para substituir a adubação nitrogenada completamente para a cultivar Ouro Negro 1992. Segundo a autora, esse fato é devido ao incremento da fixação biológica de nitrogênio favorecida pelo Mo.

Segundo FRANCO & MUNNS (1991) e VIEIRA (1994), o parcelamento da aplicação do molibdênio, via foliar, proporciona além do efeito já descrito, a manutenção da atividade da enzima nitrogenase. No entanto, não impede que, após o florescimento do feijoeiro, evidencie uma queda na atividade da nitrogenase, mas garante um patamar superior aquele obtido na ausência desse micronutriente.

BERGER *et al.* (1995), avaliaram a aplicação de molibdato de amônio nas doses 0, 15, 30, 60 e 120 g/ha, aos 49 e 56 dias após a emergência, período considerado tardio, e obtiveram melhores resultados entre 70 e 90 g / ha. SFREDO *et al.* (1995), trabalhando com soja em latossolo roxo, pH 5,15, não observaram diferenças significativas entre a aplicação de molibdênio, via foliar, ou, via solo, porém ambas apresentaram-se significativamente superiores à testemunha.

CORREIA *et al.* (1991), encontraram efeito positivo no número de grãos por vagem e rendimento da cultivar Carioca comum, com o uso de molibdênio e cobalto nas concentrações de 14 e 0,6 g/ha, respectivamente, aplicados junto ao inoculante, em Latossolo Vermelho Escuro.

Outro importante ponto a ser considerado, diz respeito à concentração do molibdênio na semente. MEAGHER *et al.* (1952), verificaram ser 0,50 µg Mo/semente é suficiente para suprir os requerimentos para o crescimento de *Pisum sativum* e *Phaseolus vulgaris* por uma geração. No entanto, JACOB NETO & FRANCO (1986), consideraram ser 3,50 µg/semente como quantidade necessária para garantir as necessidades de uma geração para o feijoeiro. BRODRICK *et al.* (1992), trabalhando com sementes de diversas cultivares, com alta (1,50 a 7,30 µg Mo/semente) e baixa concentração de

molibdênio (0,07 a 1,40 $\mu\text{g Mo/semente}$), concluíram haver diferenças entre as cultivares quanto ao nível de molibdênio necessário para o seu desenvolvimento.

2.3 - Hospedeiro

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) representa importante fonte protéica para a população brasileira, em especial a de baixa renda. O feijoeiro no Brasil é cultivado sob condições de alta tecnologia, com rendimento médio de até 3.500 kg/ha e sob condições de baixa tecnologia com rendimento médio de 500 kg/ha (BANNO, 1995).

A baixa produtividade do sistema conhecido como de baixa tecnologia é consequência da falta de assistência técnica e pesquisa para a produção sob tais condições. Como consequência, resulta em deficiências nutricionais, doenças, pragas e produção de baixa qualidade.

Segundo BULISANI (1987), existem mais de 36.000 materiais diferentes catalogados no CIAT, sendo 85% de *Phaseolus vulgaris*. No IAC - Instituto Agrônomo de Campinas existem mais de 1.500 cultivares de feijoeiro catalogadas. Segundo o mesmo autor o potencial produtivo do feijoeiro varia de 900 a 5000 kg/ha.

A duração do ciclo da cultura varia com o hábito de crescimento do feijoeiro (ARAÚJO & HUNGRIA, 1994). Segundo VILHORDO *et al.* (1980), essa planta pode ser subdividida em quatro grupos, em função do seu hábito de crescimento: - tipo I - Crescimento determinado, porte arbustivo, com ramificação ereta, fechada; - tipo II - Crescimento indeterminado, porte semi-arbustivo, com ramificação ereta, fechada; - tipo III - Crescimento indeterminado, porte semi-arbustivo, com ramificação aberta; - tipo IV - Crescimento indeterminado, prostrado ou trepador.

Para o Brasil, mais especificamente nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, o cultivo do feijoeiro é feito basicamente com cultivares de cores e em menor escala com cultivares de grãos pretos. Esses materiais podem ser classificados basicamente como do grupo II e grupo III. Dentre os feijões cultivados no Município de Cunha, destacam-se: Grupo preto (preto uberabinha); Grupo mantegão (mantegão fosco e rajadão); Grupo

mulatinho (cara suja e serro azul); Grupo rosinha (mãezinha) e Grupo diversos (Carioca 80 SH e Emgopa Ouro), com hábitos de crescimento variado.

Embora, aos produtores de feijão em geral, seja indicado o fornecimento de nitrogênio na forma mineral e/ou orgânica, o feijoeiro poderia suprir parcialmente ou totalmente sua demanda, através da fixação biológica. Mesmo assim, até alguns anos não fazia parte do objeto de estudo dos melhoristas, sendo atualmente um dos fatores que mais tem sido estudado no feijoeiro.

→ Segundo o boletim informativo EMBRAPA (1993), o nitrogênio deve ser aplicado no feijoeiro em virtude do descrédito na capacidade de fixação simbiótica para a obtenção de produção satisfatória. Entretanto, inúmeros outros trabalhos tem demonstrado ser viável a fixação biológica do nitrogênio para o feijoeiro (GRAHAM, 1978; SILVA *et al*, 1993; TSAI *et al*, 1993a; PEREIRA *et al.*, 1984; TEIXEIRA, 1994). A limitação da fixação biológica de nitrogênio é resultado de fatores ambientais associado ao uso de sementes geneticamente melhoradas sob condições de alta disponibilidade de nitrogênio no solo (TEIXEIRA, 1994). Entretanto a cultura do feijoeiro, conforme descrito por GRAHAM & ROSAS (1977) e GRAHAM (1981), apresenta grande variabilidade entre cultivares quanto a capacidade de fixação de nitrogênio. GRAHAM (1978), comparou mais de 600 cultivares quanto a capacidade de nodulação e fixação biológica de nitrogênio. O mesmo autor, observou que as cultivares trepadoras fixam mais nitrogênio do que as cultivares arbustivas devido ao ciclo tardio. Observou também que quanto maior o tempo para a floração e enchimento das vagens maior a concentração de nitrogênio via simbiose, podendo em certos casos satisfazer até 100% das necessidades. O mesmo foi constatado por outros autores como FRANCO *et al.* (1979) e HARDARSON & DANSO (1993). VARGAS (1987), observou, além de variabilidade da fixação biológica de nitrogênio entre genótipos, não haver resposta satisfatória a aplicação de nitrogênio (150 kg de N/ha) devido a perdas por fatores climáticos.

De uma forma geral, SILVA *et al.* (1993) e TSAI *et al.*(1993a), classificam o feijoeiro como capaz de fixar de 20 a 60 kg de N/ha, por ciclo cultural. HARDARSON & DANSO (1993), observaram em diferentes partes do mundo que o feijoeiro foi capaz

de fixar de 30 a 70 % do nitrogênio necessário ao seu ciclo sendo os valores mais altos relacionados às condições ambientais favoráveis. PEREIRA *et al.* (1984), trabalhando com 339 cultivares classificaram como genótipos médio, quanto à capacidade de fixação biológica de nitrogênio (média nodulação e média resposta a adubação), as cultivares Carioca 80 SH, Serro Azul e Cara Suja (grupo mulatinho).

Alguns autores consideram, fundamental a presença de pequenas quantidades de nitrogênio para que a fixação biológica se estabeleça em níveis satisfatórios. SILVA *et al.* (1993), trabalhando à campo com 10 kg de N/ha, conseguiram ótimo estabelecimento da nodulação com substancial aumento da fixação biológica de nitrogênio e produtividade. Neste experimento o feijoeiro foi capaz de fixar até 30 kg de N/ha.

Com relação à interação planta x hospedeiro, pode-se observar certa divergência quanto a opinião dos autores. NUTMAM (1967), qualifica como limitante apenas o genótipo da planta, considerando o microssimbionte como agente passivo. SAITO (1982) e TSAI *et al.* (1993a), descrevem a utilização de estirpes de *Rhizobium*, demonstraram resultados positivos no aumento da matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio e rendimento de grãos. WOLYN *et al.* (1989), demonstraram ser a nodulação secundária em raízes laterais como importante fator adicional a eficiência simbiótica, encontrando aumento significativo para a produção de sementes.

De uma forma mais abrangente, PEREIRA *et al.* (1989), consideram que a fixação biológica do nitrogênio, quando eficiente, é dependente tanto de genótipos de feijoeiro quanto de estirpes mais eficientes.

O programa de melhoramento do feijoeiro, segundo Bulisani (1987), visa o incremento de características agronomicamente desejáveis, muitas vezes em detrimento de características essenciais como a fixação biológica de nitrogênio. Historicamente os programas de seleção do feijoeiro na América Latina tem priorizado a obtenção de cultivares com altos índices de produtividade e responsivas a adubação nitrogenada (TSAI *et al.*, 1993a).

São poucos os estudos de herdabilidade e interação genótipo x ambiente conduzidos com respeito a fixação biológica de nitrogênio pelo feijoeiro, principalmente em condições de campo (HUNGRIA & ARAÚJO, 1994). Segundo VINCENT (1975), o

trabalho de campo possibilita a identificação de resultados efetivos de nodulação e consequente fixação do nitrogênio atmosférico, com a precisão do exame da associação entre bactéria e hospedeiro em meio completo e natural.

Segundo HUNGRIA & ARAÚJO (1994), um dos métodos mais simples para o aumento da fixação do nitrogênio atmosférico e consequente produtividade seria a identificação de “landraces” (mistura de linhagens puras que são cultivadas há longo tempo pelos agricultores), com alta capacidade de fixação biológica de nitrogênio e adaptação à região a qual venha sendo cultivada.

A base mais direta para a quantificação da eficiência da fixação biológica do nitrogênio, segundo VINCENT (1975) é a quantificação do nitrogênio total da planta. Seja através de quantificação através de titulação ou através de métodos como a relação ^{15}N - ^{14}N . Quando as condições experimentais favorecem a situação, onde o nitrogênio assimilado é o principal fator limitante, a simples determinação do peso da planta é, provavelmente, o mais adequado. O rendimento da planta e o nitrogênio total estão, na realidade, muito correlacionados.

DUQUE *et al.* (1985), demonstraram que somente a observação da nodulação não é suficiente para a seleção de genótipos superiores quanto a fixação biológica do nitrogênio. PEREIRA *et al.* (1984), não encontraram correlação entre a nodulação precoce e a eficiência da fixação biológica de nitrogênio em 339 cultivares analisadas.

Existem outros métodos diretos e indiretos para a quantificação da fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA & ARAÚJO, 1994). Porém, a utilização de cada um dos métodos encontra-se restrita ao objetivo do estudo devido a dificuldade para a execução de algumas análises: - atividade da enzima nitrogenase; atividade da enzima hidrogenase (HUP^+); atividade da enzima fosfoenol piruvato carboxilase; atividade da enzima glutamina-sintetase, glutamato-sintetase; sensibilidade a asparagina em meio de cultura; teor de leghemoglobina; transporte de ureídeos; precocidade e senescência tardia dos nódulos e estirpes mais competitivas e eficientes.

2.4 - Microssimbionte

A inoculação de sementes do feijoeiro com estirpes de *Rhizobium* constitui-se numa prática agrícola capaz de substituir, em parte ou totalmente, a fertilização com nitrogênio mineral. Entretanto, fatores como a competição por sítios de infecção nodular com estirpes nativas já estabelecidas no solo ou mesmo, condições adversas como acidez do solo, deficiência hídrica e outros, podem afetar a colonização do solo pela estirpe desejada (VARGAS *et al.* 1990).

Muitos casos de insucesso da inoculação são atribuídos à baixa competitividade das estirpes de *Rhizobium* utilizadas, as quais não são capazes de prevalecer no nódulo do hospedeiro. Até 1994, todas as estirpes que nodulavam feijão eram denominadas *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*; atualmente são conhecidas mais duas espécies, o *Rhizobium tropici* e o *Rhizobium etli*, as quais se diferem da primeira e entre si devido a diferenças morfológicas, fisiológicas e cromossômicas. As estirpes de *Rhizobium tropici* e *Rhizobium etli*, não possuem instabilidade genética como a *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, sendo mais recomendadas para estudos em programa de melhoramento (HUNGRIA & ARAÚJO, 1996).

Algumas estirpes de *Rhizobium tropici* como a CIAT-899 são consideradas como promissoras e tolerantes à acidez (O'HARA *et al.* 1988; VARGAS & GRAHAM, 1989), ou ainda a estirpe CM-255, citada por FAGGIANI (1995). Estirpes de reconhecida eficiência quanto à competitividade nodular e eficiência simbiótica vem sendo comumente utilizadas nos trabalhos relacionados à interação feijoeiro-*Rhizobium*. VIEIRA (1994), descreve trabalho realizado em locais onde estirpes nativas de *Rhizobium* são capazes de nodular eficientemente o feijoeiro aumentando, desde que adequadamente manejada, a sua eficiência simbiótica.

O uso do *Rhizobium* é hoje uma prática comum na agricultura, cujo objetivo é proporcionar a fixação do nitrogênio atmosférico em simbiose com leguminosas. Quando estirpes autóctones são introduzidas em ambientes naturais, existe competição. Vários são os métodos utilizados para identificar o potencial de competição de estirpes promissoras, dentre os quais pode-se citar a resistência intrínseca a antibióticos, perfil

plasmidial, perfil protéico, sorologia e fenotipagem radicular (O'HARA *et al.*, 1988; HUNGRIA & ARAÚJO, 1994). Atualmente, o método utilizando o potencial dos marcadores moleculares de características fenotípicas tem sido muito utilizado (AKKERMANS *et al.*, 1994; WILSON, 1995; WILSON *et al.*, 1994; STREIT *et al.* 1992; STREIT *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1995).

Estes marcadores conhecidos como gene repórter são utilizados em ecologia microbiana para facilitar a detecção de bactérias individualmente marcadas, com rápido reconhecimento. Existem vários genes repórter utilizados atualmente, conforme compilado por WILSON (1995): LAC Z, codifica a enzima B-galactosidase; Gus A, codifica a enzima B-glucuronosidase; Lux AB, codifica a enzima luciferase; pho A, codifica a enzima fosfatase alcalina; xyl E, codifica a enzima catecol 2,3-dioxigenase; tfd A, codifica a enzima 2,4-diclorofenoxiacetato monoxigenase e via operon, codifica as enzimas da biossíntese da violaceína. Um dos marcadores mais utilizados é o Gus A.

Segundo JEFFERSON *et al.* (1986), a atividade da enzima B-glucuronosidase é codificada pelo gene Gus A, proporcionando na presença do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-glucuronide, uma coloração azul, formada através da utilização do açúcar pela bactéria seja no interior do nódulo ou em placa de petri. Segundo SESSITSCH (1995) a mesma enzima é capaz de degradar também o substrato 6-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-glucuronide produzindo uma coloração magenta tanto em nódulos quanto em placa de petri.

O plasmídio suicida pKW107, transporta o fragmento Gus A inserido no transposon Tn5, formando o transposon Tn5GusAKW107 introduzido na bactéria *Escherichia coli* (WILSON *et al.*, 1991). O transposon transfere ainda resistência a níveis de kanamicina e neomicina. Esse potencial pode ser transferido para estirpes de *Rhizobium* através da conjugação bacteriana.

Segundo WILSON *et al.* (1995), além do *Rhizobium*, outras bactérias (*Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Azospirillum*) e fungos (*Saccharomyces*, *Schizosacharomyces*, *Aspergillus*, *Neurospora* e *Ustilago*) receberam a marcação com Gus A para estudos ecológicos.

Estudos de nodulação e competitividade vem sendo realizados em feijoeiro, utilizando-se do marcador Gus A (STREIT *et al.*, 1992; STREIT *et al.*, 1995). Segundo STREIT *et al.* (1995), a expressão do marcador é consistente durante os primeiros dias da vida do nódulo até a senescência, próximo dos 30 dias, quando da floração. Por se tratar de atividade enzimática, os nódulos formados pela bactéria, quando senescidos, não expressam ou expressam em pequena escala a coloração. O autor confirmou seus dados utilizando-se do método ELISA, para comparação. Outro marcador, o Lac Z, vem sendo utilizado com muito sucesso para estudos de infecção de nódulos por *Rhizobium* (BOIVIN *et al.*, 1990). O gene Lac Z, segundo DRAHOS *et al.* (1986), codifica a expressão da enzima B-galactosidase que na presença do substrato (X-Gal) 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-Galactoside proporciona uma coloração azul dos nódulos ou das colônias de bactéria em placa de petri. A obtenção de estirpes de *Rhizobium* Lac Z é realizada através da conjugação bacteriana com a *Escherichia coli* Tn5LacZKW107.

Todavia, a aplicação do gene lac Z requer cuidado, visto que em algumas plantas e fungos pode-se encontrar, naturalmente, a enzima B-galactosidase ativa; porém, ainda não foi detectada sua expressão em feijoeiro (BOIVIN *et al.*, 1990).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi subdividido em quatro experimentos, sendo o primeiro conduzido sob condições de campo no município de Cunha - SP e os demais sob condições controladas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura em Piracicaba - SP.

3.1 - Experimento 1 - Comportamento de uma cultivar crioula de feijoeiro sob condições melhoradas de solo na região de Cunha.

O experimento foi conduzido durante a safra 94/95, em quinze propriedades distribuídas pelo município de Cunha, com tradição no cultivo do feijoeiro, nas quais foram selecionadas sete áreas planas de baixada e oito áreas declivosas (morro).

O clima na região de Cunha, caracteriza-se por chuvas entre o período de outubro e março, que representa mais de 80% da precipitação anual, sendo esta, correspondente a 1241 mm. A temperatura média diária varia entre 30,5 °C e 14,5 °C. e, durante o período de chuva, a média da temperatura oscila entre 30,3 °C e 17,6 °C.

Os solos da região de Cunha são classificados como Podzólico com Cascalho, Podzólico Vermelho-Orto e Latossolo Vermelho-Amarelo, estando a análise química a 0-20 do solo, na Tabela 1. A correção da acidez do solo foi realizada através do uso de calcário dolomítico, aplicado 90 dias antes da semeadura (Julho/94), utilizando-se da dose capaz de elevar a saturação de bases para 60% (Tabela 2).

A adubação básica foi realizada na proporção de 200 kg/ha de 4-14-8, complementada com fósforo (superfosfato simples) e potássio (cloreto de potássio), conforme necessidade identificada pela análise de solo (Tabela 2). A adubação suplementar foi realizada através de aplicação foliar de 40 g/ha de molibdênio, dividida em duas aplicações; aos 25 e 45 dias após plantio.

Em cada uma das propriedades foi instalado um bloco do experimento no delineamento fatorial 2^3 , onde foram avaliados os efeitos dos fatores cultivar de feijoeiro (Carioca 80 SH e Serro Azul), calagem (ausência e calagem) e molibdênio (ausência e 40 g/ha), em parcelas de 1,50 m x 0,70 m com espaçamento de 0,40 m entre linhas e 0,05 m entre plantas. Instalou-se o experimento dentro das lavouras dos agricultores.

Tabela 1 - Análise química das amostras de solo das 15 propriedades escolhidas para instalação do experimento dentro do município de Cunha - SP. (1), solo de baixada, (2), solo de morro.

Locais	pH	P-resina*	K*	Ca*	S*	Mg*	H+Al*	M.O.*
								*
Alfredo (1)	4,65	7,70	0,08	1,26	1,80	0,30	4,01	2,17
Dalmo Leite (1)	5,15	13,10	0,29	2,37	3,20	0,15	3,08	3,03
Silvio Leite (1)	4,65	20,70	0,33	1,39	2,00	0,13	5,22	2,54
Valdo Neco (1)	5,35	13,70	0,53	3,24	4,60	0,27	3,25	3,16
José Roque (2)	4,45	5,00	0,13	1,36	1,90	0,31	6,79	3,40
José Eduardo (1)	4,70	101,30	0,13	1,19	1,80	0,54	7,95	4,09
Ademar (1)	4,20	5,60	0,41	4,07	5,20	0,11	6,79	3,34
Roberto (2)	4,70	29,00	0,19	1,00	1,40	0,20	10,91	3,71
João Bento (1)	4,20	20,50	0,15	1,88	2,70	0,22	12,78	3,16
Isaias (2)	4,55	5,20	0,12	0,40	0,70	0,17	18,47	2,91
Zé do Chico (2)	4,30	4,70	0,40	1,15	1,90	0,51	8,84	4,45
Mané Jango (1)	4,40	4,10	0,14	0,28	0,50	0,12	20,52	2,42
Mané Jango (2)	4,60	2,90	0,13	0,88	1,30	0,40	13,47	1,79
João Batista (2)	4,75	7,40	0,09	0,61	1,00	0,37	7,16	3,34
Jonas Lopes (2)	4,15	4,31	0,15	1,28	1,80	0,33	4,01	2,66

* - Medidas em cmol/dm^3 de solo. **MO - Matéria Orgânica em porcentagem.

As sementes utilizadas foram: Carioca 80 SH, semente certificada, adquirida da Casa da Agricultura de Cunha, e Serro Azul, adquirida junto a um produtor rural, sendo esta última, uma semente de baixo valor cultural.

O preparo do solo foi realizado através de tração animal, conforme realizado tradicionalmente na região e a semeadura, realizada em linhas perpendiculares ao declive do terreno, na proporção de 500.000 plantas/ha, com o objetivo de alcançarmos um estande final de 250.000 plantas/ha, em virtude de problemas como: baixo valor cultural da semente crioula e alta incidência de doenças e pragas na germinação. O controle de plantas daninhas foi realizado duas vezes através de capina. A adubação suplementar foi realizada juntamente com o trato fitossanitário com a aplicação dos compostos Metamidophós e Mancozeb.

Tabela 2 - Necessidade de calcário e fertilizante, para correção da acidez, e deficiência mineral do solo das quinze propriedades estudadas no município de Cunha - SP.

Local (Propriedades)	Calcário* (t / ha)	Fertilizante (kg / ha)		
		4 - 14 - 8	P ₂ O ₅	K ₂ O
1	1,85	200	1,80	0,29
2	0,61	200	1,80	0,08
3	2,58	200	-	-
4	0,14	200	1,80	-
5	3,72	200	-	-
6	4,51	200	-	-
7	2,22	200	-	-
8	6,63	200	-	-
9	7,32	200	0,60	1,29
10	11,98	200	2,90	0,29
11	5,50	200	-	-
12	13,47	200	-	-
13	8,36	200	2,90	0,29
14	4,32	200	1,80	-
15	1,86	200	-	-

* - Calcário Dolomítico PRNT = 90,1

Foram realizadas duas amostragens, aos 35 e 90 dias após plantio. A primeira amostragem, foi feita através da coleta de uma linha de 1,00 m por parcela, sendo a parte

aérea destacada do sistema radicular próximo à base do caule. Para a coleta do sistema radicular, o solo foi revolvido até a profundidade de 0,30 m. A parte aérea foi acondicionada em sacos de papel e transferidas para estufa secadora com ventilação forçada, durante 72 horas a 70° C, sendo posteriormente determinado o peso da matéria seca. O sistema radicular, foi devidamente lavado e em seguida procedeu-se a contagem dos nódulos.

3.2 - Experimento 2 - Monitoramento da infectividade nodular de estirpes de *Rhizobium tropici* geneticamente marcadas em uma cultivar crioula e uma comercial de feijoeiro.

Amostras de solo de Cunha-SP, aproximadamente 6 m³, oriundas de duas áreas de cultivo, uma de morro (nº 13) e outra de baixada (nº 12), foram coletadas e conduzidas para o CENA-USP em Piracicaba -SP.

O experimento foi conduzido sob condições de casa-de-vegetação, durante os meses de janeiro a março de 1996. As amostras de solo foram acondicionadas em frascos plásticos, tipo vaso de Leonard, com capacidade para 1,50 L, os quais, após lavados, foram desinfetados com álcool 70° GL, para evitar possíveis contaminações. A correção da acidez do solo foi realizada através da adição de calcário dolomítico, PRNT-90.1, conforme análise do solo. A adubação foi realizada através do fornecimento de solução nutritiva, conforme proposta por SARRUGE (1975), acrescida de 3 mM de nitrogênio na forma de nitrato de amônio (Tabela 3), a qual foi substituída semanalmente.

Tabela 3 - Solução nutritiva (-) nitrogênio, proposta por SARRUGE (1975).

Composto Químico	Concentração (mM)
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄	2
KCl	5
CaCl ₂	5
Solução de Micronutrientes*	1
Solução de Fe-EDTA**	1

* Composição (g / L) - H₃BO₃, 2,86; MnCl₂·4H₂O, 1,81; ZnCl₂, 0,10; CuCl₂, 0,04 e H₂MoO₄·H₂O, 0,02.

** Composição - EDTA, 26,1 g; Fe₂SO₄·7H₂O, 24,9 g; NaOH, 286 ml; completar a 1 litro com água dest.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial, com quatro repetições, onde foram avaliados os efeitos dos fatores cultivares de feijoeiro (Carioca 80 SH e Serro Azul) , estirpes de *Rhizobium* (CIAT-899 Cel B, CM-255 Cel B e CIAT-899 Cel B + CM-255 Gus⁺) e solo (Morro - n°.13, Baixada - n°.12).

Os inoculantes, foram preparados em meio YM (Tabela 4) e incubados à temperatura ambiente sob agitação constante, durante quatro dias, sendo posteriormente veiculado em turfa autoclavada a 1,5 atm, durante 20 minutos. Em cada frasco foram utilizadas duas sementes viáveis, as quais, foram desinfetadas com álcool 70° GL durante três minutos e hipoclorito de sódio 0,02% durante três minutos, sendo posteriormente lavadas com água destilada e esterilizada, por quatro vezes sucessivas. A inoculação das sementes foi realizada colocando-se as sementes em contato com o a turfa inoculada, duas horas antes da semeadura.

Foram realizadas três amostragem, aos 21, 35 e 45 dias após germinação, onde foram avaliados os parâmetros nodulação e porcentagem dos nódulos infectados através do método dos marcadores moleculares de características fenotípicas.

3.2.1 -Obtenção das estirpes de *Rhizobium* geneticamente marcadas.

Estirpes de Rhizobium Gus A - Obtida através de conjugação bacteriana, segundo protocolo proposto por SESSITSCH (1995). A bactéria doadora do gene Gus A, *Escherichia coli* S17-1/X-pir (pmTn5SGusA10), foi multiplicada em meio LB (Tabela 4), acrescido de 50 µg / mL de espectinomicina, enquanto que a estirpe de *Rhizobium* receptora foi multiplicada em meio YM. Posteriormente, 5 mL de cada cultura foram centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos. As células concentradas foram colocadas em novos 5 mL de meio YM, sendo novamente centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm. Após remoção do sobrenadante, as células da bactéria doadora foram colocadas em 1 mL de meio YM e as células da bactéria receptora em 0,25 mL de meio YM.

Foram colocados em placas de Petri (YMA), 100 µL de cada suspensão de células, incubadas por 24 horas. A mistura de bactérias, foi ressuspensa em 2 mL de água estéril e transferida para tubos de diluição com solução salina a 0,9 % de NaCl (10x, 100x, 1000x). Aliquotas das diluições da suspensão de células foram transferidas para placas de Petri, contendo meio B & D (Tabela 4), acrescido de 50 µg / mL de espectinomicina, onde, devido a fonte de carbono restritiva ao crescimento da *Escherichia coli* e os níveis de espectinomicina restritivos ao crescimento do *Rhizobium* nativo, apareceram apenas colônias de *Rhizobium* portadoras do marcador que lhe transfere, também, resistência aos níveis do antibiótico utilizado.

Estirpes de Rhizobium Cel B - A obtenção de estirpes de *Rhizobium* marcadas com o gene Cel B, foi realizada nos laboratórios da FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology, Soil Unit, pela Dra. Angela Sessitsch.

Tabela 4 - Meios de cultura utilizados para o processo de conjugação bacteriana (SESSITSCH, 1995).

Luria Broth (LB) modificado

Composto Químico	Concentração (g / L)
Bacto-triptona	10,00
Extrato de levedura	5,00
NaCl	5,00
Ágar	15,00
Água destilada	1 L

Yeast Manitol (YM) modificado

Composto Químico	Concentração (g / L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,10
NaCl	0,10
KH ₂ PO ₄	0,20
K ₂ HPO ₄	0,80
Manitol	10,00
Extrato de Levedura	1,00
Agar (YMA)	15,00
Água destilada	1 L

Brown & Dilworth (BD) modificado

Conposto Químico	Concentração (mg / L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	250,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	20,00
NaCl	200,00
KH ₂ PO ₄	360,00
K ₂ HPO ₄	1450,00
FeCl ₃	6,60
EDTA	0,15
Tiamina.HCl	1,00
Ca pantotenato	2,00
Biotin	0,25
Água destilada	1L

3.2.2 - Identificação da estirpe formadora do nódulo.

Após coleta e lavagem do sistema radicular, os nódulos foram destacados e acondicionados em tubos estéreis contendo solução tampão (Tabela 5) acrescida de 100 µg / mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactoside), para identificação dos nódulos formados por estirpes Cel B. A seguir, foram submetidos à vácuo durante 15 minutos, sendo posteriormente mantidos durante 12 horas em incubadora a 37° C.

Após contagem dos nódulos coloridos, substituiu-se a solução contendo o substrato X-Gal, por nova solução tampão, acrescida agora de 50 µg / mL de X-Gluc (6-bromo-4-cloro-3-indolil-B D-Glucoronide), para a identificação dos nódulos formados por estirpes GusA. Então, foram submetidas à vácuo durante 15 minutos, sendo posteriormente mantidos durante 12 horas em incubadora a 37° C.

A contagem dos nódulos foi realizada após a coloração dos mesmos. Os nódulos formados pela estirpe CIAT-899 Cel B, ficaram azuis; os nódulos formados pela estirpe

CM-255 Gus A, ficaram magenta e, finalmente, os nódulos formados pelas estirpes nativas do solo mantiveram a sua coloração natural.

Tabela 5 - Solução tampão para coloração dos nódulos formados pelas bactérias geneticamente marcadas.

Composto Químico	Concentração (g / L)
SDS	0,30
EDTA	1,50
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	2,70
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	10,90
Água destilada	1 L

3.3 - Experimento 3 - Cultivares de feijoeiro sob condições controladas de casa-de-vegetação.

No presente experimento foi verificado o desempenho de estirpes de *Rhizobium* comumente utilizadas em trabalhos de avaliação da fixação biológica de nitrogênio e uma estirpe de *Rhizobium* isolada no ambiente de Cunha-SP, interagindo com quatro cultivares de feijoeiro.

O experimento foi conduzido sob condições de casa-de-vegetação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, em Piracicaba - SP, durante os meses de setembro a março de 1995. Utilizou-se para tanto, vermiculita expandida lavada, adicionada a areia lavada, na proporção de 1:1, como substrato para o desenvolvimento do feijoeiro. Após devidamente homogeneizado, o substrato foi autoclavado durante duas horas a 125° C e 1,5 atm. O substrato foi acondicionado em frascos plásticos, tipo vaso de Leonard, com capacidade para 1,50 L, esterelizados com álcool 70° GL.

A adubação foi realizada através do fornecimento de solução nutritiva, conforme SARRUGE (1975), acrescida de 3 mM de nitrogênio na forma de nitrato de amônio,

para os tratamentos com inoculação, e 10 mM para o tratamento testemunha nitrogenada (Tabela 3). Ressalta-se que a solução dos vasos foi substituída, quando necessário.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial, com quatro repetições, onde foram avaliados os efeitos dos fatores cultivar de feijoeiro (Carioca 80 SH, Serro Azul Fosco, Serro Azul Brilhante e Serro Azul Malhado) e estirpes de *Rhizobium* (CIAT-899, CM-255, Cunha-1 e 10 mM de N).

Os inoculantes, foram preparados em meio YM (Tabela 4) e incubados à temperatura ambiente, sob agitação constante, durante quatro dias, sendo posteriormente veiculados em turfa autoclavada a 1,5 atm durante 20 minutos. Foram utilizadas duas sementes viáveis por frasco, que foram desinfetadas com álcool 70° GL durante três minutos, e com hipoclorito de sódio a 0,02% durante três minutos, sendo posteriormente lavadas com água destilada e esterilizada, por quatro vezes sucessivas. A inoculação das sementes foi realizada conforme relatado no experimento 2.

Foram realizadas duas amostragens, aos 25 e 45 dias após germinação. Foram avaliadas, na primeira amostragem, os parâmetros número de nódulos, matéria seca dos nódulos, peso médio dos nódulos, matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio na matéria seca, nitrogênio total, atividade da enzima nitrogenase e eficiência relativa. Na segunda amostragem foram avaliados os mesmos parâmetros menos matéria seca dos nódulos e peso médio dos nódulos.

A parte aérea da planta foi separada do sistema radicular à altura da base do caule, sendo acondicionada em sacos de papel e levada à estufa de ventilação forçada a 60° C, durante 72 horas. O sistema radicular foi colocado em frascos hermeticamente fechados. Extraíu-se 50 ml de ar do interior do frasco e, imediatamente, injetou-se 50 mL de acetileno, deixando a amostra em repouso durante 30 minutos. Após, extraíu-se de cada frasco, uma amostra de 0,50 mL de ar, com seringa hipodérmica, a qual foi injetada em cromatógrafo de gás (Beckman GC-65) à temperatura de 125° C, com detetor, coluna Porapak N a 50 °C. A obtenção da eficiência relativa da atividade da enzima nitrogenase, foi obtida conforme descrito por SCHUBERT & EVANS (1976).

O sistema radicular, foi devidamente lavado para a contagem e retirada dos nódulos, os quais foram acondicionados em tubos de vidro levados à estufa. Após

secagem, tanto a parte aérea quanto os nódulos foram pesados. Posteriormente, a parte aérea foi moída para determinação da porcentagem do nitrogênio, através da digestão ácida e avaliação por colorimetria em fluxo automatizado.

3.4 - Experimento 4 - Cultivares de feijoeiro sob condições parcialmente controladas de solo.

Avaliou-se o desempenho de três cultivares crioulas (Serro Azul Brilhante, Serro Azul Malhado e Serro Azul Fosco) de feijoeiro e uma cultivar comercial (Carioca 80 SH), inoculadas com estirpes recomendadas e estirpe isolada, sob condição de tambores contendo solo de Cunha.

O experimento foi instalado em 40 tambores de 0,25 m² de área e 100 L de capacidade. O experimento foi conduzido durante os meses de outubro a dezembro de 1995.

A correção da acidez do solo foi realizada através da adição de calcário dolomítico, nas quantidades descritas na Tabela 2, 60 dias antes da semeadura. A adubação do solo foi realizada conforme necessidade evidenciada pela análise de solo. Para o tratamento testemunha (+ nitrogênio), foi acrescida a quantia de 54 kg / ha de nitrogênio, na forma de uréia, com o objetivo de complementar a recomendação de 60 kg / ha. O experimento foi instalado 90 dias após a adição do calcário ao solo. O tratamento testemunha é considerado o solo sem adição de estirpes de *Rhizobium*.

As cultivares crioulas, originárias de Cunha, bem como a cultivar comercial, foram multiplicadas em condições ótimas de casa-de-vegetação, para que fossem obtidas sementes oriundas do mesmo ambiente. Durante o processo de multiplicação, foram realizados cruzamentos entre as cultivares, com o objetivo futuro do estudo de herança de características desejáveis.

O experimento foi instalado em blocos inteiramente casualizados, onde foram avaliados os efeitos dos fatores cultivares de feijoeiro (Carioca 80 SH, Serro Azul Fosco,

Serro Azul Brilhante, Serro Azul Malhado), estirpes de *Rhizobium* (CIAT-899, CM-255, Cunha-1, testemunha e (60 kg / ha de N) e, solo (Morro - nº.13, Baixada - nº. 12).

Foram semeados, por tambor, quatro sementes de cada cultivar. As sementes foram desinfetadas com álcool 70° GL durante três minutos, hipoclorito de sódio 0,02% durante três minutos, sendo posteriormente lavadas em água destilada, por quatro vezes. A inoculação das sementes foi realizada conforme descrito no experimento 2.

Os inoculantes, foram preparados em meio YM (Tabela 4) e incubados à temperatura ambiente sob agitação constante, sendo posteriormente veiculados em turfa autoclavada a 1,5 atm, durante 20 minutos.

O controle de plantas daninhas foi realizado manualmente. A irrigação foi realizada, quando necessária, com água filtrada. Foram realizadas duas adubações suplementares, aos 21 e 35 dias após semeadura, através da aplicação de 20 g / ha de molibdênio, na forma de molibdato de amônio. Juntamente a adubação, foi realizado o trato fitossanitário com a aplicação dos produtos Metamidophós e Mancozeb.

Foram realizadas três amostragens, aos 21, 35 e 90 dias após germinação. A primeira amostragem, realizada no período inicial do desenvolvimento vegetativo, fez-se com as amostras do primeiro bloco, onde foram avaliados os parâmetros número de nódulos, resistência intrínseca a antibiótico, matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio na parte aérea, nitrogênio total e eficiência relativa. A segunda amostragem, realizada na época de floração, foi feita com as amostras do segundo bloco, onde foram avaliados os parâmetros número de nódulos, matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio na parte aérea, nitrogênio total e eficiência relativa. A terceira amostragem, realizada após a secagem das vagens, foi feita com amostras do terceiro e quarto blocos, onde foi avaliada o rendimento de grãos.

A parte aérea da planta foi separada do sistema radicular à altura da inserção do caule, sendo acondicionada em saco de papel e levada à estufa de ventilação forçada a 60° C, durante 72 horas. O sistema radicular foi colocado em frasco de vidro de 0,50 L, hermeticamente fechado. Extraíu-se 50 mL de ar do interior de cada frasco e imediatamente, injetou-se 50 mL de acetileno, deixando a amostra em repouso durante 30 minutos. Após, extraíu-se de cada frasco uma amostra de 0,5 mL de ar, com seringa

hipodérmica, a qual foi injetada em cromatógrafo de gás (Beckmam GC-65), á temperatura de 125° C, com detetor, coluna Porapak N á 50°C. A obtenção da eficiência relativa da atividade da nitrogenase foi obtida, conforme descrito por SCHUBERT & EVANS (1976).

O sistema radicular foi devidamente lavado para contagem dos nódulos e retirada de 50 nódulos de uma das repetições de cada tratamento, para a amostragem aos 21 dias. Os nódulos escolhidos foram desinfetados com álcool 70° GL durante três minutos, hipoclorito de sódio 0,03% durante três minutos, sendo posteriormente lavados com água destilada e esterilizada por quatro vezes sucessivas. A seguir, os nódulos foram macerados e a estirpe formadora foi isolada em placa de Petri contendo meio YM (Tabela 4). Após isolamento, as estirpes foram colocadas em placa de Petri contendo concentrações de antibióticos relacionadas ao nível de resistência apresentado pelas estirpes de *Rhizobium* introduzidas a fim de se identificar a porcentagem de infecção em relação as estirpes nativas do solo (Tabela 6).

Após secagem, a parte aérea foi pesada em balança analítica, a seguir moída para a determinação da porcentagem de nitrogênio através da digestão ácida e avaliação por colorimetria .

Tabela 6 - Concentrações de antibióticos (Kanamicina, Cloranfenicol, Neomicina e Estreptomincina) em meio de cultura para isolamento de células resistentes.

Origem dos nódulos	Antibióticos (µg / mL de meio)			
	Kan	Clo	Neo	Str
Solo + Cunha-1	25	-	-	-
Solo + CIAT-899	-	100	100	-
Solo + CM-255	-	-	100	100

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Experimento 1 - Capacidade produtiva de uma cultivar crioula de feijoeiro sob condições melhoradas de solo na região de Cunha-SP.

Avaliou-se o incremento do rendimento de grãos da cultura do feijoeiro, através da utilização de técnicas e insumos apropriados, sob as condições edafo-climáticas do município de Cunha-SP. Os dados médios relativos ao efeito dos fatores sobre as variáveis encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Efeito dos fatores cultivar, calagem e molibdênio, sobre os parâmetros matéria seca da parte aérea, número de nódulos e rendimento de grãos, sob condições de campo. Média de quinze repetições.

	Matéria seca da parte aérea (g / m)	Número de nódulos (planta)	Rendimento (kg / ha)
<u>Cultivar</u>			
Carioca 80 SH	57,16*	411ns	1375ns
Serro Azul	50,26	397ns	1242ns
<u>Calagem</u>			
Necessidade	61,59*	529**	1415ns
Ausência	50,26	319	1201ns
<u>Molibdênio</u>			
40 g / ha	53,73ns	471ns	1451**
Ausência	50,07ns	429ns	1165
C.V. (%)	30,2	46,0	31,1

NS - Não significativo. * - Médias diferem entre si ao nível de $P < 0.05$ pelo teste de F. ** - Médias diferem entre si ao nível de $P < 0.01$ pelo teste F.

A acidez do solo e a baixa disponibilidade de nutrientes têm se constituído em fatores limitantes à produção do feijoeiro em Cunha. Neste experimento a utilização de corretivo de acidez do solo, como calcário, apresenta eficiência comprovada na insolubilização de minerais como alumínio e metais potencialmente tóxicos, bem como, na liberação de outros nutrientes essenciais ao desenvolvimento do feijoeiro, que porventura encontrem-se adsorvidos ao solo devido ao pH. A aplicação do calcário mostrou efeito significativo sobre os parâmetros analisados, sendo importante também para a manutenção das condições físico-químicas e microbiológicas do solo. Segundo GRAHAM *et al.* (1982), os efeitos da acidez do solo são notados tanto sobre a planta quanto sobre seu simbiote. Embora a população nativa de *Rhizobium* esteja adaptada às condições de acidez do solo, conforme observado no grande número de nódulos formados no feijoeiro do tratamento testemunha, a adição do calcário proporcionou melhoria significativa nas condições necessárias para o estabelecimento do processo simbiótico, resultando em aumento significativo do número de nódulos o que é correlacionado com a capacidade de fixação biológica do nitrogênio atmosférico. Além do efeito de correção da acidez, o calcário tem importante papel no fornecimento de cálcio nutriente este, necessário à formação dos nódulos (THUNG, 1991).

A disponibilidade de molibdênio em solos ácidos é extremamente reduzida embora possa existir em quantidades suficientes para suprir as necessidades da planta, conforme observado por FRANCO & MUNNS (1981). A aplicação de molibdênio, via foliar, foi suficiente para garantir aumento significativo da produção de grãos, mesmo não tendo alterado os outros parâmetros analisados. Segundo FRANCO & MUNNS (1981) e VIEIRA (1994), o parcelamento da aplicação do Mo, via foliar, pode ter proporcionado um prolongamento da atividade da enzima nitrogenase, responsável pela fixação do nitrogênio atmosférico, garantindo à planta maior quantidade de nitrogênio para seus processos metabólicos e, conseqüente, aumento da produção de grãos.

A aplicação do molibdênio está relacionada ainda, segundo BARBOSA FILHO *et al.* (1979), a outros importantes aspectos do feijoeiro, como o melhor aproveitamento da adubação mineral de macronutrientes, devido a sua atuação em processos enzimáticos e, do teor protéico de sementes.

As cultivares de feijoeiro estudadas diferem quanto à origem e quanto às condições de produção da semente. A cultivar Serro Azul foi selecionada naturalmente através da adaptação natural às condições edafo-climáticas do local, e foi produzida sob condições de baixa fertilidade, no mesmo local da produção de grãos do agricultor, sendo portanto, uma semente de baixo valor cultural, mas, de alta adaptação. A cultivar Carioca 80 SH, foi melhorada em campos de produção de semente, sob alta concentração de fertilizante, bem diferente das condições adversas de Cunha. Portanto, mesmo sendo uma semente de alto valor cultural, pode encontrar alguma barreira limitante ao seu desenvolvimento no ambiente. E no caso de Cunha, o maior limite a cultivar é a doença conhecida como “Mela” causada pelo fungo *Rhizoctonia solani*, em sua forma anamórfica conhecida como *Thanatephorus cucumeris*.

Os resultados obtidos, apresentaram média de rendimento de grãos semelhante entre as cultivares, mesmo com as possíveis desvantagens descritas. Pode-se então concluir que a cultivar Carioca 80 SH, sofreu realmente algum tipo de limitação adaptativa às condições edafo-climáticas estudadas, visto que não foi verificado o aparecimento significativo de doenças no experimento. Ou ainda, que a cultivar Serro Azul, sob condições melhoradas de solo, aumentou o seu rendimento de produção de grãos, mesmo tendo sofrido limitações à manutenção do estande, devido ao baixo valor cultural da semente. Esse quadro sugere um estudo mais aprofundado das limitações e vantagens das cultivares crioulas para ambientes onde as cultivares obtidos pelo programa de pesquisa não têm apresentado sucesso suficiente para uma produção substancial.

4.2 - Experimento 2 - Monitoramento da infectividade nodular de estirpes de *Rhizobium tropici* geneticamente marcadas, em uma cultivar crioula e uma comercial de feijoeiro.

Analizou-se o desempenho de duas estirpes de *Rhizobium tropici* quanto a capacidade de nodulação em contato com as cultivares utilizadas no experimento 1,

semeadas em amostras de solo oriundas de Cunha e mantidas sob condições controladas de casa-de-vegetação.

A análise da variância dos dados obtidos nos três períodos do experimento encontram-se na Tabela 8. A análise dos dados evidencia que, não foram verificados efeitos significativos das interações estudadas sobre os parâmetros analisados. Os dados médios relativos ao efeito dos fatores sobre a variável, encontra-se na Tabela 9.

Tabela 8 - Análise da variância dos dados de nodulação obtidos em três tempos de amostragem, no experimento no. 2. Média de quatro repetições.

Causa de Variação	Valor de F		
	21 dias	35 dias	45 dias
Solo	7,65*	2,20	12,05**
Estirpe	0,42	0,02	2,93
Cultivar	18,83**	11,89**	12,22**
Solo x Estirpe	0,15	2,48	1,39
Solo x Cultivar	4,67	0,90	0,23
Estirpe x Cultivar	0,01	0,11	3,34

* - Significativo ao nível de $P < 0.05$ pelo teste F. ** - Significativo ao nível de $P < 0.01$ pelo teste F.

O maior número de nódulos formados no solo de morro em relação ao solo de baixada, aos 21 dias após germinação, pode estar relacionado a reação mais acelerada do calcário devido ao efeito tampão da matéria orgânica, encontrada em maior concentração no solo de baixada. A acidez do solo é comprovadamente limitante ao processo de nodulação. Este fato explicaria também a maior nodulação no solo de baixada aos 45 dias após semeadura, quando o solo, após reação com o calcário, passaria a expressar o seu potencial.

Embora não significativo, o efeito da introdução de duas estirpes diferentes na mesma planta, apresentou resultado superior nas três amostragens, em relação aos tratamentos com uma estirpe apenas. Este fato pode estar relacionado a maior competição devido ao maior número de células introduzidas.

As sementes utilizadas foram as mesmas do experimento anterior, ou seja, Carioca 80 SH certificada e Serro Azul produzida pelos agricultores de Cunha. Devido ao baixo valor cultural das sementes Serro Azul, o vigor germinativo foi comprometido, retardando o desempenho desta em relação a outra cultivar. Para evitar problemas nos experimentos seguintes foram multiplicadas sementes das cultivares sob condições controladas, mantendo para ambas, a mesma condição nutricional e de ambiente.

Tabela 9 - Dados médios relativo ao efeito dos fatores sobre a variável número de nódulos avaliada aos 21, 35 e 45 dias após semeadura. Média de quatro repetições.

Causa de Variação	Número de nódulos (planta)	Número de nódulos (planta)	Número de nódulos (planta)
	21 dias	35 dias	45 dias
<u>Solo</u>			
Morro	43,5*	85,3ns	33,2
Baixada	19,1	62,6ns	57,0**
<u>Estirpe</u>			
CIAT-899+CM-255	38,9ns	75,3ns	56,5ns
CIAT-899	28,3ns	75,1ns	41,8ns
CM-255	23,9ns	71,6ns	37,0ns
<u>Cultivar</u>			
Carioca 80 SH	57,4**	100,3**	57,1**
Serro Azul	11,3	47,6	33,2
C.V. (%)	54,9	71,4	52,5

NS - Não significativo. * Significativo ao nível de $P < 0.05$ pelo teste de Tukey. ** Significativo ao nível de $P < 0.01$ pelo teste de Tukey.

A porcentagem de ocupação dos nódulos pelas estirpes estudadas pode ser verificado nas Figuras de 1 a 4. A análise dos dados demonstra que sob condições controladas, a inoculação do feijoeiro com as estirpes analisadas, apresenta excelente resultado quando comparada à porcentagem de nódulos infectados pelas estirpes nativas dos dois solos estudados. A concentração de células nos solos, 10^3 a 10^4 Unidade

Formadora de Colônias/g de solo, não foi suficiente para competir com as estirpes introduzidas, pela ocupação inicial dos nódulos (21 dias). No entanto, aos 35 dias, as estirpes nativas passaram a ocupar um maior número de nódulos, principalmente no solo de morro. Após 45 dias, quase a totalidade dos nódulos no solo de baixada eram ocupados pelas estirpes do solo, enquanto que no solo de morro, aproximadamente metade. O decréscimo da porcentagem de ocupação dos nódulos pelas estirpes introduzidas pode estar relacionado à difícil adaptação ao solo, dificultando sua multiplicação e, conseqüentemente, a competição pela nodulação secundária do feijoeiro.

Os nódulos identificados pelo potencial codificado pelas marcas Gus A e Cel B, foram mais consistentes durante as duas primeiras amostragens, 21 e 35 dias após emergência. Na terceira amostragem (45 dias), a coloração dos nódulos passou a apresentar perda do brilho, o que, por medida de segurança, impediu uma quarta amostragem prevista, evitando assim, possíveis confusões entre nódulos senescidos e infectados pelas estirpes introduzidas. Essa mesma observação foi feita por STREIT *et al.* (1995), em trabalho realizado com o feijoeiro em solo não estéril, contendo estirpes nativas de *Rhizobium*. No caso específico, após 30 dias de emergência, os nódulos marcados passaram a apresentar a coloração opaca. Os autores afirmaram porém, que embora menos reluzentes, os nódulos formados aos 30 dias, realmente eram formados pela estirpe GusA, sendo possível através de comparação com o método ELISA. Uma explicação apresentada pelos autores, seria a lignificação dos nódulos em função do tempo.

Figura 1 - Porcentagens dos nódulos de feijoeiro, cultivares carioca 80 SH e Serro Azul, infectados pela estirpe CM-255 CelB, inoculada em solo de baixada (1) e de morro (2). Média de quatro repetições.

Figura 2 - Porcentagens de nódulos de feijoeiro, cultivares Carioca 80 SH e Serro Azul, infectados pela estirpe CIAT-899 CelB, inoculada em solo de baixada (1) e de morro (2). Média de quatro repetições.

Figura 3 - Porcentagens dos nódulos de feijoeiro, cultivares Carioca 80 SH e Serro Azul, infectados pelas estirpes CIAT-899 CelB e CM-255 GusA, inoculadas em solo de morro. Média de quatro repetições.

Figura 4 - Porcentagens dos nódulos de feijoeiro, cultivares Carioca 80 SH e Serro Azul, infectadas pelas estirpes CIAT-899 CelB e CM-255 GusA, inoculadas em solo de baixada. Média de quatro repetições

4.3 - Experimento 3 - Cultivares crioulas de feijoeiro sob condições de casa-de-vegetação.

Analizou-se o desempenho de duas estirpes de *Rhizobium tropici*, CIAT-899 e CM-255 e, uma estirpe isolada do solo de Cunha (Cunha-1), interagindo com três cultivares crioulas (Serro Azul Fosca, Serro Azul Brilhante e Serro Azul Malhada)e, uma comercial de feijoeiro Carioca 80 SH), sob condições de casa-de-vegetação.

A análise da variância dos dados obtidos aos 25 e 45 dias após germinação, encontra-se na Tabela 10. Os dados médios relativos aos efeitos dos fatores sobre as variáveis, encontram-se nas tabelas 11 e 12,nas quais, não foram verificados efeitos significativos sobre a interação estudada (cultivar x estirpe).

Cultivares - As cultivares crioulas não diferiram estatisticamente entre si ou em relação a cultivar comercial, quanto ao número de nódulos aos 25 dias após germinação. No entanto, aos 45 dias a cultivar Serro Azul Malhada apresentou significativo aumento da nodulação em relação as demais.

Os parâmetros matéria seca dos nódulos e peso médio dos nódulos foram avaliados somente aos 25 dias, devido a senescência generalizada dos mesmos aos 45 dias. As cultivares crioulas apresentaram peso total e médio, superior, porém, apenas a cultivar Serro Azul Brilhante diferiu estatisticamente da cultivar comercial.

Quanto a atividade da enzima nitrogenase, as cultivares Serro Azul Brilhante e Serro Azul Malhada apresentaram aos 25 dias, maior valor que a cultivar comercial Carioca 80 SH. Já, aos 45 dias, apenas a cultivar Serro Azul Malhado diferiu significativamente da cultivar comercial.

PEREIRA *et al.* (1984), em experimento de campo avaliando 339 genótipos de feijoeiro, encontraram também, ampla variabilidade quanto à matéria seca dos nódulos e atividade da nitrogenase. Os autores classificaram os genótipos como bons, médios e ruins,, onde as cultivares do grupo Carioca, receberam nota média. Extrapolando os resultados obtidos pelos autores, pode-se então, classificar as cultivares crioulas como boas em relação ao parâmetro citado, visto que o menor intervalo destas em relação a cultivar Carioca 80 SH foi de 40%.

Tabela 10 - Análise da variância dos dados de nodulação obtidos aos 25 e 45 dias após a semeadura, obtida no experimento 3. Média de quatro repetições.

Parâmetro	Valor de F (21 dias após semeadura)		
	Cultivar	Estirpe	Cultivar x Estirpe
Número de nódulos	1,35 ns	44,10**	0,60 ns
Matéria seca dos nódulos	4,57**	30,18**	0,41 ns
Peso médio dos nódulos	3,50**	31,25**	0,60 ns
Atividade da enzima nitrogenase	8,39**	4,34*	0,55 ns
Matéria seca da parte aérea	2,86*	145,65**	1,70 ns
Nitrogênio total	2,52 ns	5,04**	1,99 ns
Porcentagem de nitrogênio	5,57**	157,08**	1,47 ns

Parâmetro	Valor de F (45 dias após semeadura)		
	Cultivar	Estirpe	Cultivar x Estirpe
Número de nódulos	11,12**	4,54*	0,74 ns
Atividade da enzima nitrogenase	10,82**	0,47 ns	0,86 ns
Matéria seca da parte aérea	2,74 ns	11,52**	1,15 ns
Nitrogênio total	2,20 ns	9,60**	0,94 ns
Porcentagem de nitrogênio	2,88*	4,91**	0,91 ns

NS - Não significativo. * - Significativo ao nível de $P < 0.05$ pelo teste F. ** - Significativo ao nível de $P < 0.01$ pelo teste F.

Tabela 11 -. Dados médios relativos ao efeito dos fatores cultivares e estirpes sobre as variáveis número de nódulos, matéria seca dos nódulos, peso médio dos nódulos e atividade da enzima nitrogenase, aos 25 dias após semeadura, obtidos no experimento 3. Média de quatro repetições.

Media dos níveis dos fatores*				
	Número de nódulos (planta)	Matéria seca nódulos (mg / planta)	Peso médio nódulos (mg / nódulo)	Atividade da enzima nitrogenase ($\mu\text{molC}_2\text{H}_2/\text{pl.}\cdot\text{h}^{-1}$)
Cultivar				
Serro Azul Brilhante	64,41 ns	47,37 A	0,95 a	9,59 A
Serro Azul Malhado	69,41 ns	38,13 AB	0,79 ab	10,42 A
Serro Azul Fosco	53,91 ns	41,85 AB	0,84 ab	7,63 AB
Carioca 80 SH	66,13 ns	29,38 B	0,64 b	3,23 B
Estirpe				
(Nitrogênio - 10mM)	-	-	-	-
CM-255	80,40 A	31,66 B	0,66 B	9,99 a
CIAT-899	81,25 A	28,09 B	0,56 B	6,25 b
Cunha-1	27,09 B	58,13 A	1,18 A	6,89 ab
C.V. (%)	29,7	30,4	29,6	49,8

NS - Não significativo. *Médias seguidas pela mesma letras maiúsculas não diferem ao nível de $P < 0.01$, pelo teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem ao nível de $P < 0.05$, pelo teste de Tukey.

** Eficiência relativa (%) - $M. S. P. \text{ Aérea} \cdot 100 / M. S. P. \text{ Aérea do N.}$

Pela análise dos resultados, não foram verificadas diferenças significativas entre as cultivares para o parâmetro matéria seca da parte aérea, nas duas amostragens. O mesmo fato ocorreu na análise do parâmetro porcentagem do nitrogênio da parte aérea. No entanto, para o parâmetro que mede a relação entre a matéria seca da parte aérea e a porcentagem de nitrogênio na parte aérea, bem como o nitrogênio total na parte aérea, evidenciou-se como mais eficientes as cultivares Serro Azul Brilhante e Serro Azul Malhado. Todavia, somente a primeira diferiu estatisticamente da cultivar comercial, aos 25 dias.

Tabela 11 continuação - Dados médios relativos ao efeito dos fatores cultivares e estirpes sobre as variáveis matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio da parte aérea, nitrogênio total e eficiência relativa, aos 25 dias após semeadura, obtidos no experimento no.3. Média de quatro repetições.

	Média dos níveis dos fatores*			
	Matéria seca da parte aérea (g / planta)	Nitrogênio na matéria seca (%)	Nitrogênio total (mg N/ planta)	Eficiência relativa** (%)
<u>Cultivar</u>				
Serro Azul Brilhante	0,71 ns	3,49 ns	25,57 A	-
Serro Azul Malhado	0,70 ns	3,42 ns	20,47 B	-
Serro Azul Fosco	0,61 ns	3,28 ns	21,60 AB	-
Carioca 80 SH	0,64 ns	2,93 ns	20,74 B	-
<u>Estirpe</u>				
(Nitrogênio 10mM)	1,11 A	3,61 a	39,79 A	100
CM-255	0,67 B	3,55 a	21,54 B	60,6
CIAT-899	0,53 C	3,04 ab	15,98 C	47,9
Cunha-1	0,41 D	2,91 b	11,09 D	36,6
C.V. (%)	14,9	19,2	18,1	-

NS - Não significativo. *Médias seguidas pela mesma letras maiúsculas não diferem ao nível de $P < 0.01$, pelo teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem ao nível de $P < 0.05$, pelo teste de Tukey.

** Eficiência relativa (%) - M. S. P. Aérea .100/ M. S. P. Aérea do N.

O efeito de distorções de qualidade e concentraçãp de nutrientes na semente foi previamente isolado através da multiplicação das mesmas, sob condições ideais. A análise dos parâmetros não possibilitou uma perfeita distinção entre as cultivares estudadas, entretanto, pode-se observar pequena diferença dos resultados a favor das cultivares crioulas.

Estirpe - Com relação as estirpes recomendadas, as mesmas diferiram estatisticamente da estirpe isolada no solo de Cunha, quanto ao número de nódulos aos 25 dias. Para os parâmetros matéria seca dos nódulos e peso médio dos nódulos, o quadro foi invertido, evidenciando o padrão da estirpe isolada, que é de baixo número de

nódulos iniciais; porém com massa de nódulos compensatória. Aos 45 dias, o número de nódulos da estirpe Cunha 1 apresentou-se significativamente superior ao da estirpe CM-255, mostrando uma capacidade de nodulação tardia em raízes secundárias. A adição de baixa concentração de nitrogênio, 2mM/L, favoreceu a aumento da matéria seca dos nódulos chegando ao ponto de apresentar resultados semelhantes aos encontrados por DA SILVA *et al.* (1993), apesarmesmo aa coleta ter sido realizada 21 dias antes da coleta dos autores citados.

Tabela 12 - Dados médios relativos ao efeito dos fatores cultivares e estirpes sobre as variáveis número de nódulos, atividade da enzima nitrogenase, matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio da parte aérea e eficiência relativa, aos 45 dias após semeadura, obtidos no experimento no.3. Média de quatro repetições.

Media dos níveis dos fatores*						
	Número de nódulos (planta)	Atividade da enzima nitrogenase ($\mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{pl.h}^{-1}$)	Matéria seca da parte aérea (g / planta)	Nitrogênio na matéria seca (%)	Nitrogênio total (mg N/planta)	Eficiência relativa** (%)
<u>Cultivar</u>						
S A. Brilhante	181,21 B	11,65 AB	3,18 ns	3,01 ns	10,37 ns	-
S. A. Malhado	300,91 A	19,55 A	3,49 ns	3,25 ns	10,48 ns	-
S. A. Fosco	187,08 B	10,95 AB	3,69 ns	3,11 ns	8,40 ns	-
Carioca 80 SH	180,54 B	6,26 B	2,74 ns	3,30 ns	8,47 ns	-
<u>Estirpe</u>						
(N - 10mM)	-	-	4,14 A	2,99 B	12,41 A	100
CM-255	125,13 b	11,08 ns	2,91 B	3,35 A	9,77 AB	70,3
CIAT-899	227,59 ab	9,34 ns	2,32 B	3,06 AB	6,55 B	56,0
Cunha-1	234,97 a	11,83 ns	2,74 B	3,28 AB	9,01 AB	66,2
C.V. (%)	28,8	69,6	30,4	9,7	32,9	-

NS - Não significativo. *Médias seguidas pela mesma letras maiúsculas não diferem ao nível de $P < 0.01$, pelo teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem ao nível de $P < 0.05$, pelo teste de Tukey.

** Eficiência relativa (%) - M. S. P. Aérea .100/ M. S. P. Aérea do N.

A atividade da nitrogenase aos 25 dias apresentou igualdade entre as estirpes, embora, a estirpe CM-255 tenha apresentado-se superior à estirpe CIAT-899. Já, aos 45 dias, não foi observada diferença significativa entre as estirpes, embora, a estirpe Cunha-1 tenha se apresentado mais efetiva. A nodulação das raízes secundárias influenciou sensivelmente na atividade da nitrogenase, o que segundo WOLYN *et al.* (1989) pode ser resultante do genótipo, tanto da planta, quanto da estirpe de *Rhizobium*.

Para o parâmetro matéria seca da parte aérea, observou-se aos 25 dias após semeadura, significativa diferença entre todas as estirpes, tendo o tratamento nitrogênio, média significativamente superior as demais e a estirpe Cunha-1, média significativamente inferior as demais. No entanto, aos 45 dias, apenas o tratamento nitrogênio apresentou-se significativamente superior. A eficiência relativa da matéria seca da parte aérea, em relação ao tratamento nitrogênio, apresentou ampla desvantagem para a estirpe cunha-1 aos 21 dias, porém, com ampla recuperação aos 45 dias.

Quanto à porcentagem de nitrogênio, aos 25 dias, a estirpe Cunha-1 apresentou-se significativamente inferior ao tratamento nitrogênio e estirpe CM-255. Este fato veio a se confirmar através da análise do parâmetro nitrogênio total, no qual a estirpe Cunha-1 diferiu negativamente também, da estirpe CIAT-899. Aos 45 dias, verificou-se uma franca recuperação quanto à eficiência da estirpe Cunha-1, igualando-se as demais estirpes e nitrogênio, para os parâmetros porcentagem de nitrogênio e nitrogênio total.

Dentre as estirpes estudadas, a estirpe isolada do solo de Cunha (Cunha-1), apresentou aos 21 dias desempenho significativamente superior em relação as demais, nos parâmetros matéria seca e peso médio dos nódulos e inferioridade nos parâmetros relacionados a eficiência como matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio e nitrogênio total na parte aérea. Já, aos 45 dias, demonstrou recuperação em relação as demais estirpes e ao tratamento com nitrogênio. Este quadro evidenciou um desempenho tardio da estirpe Cunha-1 em relação às demais estirpes, sob condições de casa-de-vegetação, porém, com atividade subsequente, suficiente para recuperação do nitrogênio fixado em relação as demais.

4.4 - Cultivares crioulas de feijoeiro sob condições parcialmente controladas.

Analisou-se o desempenho das três estirpes, sendo duas comerciais, testadas no experimento no. 1 e uma isolada do solo de Cunha, interagindo com as mesmas cultivares de feijoeiro, em dois diferentes solos dispostos em tambores. A análise da variância dos dados obtidos aos 21, 45 e 90 dias após semeadura, encontram-se na Tabela 14. Os dados médios relativo ao efeito dos fatores sobre as variáveis, encontram-se nas Tabelas 15 e 16.

Solo - Embora tenha sido observado maior número de nódulos no solo de baixada, não foi detectada diferença significativa entre os solos, tanto aos 21 quanto aos 45 dias após semeadura. Porém, detectou-se maior eficiência da atividade da enzima nitrogenase no solo de baixada, diferença essa significativa tanto aos 21 quanto aos 45 dias após germinação. Com relação à matéria seca da parte aérea, observou-se diferença significativa a favor do solo de baixada aos 21 e 45 dias. Já, a porcentagem de nitrogênio foi significativamente maior no solo de morro aos 21 dias, não diferindo aos 45 dias após germinação. Para o parâmetro nitrogênio total, observou-se significativa superioridade para o solo de baixada, aos 21 e 45 dias após germinação. Segundo TSAI *et al.* (1993) a fixação biológica de nitrogênio, e conseguinte produção de grãos, pode ser expressada em cultivares de feijão quando em presença de doses de nitrogênio mineral, caso sejam supridas as necessidades de P, K e S da cultura. O teor de nitrogênio no solo de baixada era naturalmente maior, em virtude da maior concentração de matéria orgânica, no entanto, não foi suficiente para elevar significativamente a produção, sob condições controladas, em virtude da correção das desigualdades nutricionais dos demais nutrientes.

Tabela 13 - Análise da variância dos dados obtidos aos 21, 45 e 90 dias após semeadura, no experimento 4. Média de quatro repetições.

Parâmetro	Valor de F (21 dias após semeadura)						
	Solo	Cultivar	Estirpe	Solo x Estirpe	Solo x Cultivar	Cultivar x Estirpe	Solo x Estirpe x Cultivar
Número de nódulos	0,42 ns	4,51**	18,47**	8,52**	1,26 ns	1,43 ns	8,22 ns
Atividade da enzima nitrogenase	13,39**	34,63**	15,48**	4,14**	4,39**	2,79**	1,89 ns
Matéria seca da parte aérea	45,78**	21,60*	17,00**	1,68 ns	2,00 ns	1,71 ns	1,86 ns
Nitrogênio na matéria seca	36,96**	70,90**	1,94 ns	7,00**	0,40 ns	1,25 ns	0,79 ns
Nitrogênio total	21,31**	2,00**	12,08**	0,74 ns	1,98 ns	1,72 ns	1,47 ns

	Valor de F (45 dias após semeadura)						
	Solo	Cultivar	Estirpe	Solo x Estirpe	Solo x Cultivar	Cultivar x Estirpe	Solo x Estirpe x Cultivar
Número de nódulos	0,39 ns	5,58**	1,99 ns	7,77**	0,93 ns	1,90 ns	1,99 ns
Atividade da enzima nitrogenase	6,73**	2,87*	1,06 ns	5,68**	2,74**	5,31**	2,94 ns
Matéria seca da parte aérea	49,87**	10,62**	25,80**	4,64**	0,44 ns	0,81 ns	1,25 ns
Nitrogênio na matéria seca	0,07 ns	15,61**	0,93 ns	11,43**	3,22*	0,93 ns	0,84 ns
Nitrogênio total	55,06**	4,40**	29,56**	3,29*	0,37 ns	0,97 ns	1,26 ns

	Valor de F (90 dias após semeadura)						
	Solo	Cultivar	Estirpe	Solo x Estirpe	Solo x Cultivar	Cultivar x Estirpe	Solo x Estirpe x Cultivar
Rendimento	0,87 ns	4,27**	87,73**	6,25**	1,46 ns	0,78 ns	2,27 ns

NS - Não significativo. * - Significativo ao nível de $P < 0.05$ pelo teste F. ** - Significativo ao nível de $P < 0.01$ pelo teste F.

Tabela 14 - Dados médios relativos ao efeito dos fatores solo, estirpe e cultivar sobre os parâmetros número de nódulos, atividade da enzima nitrogenase, matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio, nitrogênio total e eficiência relativa, aos 21 dias após semeadura, obtidos no experimento 4. Média de quatro repetições.

Médias dos níveis do fator *						
	Número de nódulos (Planta)	Atividade da enzima nitrogenase ($\mu\text{molC}_2\text{H}_2/\text{pl.h}^{-1}$)	Matéria seca da parte aérea (g / planta)	Nitrogênio na matéria seca (%)	Nitrogênio total (mg N/planta)	Eficiência relativa.** (%)
<u>Solo</u>						
Baixada	35,06 ns	3,59 A	1,17 A	4,28 B	49,98 A	-
Morro	32,54 ns	2,19 B	0,75 B	4,55 A	34,31 B	-
<u>Estirpe</u>						
(N - 60kg/ ha)	-	-	0,98 ab	5,08 A	48,36 ns	100
Testemunha	42,81 A	5,99 A	0,91 b	4,49 B	40,36 ns	92,8
CM-255	38,41 AB	1,65 B	0,82 ab	4,34 BC	36,26 ns	83,7
CIAT-899	28,98 AB	3,06 BC	0,93 ab	4,15 CD	38,50 ns	94,9
Cunha-1	25,06 B	0,87 C	1,13 a	4,03 C	47,20 ns	115,3
<u>Cultivar</u>						
S A. Brilhante	50,44 A	5,09 A	1,31 A	4,34 ns	57,25 A	-
S. A. Malhado	45,50 A	2,60 B	0,93 B	4,40 ns	39,44 B	-
S. A. Fosco	22,28 B	2,16 B	0,90 B	4,46 ns	39,01 B	-
Carioca 80 SH	17,00 B	1,72 B	0,67 B	4,47 ns	32,85 B	-
C.V. (%)	64,7	33,1	42,8	6,2	50,9	

NS- Não significativo. * Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, não diferem entre si ao nível de $P < 0.01$, pelo teste de Tukey. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de $P < 0.05$, pelo teste de Tukey.** Eficiência relativa (%) - M. S. P. Aérea .100/ M. S. P. Aérea do N.

Tabela 15 -Dados médios relativos ao efeito dos fatores solo, estirpe e cultivar sobre os parâmetros número de nódulos, atividade da enzima nitrogenase, matéria seca da parte aérea, porcentagem de nitrogênio, nitrogênio total e eficiência relativa, aos 45 dias após semeadura, obtidos no experimento 4. Média de quatro repetições

Médias dos níveis do fator *						
	Número de nódulos (Planta)	Atividade da enzima nitrogenase ($\mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{pl}/\text{h}$)	Matéria seca da parte aérea (g / planta)	Nitrogênio na matéria seca (%)	Nitrogênio total (mg N/planta)	Eficiência relativa (%)
<u>Solo</u>						
Baixada	140,86 ns	12,90 a	7,37 A	2,48 ns	183,90 A	-
Morro	137,33 ns	7,74 b	5,55 B	2,49 ns	135,88 B	-
<u>Estirpe</u>						
(N - 60kg/ ha)	-	-	8,11 A	2,23 B	184,65 A	100
(Testemunha)	129,66 B	7,41 b	6,29 B	2,62 A	162,31 AB	77,5
CM-255	157,47 A	12,39 ab	6,13 B	2,46 A	145,29 B	75,6
CIAT-899	140,19 AB	7,69 b	5,75 B	2,51 A	151,21 AB	70,9
Cunha-1	129,06 B	14,24 a	6,03 B	2,59 A	156,01 AB	74,3
<u>Cultivar</u>						
S A. Brilhante	150,62 ns	9,28 ns	7,90 A	2,53 ns	198,81 A	-
S. A. Malhado	137,81 ns	9,91 ns	6,03 B	2,46 ns	147,36 B	-
S. A. Fosco	132,94 ns	13,24 ns	7,07 AB	2,48 ns	175,82 AB	-
Carioca 80 SH	135,00 ns	8,26 ns	4,85 C	2,46 ns	117,58 C	-
C.V. (%)	22,8	25,9	23,4	8,9	25,6	-

NS- Não significativo. * Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, não diferem entre si ao nível de $P < 0.01$, pelo teste de Tukey. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de $P < 0.05$, pelo teste de Tukey. ** Eficiência relativa (%) - M. S. P. Aérea .100/ M. S. P. Aérea do N.

Tabela 16 - Dados médios relativos ao efeito dos fatores solo, estirpe e cultivar sobre o parâmetro rendimento de grãos, aos 90 dias após semeadura, obtidos no experimento 4. Média de quatro repetições.

Médias dos níveis do fator	
*	
Rendimento de Grãos	
(kg / ha)	
<u>Solo</u>	
Baixada	2196,42 ns
morro	2066,48 ns
<u>Estirpe</u>	
(Nitrogênio- 60kg/ ha)	1765,70 B
(Testemunha)	2090,80 AB
CM-255	2103,60 AB
CIAT-899	2043,50 AB
Cunha-1	2655,80 A
<u>Cultivar</u>	
Serro Azul Brilhante	3900,80 A
Serro Azul Malhado	730,10 C
Serro Azul Fosco	1977,30 B
Carioca 80 SH	1919,30 B
C.V. (%)	41.5

NS- Não significativo. * Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, não diferem entre si ao nível de $P < 0.01$, pelo teste de Tukey. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de $P < 0.05$, pelo teste de Tukey.

Estirpe - Os resultados encontrados na análise de resistência a antibióticos foram inconsistentes, devido ao nível de resistência apresentada pelas estirpes de *Rhizobium* nativas do solo, aos antibióticos kanamicina, cloranfenicol, neomicina e streptomina. Esses resultados impossibilitaram a diferenciação da estirpe de *Rhizobium* formadora dos nódulos, cabendo a estudos posteriores a determinação dos níveis de resistência das bactérias nativas do solo de Cunha.

Conforme observado no experimento sob condições controladas, a estirpe Cunha-1, apresentou resultado inferior quanto ao número de nódulos, tanto aos 21 quanto aos 45 dias. Aos 21 dias o tratamento testemunha foi significativamente superior a estirpe isolada, e aos 45 dias a estirpe CM-255. As demais, não diferiram entre si para as duas amostragens.

A atividade da enzima nitrogenase acompanhou o desempenho da nodulação, demonstrando maior eficiência para o tratamento testemunha, aos 21 dias. Aos 45 dias, conforme observações em condições controladas, a estirpe Cunha-1 apresentou resultado superior em relação aos demais, não diferindo estatisticamente apenas da estirpe CM-255.

Para o parâmetro matéria seca da parte aérea, observou-se, aos 21 dias, igualdade entre as estirpes, sendo encontrada apenas diferença significativa a favor da estirpe Cunha-1 em relação ao tratamento testemunha. Aos 45 dias, observou-se superioridade apenas para o tratamento envolvendo com nitrogênio.

Com relação à eficiência relativa da matéria seca da parte aérea, foi possível denotar a superioridade da estirpe Cunha-1, aos 21 dias. Aos 45 dias, as estirpes, inclusive aquelas relacionadas ao tratamento testemunha, apresentaram resultado semelhante, no entanto, inferiores ao tratamento nitrogênio.

Para o parâmetro porcentagem de nitrogênio, observou-se aos 21 dias, grande diferença entre os tratamentos, sendo o tratamento nitrogênio significativamente superior e o tratamento Cunha-1, significativamente inferior, não diferindo apenas da estirpe CIAT-899. Aos 45 dias, todas as estirpes apresentaram resultados estatisticamente iguais, com apenas o tratamento nitrogênio, significativamente inferior.

Aos 21 dias não se verificou diferença significativa entre os tratamentos quanto ao nitrogênio total da parte aérea. Aos 45 dias, apenas a estirpe CM-255 apresentou-se significativamente inferior ao tratamento nitrogênio, o qual por sua vez, não diferiu dos demais.

O parâmetro produção de grãos apresentou a estirpe Cunha-1 como superior as demais. Embora, tenha diferido estatisticamente apenas do tratamento com nitrogênio, apresentou média de produção de 600 Kg / ha, acima da produção das demais.

Segundo PEREIRA *et al.* (1989) e CORRÊA *et al.* (1990), o estabelecimento da simbiose eficiente não se restringe somente a maior atividade da nitrogenase ou a maior quantidade de nitrogênio fixado, mas sim, a adequada translocação dos compostos nitrogenados na planta. Tal fato, segundo os autores, é codificado não somente pela planta, mas também pela bactéria formadora do nódulo. Este fato talvez, justifique o desempenho médio superior da estirpe isolada de Cunha, quanto à produção de grãos, mesmo que outros parâmetros relacionados a eficiência simbiótica tenham permanecido em patamares semelhantes as demais estirpes.

Outra importante observação dos autores, e que não deve ser descartada nesse caso, foi a resposta diferencial entre estirpes, quanto à adubação molibídica, via foliar, que neste caso, foi igual para todos os tratamentos. A maior eficiência quanto ao aproveitamento do molibdênio, pode beneficiar o feijoeiro em termos de produção. Neste caso, novos estudos devem ser realizados para se identificar essa possibilidade.

Cultivar - Aos 21 dias, as cultivares crioulas, serro azul brilhante e serro azul malhado, apresentaram-se significativamente superiores quanto à nodulação, embora, aos 45 dias não tenha sido encontrada diferença significativa. PEREIRA *et al.* (1984), não encontraram correlação entre nodulação precoce e o aumento do número de nódulos durante amostragens posteriores.

Com relação a atividade da nitrogenase, apenas a cultivar serro azul brilhante apresentou-se significativamente superior as demais aos 21 dias. Assim como para a nodulação, não foi encontrada diferença significativa entre as cultivares aos 45 dias após semeadura. A alta atividade da nitrogenase acontece na época de floração, conforme os dados encontrados no trabalho e observações de PEREIRA *et al.* (1984) e GRAHAM & ROSAS (1977). Este fato é justificado pela formação dos nódulos, até então, e senescência dos nódulos após a floração do feijoeiro. Segundo os autores a senescência dos nódulos está ligada a temperaturas excessivas, “déficit” hídrico e competição da planta por energia para a formação do fruto.

Para os parâmetros matéria seca da parte aérea e nitrogênio total, a cultivar serro azul brilhante apresentou aos 21 dias, média significativamente superior as demais. Já, aos 45 dias, embora a cultivar serro azul brilhante apresentasse média superior, não

diferiu estatisticamente da média da cultivar comercial Carioca 80 SH. Este fato foi relatado também por TSAI *et al.* (1993a), apresentando a cultivar Carioca 80, médias de matéria seca da parte aérea, produção de grãos e nitrogênio total na parte aérea, semelhantes as de outras 30 cultivares analisadas. Neste experimento, a produção de grãos da cultivar Carioca 80 SH, foi significativamente inferior em relação a cultivar Serro Azul Brilhante, apresentando esta segunda como promissora para novos estudos correlacionados ao rendimento de grãos.

Uma importante observação apresentada por RONZELLI JUNIOR *et al.* (1984), é que as cultivares que não pertencem ao grupo Carioca, embora apresentem produtividades superiores, muitas vezes evidenciam receitas inferiores devido a preferências de mercado, que segundo BULISANI (1987) é virtude da grande oferta de sementes certificadas do grupo Carioca a partir de 1975, moldando o mercado consumidor do Estado de São Paulo. A similaridade dos resultados entre a matéria seca da parte aérea e nitrogênio total foi devido a semelhança das médias relativas ao parâmetro porcentagem de nitrogênio. Assim, não foi detectada diferença significativa entre as cultivares, tanto aos 21 quanto aos 45 dias após germinação.

Interação Solo x Estirpe - A interação solo x estirpe, foi significativa na maior parte dos parâmetros avaliados. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 18, 19 e 20, que correspondem a 21, 45 e 90 dias após germinação, respectivamente.

Com relação ao número de nódulos aos 21 dias, o desdobramento da interação mostrou que a estirpe CM-255 apresentou-se significativamente superior no solo de baixada, e quando comparada as demais estirpes, sob tais condições, apresentou-se significativamente superior, não diferindo estatisticamente apenas do tratamento testemunha. No solo de morro, o tratamento testemunha, aos 21 dias, apresentou-se significativamente superior aos demais. Aos 45 dias, o tratamento testemunha, apresentou média significativamente maior no solo de morro. Não foi observada diferença significativa entre as estirpes no solo de morro. No solo de baixada, a estirpe CM-255 apresentou-se significativamente superior, não diferindo apenas da estirpe CIAT-899.

Para o parâmetro atividade da enzima nitrogenase, aos 21 dias, o desdobramento da interação mostrou que a estirpe CM-255 e CIAT-899, apresentaram-se significativamente superiores no solo de baixada. Dentre as estirpes, no solo de baixada, o tratamento testemunha apresentou média significativamente superior, não diferindo apenas da estirpe CIAT-899. Para o solo de morro, o tratamento testemunha apresentou-se significativamente superior. Aos 45 dias, a estirpe CIAT-899 apresentou média significativamente inferior no solo de morro, e quando comparado as demais estirpes, não diferiu apenas do tratamento testemunha.

Para a porcentagem de nitrogênio, aos 21 dias, o desdobramento da interação apresentou resultados significativamente superiores para as estirpes CM-255 e Cunha-1, quando sob condições de solo de morro. Neste mesmo solo, o tratamento com nitrogênio apresentou média significativamente superior e a estirpe CIAT-899, significativamente inferior, não diferindo apenas da estirpe Cunha-1. Para o solo de baixada, o tratamento nitrogênio apresentou média significativamente superior e a estirpe Cunha-1, inferior. Aos 45 dias observou-se diferença significativa a favor do tratamento nitrogênio e testemunha, quando em solo de baixada. Dentro deste solo, a estirpe Cunha-1 apresentou média superior as demais, porém diferindo significativamente apenas da estirpe CIAT-899. No solo de morro o tratamento testemunha apresentou média significativamente superior, não diferindo apenas da estirpe CIAT-899. No mesmo solo, o tratamento nitrogênio apresentou-se significativamente inferior.

Para o tratamento matéria seca da parte aérea, aos 45 dias após germinação, o desdobramento da interação apresentou significativa diferença a favor do solo de baixada, para as estirpes Cunha-1, testemunha e nitrogênio. Neste mesmo solo, o tratamento nitrogênio apresentou média superior, diferindo estatisticamente apenas das estirpes CM-255 e CIAT-899.

Para o parâmetro nitrogênio total na parte aérea, aos 45 dias, o desdobramento da interação demonstrou superioridade de médias do solo de baixada em relação ao solo de morro, não diferindo estatisticamente apenas para a estirpe CIAT-899. Para o solo de baixada, os tratamento com nitrogênio e testemunha apresentaram médias superiores; no

entanto, diferiram significativamente apenas da estirpe CIAT-899. Não foi encontrada diferença significativa entre as estirpes para o solo de morro.

Para o parâmetro rendimento de grãos, aos 90 dias, o desdobramento da interação mostrou serem significativamente superiores às médias dos tratamentos testemunha e nitrogênio, dentro do solo de baixada e morro, respectivamente. Para o solo de baixada, a média da estirpe Cunha-1 foi superior, porém, diferiu estatisticamente apenas do tratamento nitrogênio. Não foi observada diferença significativa entre as médias para o solo de morro.

Tabela 17 - Efeito da interação solo x estirpe sobre o número de nódulos, atividade da nitrogenase e porcentagem de nitrogênio, aos 21 dias após semeadura no experimento 4.

Solo	Estirpe				
	(Nitrogênio)	(Testemunha)	CM-255	CIAT-899	Cunha-1
Número de nódulos* (Planta)					
Baixada	-	32,1 aAB	54,8 bA	29,9 aB	23,2 aB
Morro	-	53,4 aA	21,9 aB	27,9 aB	26,8 aB
Atividade da enzima nitrogenase* ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_2/\text{pl.} \cdot \text{h}^{-1}$)					
Baixada	-	5,98 aA	2,85 aBC	4,60 aAB	0,94 aC
Morro	-	5,96 aA	0,46 bB	1,52 bB	0,80 aB
Porcentagem de nitrogênio* (%)					
Baixada	5,00 aA	4,44 aB	4,12 bC	4,14 aBC	3,72 bD
Morro	5,15 aA	4,53 aB	4,56 aB	4,16 aC	4,35 aBC

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, e maiúscula, na horizontal, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de ($P < 0.01$).

Tabela 18 - Efeito da interação solo x estirpe sobre o número de nódulos, atividade da nitrogenase, nitrogênio total, matéria seca da parte aérea e porcentagem de nitrogênio, aos 45 dias após semeadura, obtida no experimento 4.

Solo	Estirpe				
	(Nitrogênio)	(Testemunha)	CM-255	CIAT-899	Cunha-1
Número de nódulos* (Planta)					
Baixada	-	106 bC	168 aA	148 aAB	126 aBC
Morro	-	153 aA	147 aA	132 aA	131 aA
Atividade da enzima nitrogenase* (umol C ₂ H ₂ /pl. . h ⁻¹)					
Baixada	-	9,65 aA	10,96 aA	19,04 aA	13,76 aA
Morro	-	5,69 aAB	13,99 aA	3,10 bB	14,72aA
Matéria seca da parte aérea* (g / planta)					
Baixada	8,92 aA	8,16 aAB	6,86 aBC	5,89 aC	7,04aABC
Morro	7,30bA	4,42 bB	5,39 aB	5,60aAB	5,01bB
Porcentagem de nitrogênio* (%)					
Baixada	2,30 aB	2,84 aAB	2,52 aAB	2,58 aAB	2,64 aA
Morro	2,11 bC	2,40 bA	2,39aB	2,49 aAB	2,51 aB
Nitrogênio total na parte aérea* (mg N / planta)					
Baixada	21,46 aA	19,72 aA	17,37 aAB	14,72 aB	18,67 aAB
Morro	15,45 bA	12,74 bB	12,87 bA	14,33 aA	12,52 bA

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, e maiúscula, na horizontal, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de (P < 0.01).

Tabela 19 - Efeito da interação solo x estirpe sobre rendimento de grãos, aos 90 dias após germinação, obtida no experimento 4.

Solo	Estirpe				
	(Nitrogênio)	(Testemunha)	CM-255	CIAT-899	Cunha-1
Rendimento de grãos* (kg / ha)					
Baixada	1220 bB	2533 aA	1744 aAB	2070 aAB	2765 aA
Morro	2311 aA	1648bA	2462 aA	2016 aA	2546 aA

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, e maiúscula, na horizontal, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de ($P < 0.01$).

Interação Solo x Cultivar - A interação solo x cultivar foi significativa para os parâmetros atividade da enzima nitrogenase, aos 21 e 45 dias; e porcentagem de nitrogênio aos 45 dias, conforme Tabela 21.

Com relação ao parâmetro atividade da nitrogenase, o desdobramento da interação apresentou significativa diferença entre as médias a favor da cultivar serro azul brilhante, quando cultivada em solo de baixada. Neste solo, a cultivar serro azul brilhante apresentou média significativamente superior as demais. Aos 45 dias, a cultivar carioca 80 SH e serro azul fosca apresentaram médias significativamente superiores quando cultivadas em solo de baixada, em relação as médias do solo de morro. Para o solo de baixada, a cultivar carioca 80 SH, apresentou média superior as demais cultivares testadas, diferindo significativamente, no entanto, apenas da cultivar serro azul fosca.

Para o parâmetro porcentagem de nitrogênio, a cultivar serro azul brilhante apresentou média superior em relação as demais, quando cultivada em solo de baixada. No entanto, diferiu estatisticamente apenas da cultivar serro azul fosca.

Tabela 20 - Efeito da interação solo x cultivar sobre a atividade da nitrogenase e porcentagem de nitrogênio, aos 21 dias após germinação, e atividade da nitrogenase aos 45 dias após semeadura, obtida no experimento 4.

Solo	Cultivar			
	Carioca 80 SH	Serro Azul Fosco	Serro Azul Malhado	Serro Azul Brilhante
Atividade da enzima nitrogenase aos 21 dias* (umol C ₂ H ₂ /pl. . h ⁻¹)				
Baixada	2,25 aB	1,81 aB	3,43 aB	6,87 aA
Morro	2,06 aA	1,63 aA	1,77 aA	3,30 bA
Atividade da enzima nitrogenase aos 45 dias* (umol C ₂ H ₂ /pl. . h ⁻¹)				
Baixada	29,61 aA	10,50 aB	13,77 aAB	10,45 aAB
Morro	3,92 bA	6,49 bA	6,24 aA	9,39 aA
Porcentagem de nitrogênio**(%)				
Baixada	2,42 aAB	2,40 aB	2,49 aAB	2,60 aA
Morro	2,54 aA	2,51 aA	2,44 aA	2,47 aA

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, e maiúscula, na horizontal, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de (P < 0.01). ** Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, e maiúscula, na horizontal, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de (P < 0.05).

Interação Estirpe x Cultivar - A interação solo x cultivar foi significativa para o parâmetro atividade da nitrogenase, aos 21 e 45 dias após germinação, conforme Tabela 22.

O desdobramento da interação, aos 21 dias, demonstrou efeito significativo das estirpes dentro da cultivar carioca, com média significativamente superior para o tratamento testemunha. Para a cultivar serro azul fosca, o tratamento testemunha apresentou média significativamente superior, não diferindo apenas da estirpe CM-255. Para a cultivar serro azul malhada e serro azul brilhante o tratamento testemunha, apresentou média significativamente superior, não diferindo estatisticamente apenas da estirpe CIAT-899.

Para o tratamento testemunha, a cultivar serro azul brilhante, apresentou média superior, a qual diferiu estatisticamente apenas da cultivar serro azul fosca. Para a estirpe CIAT-899, a cultivar serro azul brilhante apresentou-se significativamente superior. Para as demais estirpes não houve diferença significativa.

O desdobramento da interação aos 45 dias, demonstrou efeito significativo das estirpes dentro da cultivar serro azul fosca, com média significativamente superior para a estirpe Cunha-1. Já, a cultivar serro azul malhada, apresentou média significativamente superior a favor da estirpe CM-255.

Tabela 21 - Efeito da interação estirpe x cultivar sobre a atividade da nitrogenase aos 21, e 45 dias após semeadura, obtida no experimento 4.

Estirpe	Cultivar			
	Carioca 80 SH	S.Azul Fosco	S.Azul Malhado	S.Azul Brilhante
Atividade da N-ase aos 21 dias* (umol C ₂ H ₂ /pl. . h ⁻¹)				
(Testemunha)	5,88 aAB	4,37 aB	5,30 aAB	8,40 aA
CM-255	0,72 bA	1,02 abA	1,54 bA	3,34 bA
CIAT-899	1,00 bB	0,85 bB	2,89 abA	7,44 aA
Cunha-1	1,03 bA	0,64 bA	0,69 bA	1,11 bA
Atividade da N-ase aos 45 dias* (umol C ₂ H ₂ /pl. . h ⁻¹)				
(Testemunha)	19,46 aA	4,63 bA	4,47 bA	7,49 aA
CM-255	10,39 aA	6,91 bA	29,82 aA	10,97 aA
CIAT-899	13,78 aA	4,66 bA	7,34 bA	7,41 aA
Cunha-1	11,03 aA	31,13 aA	7,55 bA	15,82 aA

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, e maiúscula, na horizontal, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de (P < 0.01).

O isolamento do fator ambiental exercido pela topografia, clima e fertilidade do solo de Cunha-SP, foi suficiente para produzir efeito semelhante entre os solos de morro e baixada, analisados no ambiente parcialmente controlado em Piracicaba-SP.

Os parâmetros analisados aos 21 e 45 dias, embora apresentassem algumas diferenças significativas a favor de um dos solos, não foi suficiente para apresentar diferenças de produção de grãos. A análise final dos dois ambientes possibilita concluir que o cultivo do feijoeiro em Cunha-SP, deve ser realizado, prioritariamente, nas áreas de baixada, visto que a influência exercida pela topografia na conservação do solo de

morro somada a maior necessidade de adubação impõe limites técnicos e econômicos ao agricultor.

Diferindo dos resultados obtidos sob condições de casa-de-vegetação, o uso de adubação nitrogenada, na proporção de 60 kg / ha, não apresentou resultados satisfatórios em relação ao uso de inoculantes para os solos estudados. Dentre as estirpes, pode-se observar que a Cunha-1 continuou apresentando as características de menor número, mas maior massa de nódulos, com desempenho inferior aos 21 dias, recuperação aos 45 dias e produção de grãos superior as demais, embora não significativa estatisticamente. As estirpes nativas dos solos estudados, apresentaram ótimo desempenho em relação aos parâmetros analisados, apresentando produção final de grãos semelhante aos tratamentos com inoculação, evidenciando alta responsividade quando eliminado os efeitos de outros fatores limitantes como água, deficiências nutricionais e temperaturas excessivas. Resultado semelhante de estirpes nativas altamente responsivas foi apresentado por VIEIRA (1994).

As estirpes comumente recomendadas para a inoculação do feijoeiro, apresentaram bom desempenho no solo de Cunha, mostrando se tratar de um ótimo material, com adaptação e resultados satisfatórios em diferentes ambientes, conforme observações de casa-de-vegetação e condições parcialmente controladas.

As cultivares crioulas de feijoeiro obtidas no ambiente de Cunha, apresentaram diferente desempenho sob as condições de Piracicaba - SP. A cultivar Serro azul Fosca apresentou desempenho semelhante a cultivar Carioca 80 SH tanto sob as condições de Piracicaba quanto sob as condições de campo, em Cunha-SP. O estudo das características relacionadas a menor susceptibilidade às doenças endêmicas de Cunha apresentada pela cultivar Serro Azul Fosca, pode vir a contribuir para futuros estudos.

A cultivar crioula Serro Azul Malhada teve ótimo desempenho sob condições controladas de casa-de-vegetação, porém, quando sob condições parcialmente controladas, apresentou alta susceptibilidade ao ácaro branco, desde os primeiros dias após germinação proporcionando baixo rendimento.

A cultivar crioula Serro Azul Brilhante apresentou surpreendente desempenho desde os primeiros dias após emergência, apresentando finalmente rendimento 100%

superior as demais cultivares, mostrando ampla adaptação ao ambiente experimental, alta resposta ao nível de adubação empregada e excelente resposta a inoculação com as estirpes estudadas.

5 - CONCLUSÕES

O cultivo do feijoeiro, sob às condições encontradas em Cunha-SP, é prática viável, desde que algumas técnicas, como calagem e adubação com molibdênio, sejam utilizadas. O emprego do molibdênio, via foliar, foi suficiente para aumentar significativamente ($P < 0.01$), o rendimento da cultura do feijoeiro, mesmo sob às condições de solo ácido sem calagem, demonstrando ser um dos fatores mais limitantes encontrados. A calagem, embora não tenha apresentado a resposta esperada é sem dúvida uma prática necessária a manutenção da fertilidade dos solos de Cunha-SP, encontrando, no entanto, limitação quanto ao custos de aquisição e aplicação.

Sob as condições experimentais utilizadas, as cultivares crioulas apresentaram ótimo desempenho, igualando, sob condições de campo, e até superando, sob condições controladas, o rendimento apresentado pela cultivar Carioca 80 SH, recomendada pela Secretaria de Agricultura. O uso de cultivares crioulas, desde que apresentem produção satisfatória para alcançar boa renda em relação a cultivar comercial, é de extrema importância, visto que a adaptação local devido ao constante cultivo, lhes confere uma menor susceptibilidade às doenças endêmicas locais, as quais costumam limitar a produtividade das cultivares do grupo Carioca.

As estirpes de *Rhizobium* nativas apresentaram ótimo desempenho quando foram satisfeitas as deficiências nutricionais dos solos estudados, possibilitando índices semelhantes às estirpes comumente recomendadas para a inoculação do feijoeiro. A estirpe isolada do solo de Cunha-SP (Cunha-1), apresenta característica de nodulação particular, com menor número de nódulos formados, maior massa por nódulo, maior longevidade dos nódulos formados, maior persistência nos solos estudados e, alta capacidade de formação da nódulos secundários, diferindo completamente das demais estirpes estudadas.

6 - BIBLIOGRAFIA

- AMANE, M.I.V. RESPOSTA DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) ÀS ADUBAÇÕES NITROGENADA E MOLÍBDICA. Viçosa, 1994. 70p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- AKKERMANS, A.D.L; MIRZA, M.S.; HARMSSEN, H.J.M.; BLOK, H.J.; HERRON, P.R.; SESSITSCH, A.; AKKERSMANS, W.M. Molecular ecology of microbes: A review of promises, pitfalls and true progress. **Microbiological Reviews**.v.15, p.185-194, 1995.
- ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa CNPAF - CNPS. 1994. 236p.(Documentos.44).
- BANNO, K. Oferta e comercialização do feijão no Brasil. In: V SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS, DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEIJOEIRO. 5. 1994, Piracicaba. **Anais do V seminário sobre pragas, doenças e plantas daninhas do feijoeiro**. Piracicaba: FEALQ, 1995. 27-44.
- BARBOSA FILHO, M.P.; JUNQUEIRA NETO, A.; GUEDES, G.A.A; RESENDE, P.M. Efeito da idade, fósforo, molibdênio e cobalto no teor percentual de nitrogênio em diferentes partes do feijoeiro comum. **Ciência e Prática**. Lavras. v.3, p.107-116. 1979.

- BERGER, P.G.; VIEIRA, C.; ARAÚJO, G.A.A. Efeitos de doses e épocas de aplicação do molibdênio sobre a cultura do feijoeiro. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO. 1995. Viçosa. **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, 1995. v.3, p.1219-1221.
- BOIVIN, C.; CAMUT, S.; MALPICA, C.A.; TRUCHET, G.; ROSEMBERG, C. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. **The Plant Cell**. v.2, p. 1157-1170, 1990.
- BONNETI, R. MONTANHEIRO, M.N.S.; SAITO, S.M.T. The effects of phosphate and soil moisture on the nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Agriculture Science**. v.103, p.95-102. 1984.
- BRODRICK, S.J.; SAKALA, M.K.; GILLER, K.E. Molybdenum reserves of seed, and growth and N₂ fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Biology and Fertility of Soils**. New York. v.13, p.39-44, 1992.
- BULISANI, E.A. **Feijão:fatores de produção e qualidade**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 326p.
- CIAT (CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL). **Bean production problems in the tropics**. 2 ed. Cali: CIAT, 1989. 726p.
- CORRÊA, J.R.V.; JUNQUEIRA NETO, A.J.; REZENDE, P.M.; ANDRADE, L.A.B. Efeitos de *Rhizobium*, molibdênio e cobalto sobre o feijoeiro comum cv. carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.25, n.4, p.513-519. 1990.
- DA SILVA, P.M.; TSAI, S.M.; BONETTI, R. Response to inoculation and N fertilization for increased yield and biological nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**. The Hague. v.152, p.123-130. 1993.

- DRAHOS, D.J. Current practices for monitoring genetically engineered microbes in the environment. **Agriculture Biotechnology News**.v.3, p.39-48, 1991
- DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L.; BODDEY, R.M. The response of field-grown *Phaseolus vulgaris* L. to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N₂ fixation using ¹⁵N. **Plant and Soil**. The Hague.v.88, p.333-343, 1985.
- EMBRAPA. **Recomendações técnicas para o cultivo de feijão, zonas 61 e 83**. Brasília: Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. 1993. 93 p.
- FAGGIANI, C.C. ANÁLISE DA INTERAÇÃO *Rhizobium tropici*-FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.): USO DE ESTIRPE CM-255 GUS⁺. Piracicaba, 1995. 69p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo.
- FEALQ/CEPEA. **Preços agrícolas**. Piracicaba: Fealq, 1996. 52p. (Ano10, n.15, mai.)
- FRANCIS, C.A.; SANDERS, J.H. Economic analysis of bean and maize systems: monoculture versus associated cropping. **Field Crops Research**. v.1, p.319-335, 1978.
- FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C.; NEYRA, A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology**. v.63, n.3, p. 421-424, 1979.
- FRANCO, A.A.; DAY, J.M. Effects of lime and molybdenum on nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in acid soil of Brasil. **Turrialba**. v.30, p.99-105. 1980.

- FRANCO, A.A.; MUNNS, D.N. Response of *Phaseolus vulgaris* L. to molybdenum under acid conditions. **Soil Science Society of America Journal**. Madison. v.45, n.6, p.1144-1148, 1981.
- GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* l. inoculated with *Rhizobium*. **Journal of Agricultural Science**. Cambridge. v.88, p.503-508, 1977.
- GRAHAM, P.H. **Variacion entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* en la fijacion simbiotiva de nitrogeno y estrategias para el desarrollo de variedades mejoradas com amplia fijacion**. Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1978. 20 p.(Série SE-17-78).
- GRAHAM, P.H. Some problems of nodulating and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolu vulgaris* L.: A review. **Field Crops Research**. Amsterdam, v.4, p.93-112, 1981.
- GRAHAM, R.D.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.A.T.; PALACIOS, A. Variation in acid soil, tolerance among strain of *Rhizobium phaseoli*. **Field Crops Research**. Amsterdam, v.5, p.121-128, 1982.
- HARDARSON, G.; DANSO, S.K.A. Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. **Plant and Soil**. v.152, p.19-23, 1993.
- HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Ed.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: Embrapa CNPAF - CNPS. 1994. 542p. (Documentos - 46).

- JACOB NETO, J.; FRANCO, A.A. Conteúdo de Mo nas sementes para auto-suficiência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.58, n.3, p.508, 1986.
- JEFFERSON, R.A.; BURGESS, S.M.; HIRSH, D. B-glucoronosidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. **Proc. National Academy of Science**. v.83, p. 8447-8451, 1986.
- MEAGHER, W.R.; JOHNSON, C.M.; STOUT, P.R. Molybdenum requirement by leguminous plants supplied with fixed nitrogen. **Plant Physiology**. v.27, p.223-230, 1952.
- NUTMAN, P.S. Varietal differences in the nodulation of subterranean clover. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.14, p.11-16, 1967.
- O'HARA, G.W.; BOONKERD, N; DILWORTH, M.J. Mineral constraints to nitrogen fixation. **Plant and Soil**. The Hague. v.108, p.93-110, 1988.
- OLIVEIRA, A.C.S.; FELÍCIO FILHO, A.; MOURA, P.A.M. **Diagnóstico da cultura do feijoeiro em Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1980. 19p.
- PEREIRA, P.A.A.; ARAUJO, R.S.; ROCHA, R.E.M.; TEINMETZ, S. Capacidade de genótipos de feijoeiro de fixar N₂ atmosférico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, n.7, p.811-815, 1984.
- PEREIRA, P.A.A.; BURRIS, R.H.; BLISS, F.A. ¹⁵N-determined dinitrogen fixation potential of genetically diverse bean lines. **Plant and Soil**. The Hague, v.120, p.171-179, 1989.

- RONZELLI JUNIOR, P.; FEITOSA, C.T.; ALMEIDA, L.P.A. **Formulações comerciais de P e K na presença de nitrogênio em cobertura e ou adubação foliar para feijoeiro**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 1984. 10p. Boletim técnico no. 90.
- RUSCHEL, A.P.; SAITO, S.M.; TULMANN NETO, A. Efficiency of *Rhizobium* inoculation on *Phaseolus vulgaris*. I. Effects of nitrogen sources and plant variety. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.3, p.13-17, 1979.
- SAITO, S.M.T. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.17, n.7, p.999-1006, 1982.
- SARRUGE, J.R. Soluções Nutritivas. **Summa Phitopathologica**. Piracicaba, v.1, n.3, p. 231-234, 1975
- SCHUBERT, K.R.; EVANS, H.J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.** Washington, v.73, n.4, p.1207-1211, 1976.
- SESSITSCH, A. **Manual for the Gus gene marking kit**. Seibersdorf, Austria: Food and Agriculture Organization /International Atomic Energy Agency, 1995. p. 34.
- SFREDO, G.J.; BORKERT, C.M.; CASTRO, C. Efeito de micronutrientes sobre a produção de soja em três solos do estado do Paraná. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO. 1995. Viçosa. **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, 1995. v.3, p. 1216-1218.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Ed.). *Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectivas ambiental*. Brasília: Embrapa CNPAF - CNPS, 1994. 142p. (Documentos, 45).

SISTACHS, E. Efectos de la fertilización nitrogenada y la inoculación en el rendimiento y contenido del nitrógeno del frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Cubana de Ciencia Agrícola**. v.4, p.233-237, 1970.

SORIA, J.; BAZAN, R.; PINCHINAT, A.M.; PAEZ, G.; MATEO, N.; MORENO, R.; FARGAS, J.; FORSYTHE, W. Investigación sobre sistemas de producción agrícola para el pequeño agricultor del trópico. **Turrialba**, v.25, n. 3, p.283-293, 1975.

SOUZA, E.C. Cafezal. In: FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tipos e aspectos do Brasil**. 10 ed. Rio de Janeiro, 1975. p. 292-296.

STREIT, W.; KOSCH, K.; WERNER, D. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronosidase (GUS) gene fusions. **Biology and Fertility of Soils**. v.14, p.140-144, 1992.

STREIT, W.; BOTERO, L.; WERNER, D.; BECK, D. Competition for nodule occupancy on *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* and *Rhizobium tropici* strains can be efficiently monitored in an ultisol during the early stages of growth using a constitutive gus gene fusion. **Biology and Fertility of Soils**. v.27, n.8, p.1075-1081, 1995.

TEIXEIRA, M.G. INFLUÊNCIA DO CONTEÚDO DE FÓSFORO DA SEMENTE NA NODULAÇÃO DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.). Itaguaí, 1994. 98p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

- THUNG, M. **Bean agronomy in monoculture in common beans: Research for crop improvement**. Eds. A. Van Schoonhoven and O. Voysest. CAB International, Wallingford, UK, p. 737-834, 1991.
- TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**. The Hague, v.152, p.131-138, 1993a.
- TSAI, S.M.; SILVA, P.M.; CABEZAS, W.L.; BONETTI, R. Variability in nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) intercropped with maize. **Plant and soil**. The Hague, v.152, p.93-101, 1993b.
- URURAHY, I.C.C. Vegetação: as regiões de vegetação do Brasil. In: Brasil. Ministério das minas e energia. **Projeto RADAM Brasil**. Folhas SF 23/24. Rio de Janeiro/Vitória: Levantamento de recursos naturais. Rio de Janeiro. 1975. v.4, p.557-611.
- VARGAS, A.A.T. TOLERANCE OF BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.) AND *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TO LOW PH. Minneapolis, 1987, 123p. Tese (PhD.) University of Minnesota.
- VARGAS, A.A.T.; GRAHAM, P.H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. **Plant and Soil**. The Hague. v.117, p.195-200, 1989.
- VARGAS, A.A.T.; ATHAYDE, J.T.; GRAHAM, P.H. Métodos de inoculação do feijoeiro com *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. **Revista Microbiológica**. São Paulo. v.21, n. 1, p. 5-10, 1990.

VAKHANIYA, N.A.; ABASHIDZE, N.D.; CHOKHELI, M.D.; NUTSUBIDZE, N.N.

Influence of nitrate and molybdate on nitrogen fixation and productivity of common bean. **Soviet Plant Phisiology**. v.37, n.4, p.483-487, 1991.

VIEIRA, C.; NOGUEIRA, A.O.; ARAÚJO, G.A.A. Adubação nitrogenada e molíbdica na cultura do feijão. **Revista de Agricultura**. v.67, n.2, p.117-124. 1992.

VIEIRA, R.F.; SALGADO, L.T.; VIEIRA, C. Rizóbio, molibdênio e cobalto na cultura do feijoeiro no alto paranaíba e noroeste de Minas Gerais. **Revista Ceres**. v.41, n.238, p.688-694, 1994.

VIEIRA, R.F.; EFEITO DA INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO E DAS ADUBAÇÕES COM NITROGÊNIO E MOLIBDÊNIO SOBRE A NUTRIÇÃO NITROGENADA DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*). Piracicaba, 1994. 189p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo.

VILHORDO, B.W.; MULLER, L.; EWALD, L.F.; LEÃO, M.L. Hábito de crescimento em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agronomica Sulriograndense**, v.16, n.1, p.79-98, 1980.

VINCENT, J.M. **Manual practico de rizobiologia**. 1 ed. Buenos Aires: Hemisferio sur, S.R.L., 1975. 200p.

WILSON, K.J.; GILLER, K.E.; JEFFERSON, R.A. B-glucoronidase (gus) operon fusion as tool for studyng plant-microbe interactions. In: Advances in molecular genetics of plant microbe interactions. Dortrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.226-229.

WILSON, K.J.; SESSITSCH, A.; AKKERSMANS, A. Molecular markers as tools to study the ecology of microorganisms. In: Beyond the Biomass: Composition and functional analysis of soil microbial communities. Chichester, UK: John Wiley, 1994. p.149-156.

WILSON, K.J. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. **Soil Biology & Biochemistry**. v.27, n.4/5, p.501-514, abr/mai, 1995.

WILSON, K.J.; SESSITSCH, A.; CORBO, J.C.; GILLER, K.E.; AKKERMANS, A.D.L.; JEFFERSON, R.A. B-glucuronidase (Gus) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. **Microbiology**. v.141, p. 1691-1705, 1995.

WOLYN, D.J.; ATTEWELL, J.; LUDDEN, P.W.; BLISS, F.A. Indirect measures of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field conditions: The role of lateral root nodules. **Plant and Soil**. The Hague. v.113, p.181-187, 1989.