

INÍCIO DA NODULAÇÃO EM SETE CULTIVARES DE FEIJOEIRO INOCULADAS COM DUAS ESTIRPES DE *RHIZOBIUM*¹

FÁBIO F. DE ARAÚJO², RUBENS E. V. MUNHOZ³ e MARIANGELA HUNGRIA⁴

RESUMO - A nodulação precoce e manutenção de nódulos efetivos durante o florescimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) podem favorecer a fixação biológica do N₂ nessa cultura. Dessa forma, procurou-se identificar o potencial de indução dos genes da nodulação e o potencial de atração simbiótica das raízes de sete cultivares de feijoeiro inoculadas com duas estirpes de *Rhizobium*. As simbioses diferiram quanto à exsudação dos indutores dos genes *nod*, pela planta hospedeira, e quanto à síntese de moléculas, pelo rizóbio, responsáveis pelo incremento no número de pêlos radiculares e esses dois parâmetros estiveram relacionados positivamente com a nodulação e fixação do N₂. Todas as cultivares apresentaram boa adesão do rizóbio, com recuperação média de 0,72% a 8,61% do inóculo inicial, respectivamente, na raiz primária e nas raízes secundárias. Nas cultivares de grãos bege ou amarelo, entretanto, a recuperação de células nas raízes secundárias superou em mais de dez vezes aquela encontrada nas raízes primárias, indicando um potencial para nodulação secundária. As cultivares Carioca e ESAL-580 apresentaram os melhores desempenhos simbióticos, enquanto a IAPAR-20 e a Rio Tibagi apresentaram os piores desempenhos.

Termos para indexação: adesão radicular, fixação biológica do nitrogênio, fator Nod, flavonóides, genes da nodulação, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium tropici*.

INITIAL NODULATION IN SEVEN BEAN CULTIVARS INOCULATED WITH TWO *RHIZOBIUM* STRAINS

ABSTRACT - Early nodulation and maintenance of nodule activity after common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flowering can favor higher N₂ fixation rates with the culture. Consequently, we have tried to identify the potential of induction of rhizobial nodulation genes and the potential of attraction of rhizobia to roots of seven bean cultivars inoculated with two *Rhizobium* strains. Differences were found among symbioses in relation to the exudation of *nod*-gene-inducing compounds by the host plant and in relation to the synthesis of molecules, by the *Rhizobium*, responsible for the increase in the number of root hairs. These two parameters were positively related to higher nodulation and N₂ fixation rates. All cultivars have shown good adhesion of rhizobia recovering, in average, 0.72% to 8.61% of initial inoculum, respectively on the primary and secondary roots. The recovery of cells on the secondary roots of cultivars with light-brown or yellow seed coat was ten times higher than in the primary root, indicating a good potential for secondary nodulation. The best symbiotic performances were achieved by cultivars Carioca and ESAL-580 and the worst by IAPAR-20 and Rio Tibagi.

Index terms: biological nitrogen fixation, flavonoids, Nod factor, nodulation genes, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium tropici*, root adhesion.

INTRODUÇÃO

O feijão é largamente consumido no Brasil, constituindo uma das principais fontes de proteína da população. Ocupa grandes áreas cultivadas, mas com produtividade baixa, em média 505 kg/ha (Anuário..., 1993). A falta de tecnologia, na maioria dos cultivos, contribui decisivamente para a perda de produtivi-

¹ Aceito para publicação em 19 de março de 1996.

² Eng. Agr., M.Sc., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. Bolsista da CAPES.

³ Biólogo, TURFAL LTDA. Caixa Postal 7410, CEP 82530-030 Curitiba, PR.

⁴ Eng. Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPSo. Bolsista do CNPq.

dade do feijoeiro no País e, nesse quadro, o fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o N e o P, é um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos (Araujo, 1994).

A inoculação das sementes com bactérias do gênero *Rhizobium* apresenta-se como uma tecnologia de baixo custo para o fornecimento de nitrogênio às plantas. Não há dúvidas de que, em condições de casa de vegetação, determinadas combinações de cultivares de feijoeiro com estirpes de *Rhizobium* podem fornecer N ao feijoeiro em quantidades equiparáveis às das plantas que recebem N mineral (Hungria et al., 1985; Hungria & Neves, 1987; Barradas et al., 1989). No campo, porém, tanto há relatos de respostas positivas à inoculação (Ferraz, 1982; Duque et al., 1985; Costa et al., 1989; Araujo, 1994), quanto negativas (Pereira et al., 1984; Nicoloso & Santos, 1990). Desse modo, freqüentemente se questiona a capacidade do feijoeiro em suprir suas necessidades nitrogenadas pelo processo de fixação biológica do N₂, fazendo-se recomendável o uso de fertilizantes nitrogenados naquela cultura (Brasil, 1993).

Diversos fatores ambientais, como temperatura, umidade e acidez, podem ser responsáveis pelo insucesso da simbiose *Rhizobium*-feijoeiro no campo (Hungria & Franco, 1993; Araujo, 1994). Entre os fatores intrínsecos à simbiose, porém, o mais citado é o ciclo curto da cultura, que não permitiria o acúmulo das quantidades necessárias de N ao desenvolvimento das plantas (Hungria & Thomas, 1987; Barradas et al., 1989; Chaverra & Graham, 1992; Kipe-Nolt & Giller, 1993; Kipe-Nolt et al., 1993; Araujo, 1994). Um aumento no período ativo de fixação do N₂ pode ser conseguido pela seleção de plantas e bactérias que permitam a nodulação precoce (Barradas & Hungria, 1989; Barradas et al., 1989; Hungria et al., 1991a) ou a senescência tardia dos nódulos (Hungria & Franco, 1988; Barradas et al., 1989; Boddey & Hungria, 1990).

A formação dos nódulos ocorre como resultado de um processo com etapas múltiplas, que inicia com a exsudação de substâncias quimiotáticas e/ou compostos que estimulam a multiplicação do rizóbio. Sinais moleculares são, então, exsudados pela planta hospedeira e, no caso do feijoeiro, o principal grupo de compostos indutores das sementes foi identifica-

do como antocianinas e flavonóis, que também são responsáveis pela coloração dos grãos. A bactéria responde aos indutores da planta com a síntese de outros sinais moleculares, os fatores Nod, que são lipo-oligossacarídeos (também denominados, mais recentemente, oligossacarídeos lipo-quitínicos), os quais provocam alterações morfológicas nas raízes, que devem ocorrer, obrigatoriamente, no estágio da pré-infecção. Somente após essas etapas, segue-se a aderência das bactérias aos pêlos radiculares, a penetração do rizóbio na raiz e a formação, propriamente dita, dos nódulos (Hungria, 1994).

Embora a nodulação do feijoeiro ocorra, inicialmente, na raiz principal, sabe-se que as raízes laterais têm uma participação efetiva na nodulação e fixação de N₂, contribuindo para a formação de nódulos em etapas posteriores do desenvolvimento da planta e incrementando o período ativo de fixação, o que resulta em maior acúmulo de N nos tecidos (Wolyn et al., 1989; Hardarson et al., 1993). Conquanto as interações entre a nodulação primária e a secundária no feijoeiro tenham sido pouco estudadas, em estudos com outras leguminosas, foi estabelecido que a nodulação é um processo auto-regulado pela planta hospedeira e que a formação de nódulos na raiz primária inibe a nodulação posterior (Pierce & Bauer, 1983; Rolfe et al., 1988). No Brasil, não há estudos sobre a nodulação nas raízes secundárias e desconhecem-se as características das cultivares de feijoeiro e estirpes de rizóbio que se relacionam com a nodulação precoce e a senescência tardia dos nódulos, permitindo a prolongação do período ativo de fixação do N₂.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de diferentes cultivares de feijoeiro, inoculadas com as duas estirpes de *Rhizobium* (SEMIA 4064 e SEMIA 4077), que hoje são recomendadas comercialmente, em relação a algumas etapas iniciais do processo de nodulação nas raízes primária e secundárias do feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivares de feijoeiro e estirpes de bactéria

Foram avaliadas sete cultivares de feijoeiro, uma com grãos de coloração amarela, tipo comercial jalinho (EMGOPA-201), três com coloração bege com rajas havana,

tipo comercial Carioca (ESAL-580, Carioca, Carioca-80), uma do grupo comercial mulatinho, com coloração bege (IPA-7) e duas do tipo comercial preto, com tegumento de coloração preta (IAPAR-20 e Rio Tibagi). Essas cultivares foram escolhidas como representativas de diferentes regiões do País (Tabela 1). Para a inoculação, utilizaram-se duas estirpes de *Rhizobium* que nodulam o feijoeiro, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4064 (= UMR 1135 ou =UFRGS 196, isolada na Universidade de Minnesota, Estados Unidos) e *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (= CIAT 899, =UMR 1899 ou =HAMB1 1163, isolada no CIAT, Colômbia). Até a V RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*), essas duas estirpes foram recomendadas para a utilização em inoculantes comerciais. Como a SEMIA 4064, contudo, vinha mostrando perda da capacidade de nodular e da eficiência no campo, ela deixou de ser recomendada a partir da VI RELARE (Hungria & Araujo, 1995). O meio de cultura para crescimento das estirpes foi o extrato de levedura-manitol (YM) (Vincent, 1970).

Indução dos genes da nodulação de *Rhizobium* pelos exsudatos das sementes

As sementes de feijoeiro foram desinfetadas superficialmente (Vincent, 1970) e incubadas em água deionizada e estéril, sob agitação, para permitir aeração, durante 24 horas. As soluções foram esterilizadas por filtração, em filtros millipore estéreis, com diâmetros de poros sucessivos de 0,8, 0,4 e 0,2 µm. Antes do uso, as soluções foram checadas para contaminação em meio YM, por 72 horas. A indução dos genes da nodulação foi avaliada pela atividade da β-galactosidase, conforme descrito por Hungria et al. (1991b), utilizando-se a estirpe RBL 1283 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, que contém a fusão *nodA::lacZ* em seu plasmídeo simbiótico. O ensaio foi conduzido com quatro repetições.

Efeito da inoculação no fenótipo Hai

O fenótipo Hai (hair induction, aumento no número de pêlos radiculares) nas raízes primária e secundárias, em

resposta à inoculação, foi estudado em condições axênicas, isto é, na ausência de outros microrganismos. As sementes foram desinfetadas superficialmente, pré-germinadas em câmara de germinação a 25°C, por dois dias, e plantadas em frascos de 500 ml, que continham 150 ml de meio com 8 g.l⁻¹ de ágar e solução nutritiva isenta de N, adicionados de 0,5 ml.l⁻¹ da solução estoque de Somasegaram & Hoben (1985), a um pH final de 6,8. Os frascos foram cobertos com algodão e gaze e esterilizados em autoclave, antes do plantio. A seguir, as sementes foram inoculadas com 1 ml por semente das estirpes crescidas em meio YM, com 10⁵ células.ml⁻¹. O experimento foi conduzido em condições controladas, em câmara de crescimento a 26°C e 60% de umidade, com regime de luminosidade de 12h/12h (dia/noite). Aos 15 dias após o plantio, o fenótipo Hai foi avaliado por microscopia óptica, após a coloração com 0,01% de azul de metileno (p/v) em água deionizada, incubação por 15 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente e lavagem cuidadosa, por pelo menos três vezes, em água deionizada (Hungria et al., 1994). Foram atribuídas notas de 0 a 5 para a densidade de pêlos radiculares, segundo escala de Hadas & Okon (1987), com 0 para a menor densidade e 5 para a maior. O ensaio foi conduzido com quatro repetições.

Adesão de *Rhizobium* às raízes

O teste de adesão às raízes foi adaptado do descrito por Boiardi & Galar (1988). Inicialmente, procedeu-se à desinfecção superficial das sementes (Vincent, 1970), que foram, então, colocadas em placas de Petri com algodão umedecido, em incubadora, a 28°C, durante quatro dias. Após a germinação das sementes, as pontas das raízes primárias (2 cm) foram cortadas com estilete esterilizado. Para cada cultivar, utilizaram-se 30 pontas de raízes, que foram colocadas em erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml de inóculo das estirpes SEMIA 4064 e SEMIA 4077 (1:1, v:v), na concentração de 10⁵ células.ml⁻¹. O material foi submetido à agitação mecânica constante (100 rpm, a 28°C), por 1 hora. Após esse procedimento, as raízes foram retiradas e secas, asépticamente, em papel-filtro esterilizado, sendo transferidas, em seguida,

TABELA 1. Características das cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizadas nos experimentos.

Cultivar	Massa de 100 sementes (g)	Nitrogênio nas sementes (%)	Cor do tegumento	Origem
EMGOPA-201	20,10	3,86	Amarelo	APROSSUL, Dourados (MS)
ESAL-580	18,95	3,80	Bege com rajadas havana	UFLA, Lavras (MG)
Carioca	21,10	3,90	Bege com rajadas havana	IAC, Campinas (SP)
Carioca-80	25,26	3,68	Bege com rajadas havana	UFLA, Lavras (MG)
IPA-7	25,20	3,66	Bege	IPA, Recife (PE)
IAPAR-20	19,21	3,97	Preta	IAPAR, Londrina (PR)
Rio Tibagi	17,48	3,41	Preta	IAPAR, Londrina (PR)

para erlenmeyer (1.000 ml), que continha 700 ml de água deionizada estéril, e novamente agitadas mecanicamente (150 rpm, a 28°C), por 5 minutos. Em seguida, foram retiradas oito pontas de raízes e distribuídas, duas a duas, em quatro tubos de ensaio, que continham 5 ml de solução Tween 80 a 0,1%, em água. Os tubos foram agitados por 1 minuto, procedendo-se, em seguida, à diluição seriada e ao plaqueamento (técnica de *pour-plate*, Vincent, 1970). As placas foram incubadas por quatro dias, em incubadora, a 28°C. No ensaio com raízes secundárias, as sementes foram germinadas em incubadora, durante cinco dias, para emissão de raízes, separando-se 64 pontas (32 sementes), com 3 cm de comprimento, de cada cultivar, seguindo-se a mesma metodologia descrita para raízes primárias. Após a incubação e a lavagem das raízes, foram retiradas 16 pontas de raízes do erlenmeyer, que foram distribuídas, quatro a quatro, em tubos de ensaio com 5 ml de solução Tween 80 a 0,1%. Em seguida, realizaram-se a diluição e o plaqueamento com incubação, conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos pelo número de células rizobiais recuperadas (formadoras de colônia em placa) para cada cultivar, com quatro repetições por tratamento.

Experimento de nodulação

Utilizaram-se, nesta etapa, vasos de polipropileno (9,0 cm de altura e 7,5 cm de diâmetro) com 100 g de vermiculita, esterilizados em autoclave (1 h, 128°C, 1,5 atm), sendo, posteriormente, umedecidos com 70 ml de água deionizada estéril e 50 ml de solução nutritiva de Norris isenta de N (Vincent, 1970). Sementes de cada cultivar foram desinfetadas superficialmente e incubadas a 28°C, conforme descrito anteriormente. Após 48 h, as raízes das sementes germinadas tiveram suas pontas marcadas com tinta à prova d'água (exceto as testemunhas), transplantando-se duas sementes por vaso. As estirpes de *Rhizobium* (SEMIA 4064 e 4077) foram multiplicadas, separadamente, em meio de cultura líquida (YM), por 48 h, em tubos que continham 10 ml de meio. Procedeu-se, em seguida, à contagem de células em câmara de Petroff-Hauser, padronizando-se a concentração das estirpes em 10^5 células.ml⁻¹, pela diluição em água deionizada estéril. A seguir, as sementes foram inoculadas com 1 ml da concentração final de cada estirpe por semente. Os vasos foram colocados em câmara de crescimento, com temperatura de 25/28°C (dia/noite), 14 h de fotoperíodo e 60% de umidade relativa. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Passados 30 dias, procedeu-se à coleta do experimento, avaliando-se a nodulação e considerando-se todos os nódulos formados acima da marca como nodulação acima da coroa. As plantas foram secas em estufa (65°C), até

atingirem peso constante e, para se obter o nitrogênio total fixado simbioticamente (analisado pelo método de Kjeldahl), somou-se o nitrogênio total da parte aérea e da raiz da planta, subtraindo-se o nitrogênio contido nos grãos de cada cultivar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à atividade indutora dos genes da nodulação, constatou-se que os maiores valores no ensaio da β -galactosidase foram conseguidos com exsudatos das sementes da cultivar Carioca, e que a ESAL-580 apresentou níveis de indução semelhantes (Tabela 2). Já a menor exsudação de indutores foi observada nas duas cultivares de grãos pretos, IAPAR-20 e Rio Tibagi. O fenótipo Hai, produzido por compostos solúveis sintetizados após a indução do rizóbio, espelhou a atividade indutora dos genes *nod*, tanto em relação ao maior número de pêlos radiculares (Carioca e ESAL-580), como em relação aos menores valores desse parâmetro (IAPAR-20 e Rio Tibagi) (Tabela 2).

Embora não fossem detectadas diferenças estatísticas entre as cultivares na recuperação de células na raiz primária, a 'IAPAR-20', a 'Carioca-80' e a 'Rio Tibagi' foram as que apresentaram maior aderência de rizóbio (Tabela 3). A adesão das células foi maior nas raízes secundárias, destacando-se o bom desempenho da 'ESAL-580', da 'Carioca 80' e da 'IAPAR 20' (Tabela 3). As cultivares recuperaram, em média, 0,72% do inóculo inicial na raiz primária e 8,61% nas raízes secundárias.

Foram observadas diferenças significativas, entre as sete cultivares de feijoeiro, no comportamento simbiótico (Tabela 4). A cultivar Carioca, seguida pela ESAL-580, apresentou destaque nos parâmetros de número de nódulos, massa nodular seca e N total fixado. As demais cultivares não apresentaram diferenças significativas nesses mesmos parâmetros, mas aquelas de grãos pretos, IAPAR-20 e Rio Tibagi, foram as que apresentaram menores valores de N total proveniente da fixação. O parâmetro de porcentagem de nódulos acima da marca na raiz demonstrou uniformidade entre as cultivares (Tabela 4).

Na primeira etapa do processo da nodulação, ocorre a troca de sinais moleculares entre a planta hospedeira e o microssimbionte (Hungria, 1994). Inicialmente, a planta hospedeira exsuda indutores dos genes da nodulação (genes *nod*) do rizóbio e, no

TABELA 2. Atividade indutora dos genes da nodulação (avaliada indiretamente pelo ensaio da β -galactosidase com a estirpe RBL1283, contendo a fusão *nodA::lacZ* no pSym) de exsudatos de sementes de sete cultivares de feijoeiro e fenótipo Hai (aumento no número de pêlos radiculares) dessas cultivares infectadas com as estirpes de *Rhizobium* SEMIA 4064 e 4077, na concentração de 10^5 células.ml⁻¹. Médias de quatro repetições.¹

Cultivar	Atividade da β galactosidase	Densidade de pêlos radiculares ²	
	(U.semente ⁻¹ .h ⁻¹)	Raiz principal	Raízes Secundárias
EMGOPA-201	1001 b	2,75 a	4,13 a
ESAL-580	1312 a	2,75 a	4,25 a
Carioca	1514 a	2,75 a	4,25 a
Carioca-80	802 b	2,25 a	4,00 ab
IPA-7	998 b	2,75 a	4,00 ab
IAPAR-20	687 c	2,50 a	3,13 bc
Rio Tibagi	622 c	1,25 b	3,00 c

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

² Escala de notas de 0 (menor) a 5 (maior), segundo Hadas & Okon (1987).

TABELA 3. Número de células recuperadas de raízes primárias e secundárias de sete cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectadas com as estirpes SEMIA 4064 e 4077 (10^5 células.ml⁻¹). Parâmetro avaliado aos quatro dias após a inoculação. Médias de quatro repetições.¹

Cultivar	Número de células aderidas (log)	
	Principal	Secundária
EMGOPA-201	2,72 a	3,43 ab
ESAL-580	2,23 a	4,60 a
Carioca	2,64 a	3,31 b
Carioca 80	2,92 a	3,94 ab
IPA 7	2,20 a	3,19 b
IAPAR 20	3,33 a	3,68 ab
Rio Tibagi	2,90 a	2,83 b

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

caso do feijoeiro, os compostos das sementes foram identificados como flavonóides, que estão associados à cor do tegumento (Hungria et al., 1991b). Foi demonstrado, ainda, que uma cultivar mutante com grãos brancos exsudava menos indutores e, apresentava, também, nodulação reduzida (Hungria & Phillips, 1993). O feijoeiro apresenta uma grande variação na coloração das sementes, controlada por diversos genes relacionados com a síntese de

flavonóides (Feenstra, 1960). Neste trabalho, os exsudatos de duas cultivares com coloração bege com rajas havana, ESAL-580 e Carioca, apresentaram maior atividade de indução dos genes *nod*, enquanto os menores valores foram encontrados nas cultivares de grãos pretos, IAPAR-20 e Rio Tibagi. No segundo passo de sinalização molecular, o rizóbio, induzido pelos flavonóides, sintetiza oligossacarídeos lipo-quitínicos, chamados de fatores Nod, que

TABELA 4. Nodulação e N total acumulado nos tecidos de sete cultivares de feijoeiro infectadas com as estirpes SEMIA 4064 e 4077. Plantas coletadas aos 30 dias após o plantio. Médias de quatro repetições.¹

Cultivar	Nodulação			N total fixado (mg N.pl ⁻¹)
	Número (n°.pl ⁻¹)	Massa (mg.pl ⁻¹)	% acima da coroa	
EMGOPA-201	145 b	47,8 b	40,5 a	23,6 b
ESAL-580	196 a	69,2 a	33,2 a	26,6 ab
Carioca	232 a	78,0 a	39,6 a	36,0 a
Carioca-80	121 b	38,5 b	50,2 a	24,8 b
IPA-7	101 b	45,8 b	45,0 a	23,8 b
IAPAR-20	84 b	48,8 b	50,7 a	16,6 b
Rio Tibagi	108 b	52,5 b	42,6 a	21,4 b

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

são responsáveis por modificações no fenótipo das raízes, como o incremento no número de pêlos radiculares (fenótipo Hai). De fato, constatou-se que a maior atividade indutora dos genes *nod* correspondeu ao maior número de pêlos radiculares nas raízes primária e secundárias das cultivares Carioca e ESAL-580. As cultivares Carioca e ESAL-580 destacaram-se, também, pelo melhor desempenho simbiótico, avaliado tanto em termos de nodulação como de N total fixado, enquanto as cultivares de grãos pretos caracterizaram-se pelas menores taxas de fixação do N₂.

A adesão das bactérias às raízes também vem sendo amplamente estudada, havendo relatos sobre o envolvimento de adesinas, lecitinas e fibrilas das bactérias (Bohlool & Schmidt, 1974; Dazzo & Hubbell, 1975; Smit et al., 1986; Vesper & Bauer, 1986), entre outros. Em diversos estudos foi constatado, ainda, que apenas uma pequena proporção das bactérias presentes no meio é capaz de aderir às raízes, embora os sítios de adesão permaneçam insaturados mesmo em concentrações de 10⁸ bactérias.ml⁻¹ (Pueppke, 1984; Vesper & Bauer, 1985). Diversos fatores estão envolvidos nessa adesão, como o estágio de crescimento da bactéria (Smith & Wollum II, 1991), e existem zonas radiculares mais suscetíveis à nodulação, cuja maior capacidade de aderência ocorre somente por algumas horas (Bhuvaneswari et al., 1980; Smith & Wollum II, 1989). Essa combinação de exigências, aliada a diversos relatos de correlação

positiva entre a capacidade de adesão de uma bactéria e a nodulação, faz crer que esse seja um passo limitante ao sucesso da nodulação.

De um modo geral, comparando-se os resultados deste ensaio com os obtidos por Boiardi & Galar (1988), também em feijoeiro, pode-se considerar que todas as cultivares apresentaram bom potencial de atração do rizóbio, mas confirmam que apenas uma pequena proporção das bactérias presentes no meio é capaz de aderir às raízes. Neste experimento, a recuperação variou de 0,72% a 8,61% do inóculo inicial e os dados citados na literatura variam de 0,4% (Pueppke, 1984) a 15% (Vesper & Bauer, 1985) da população total. Em todas as cultivares de grãos bege ou amarelo, a recuperação de células nas raízes secundárias superou em mais de dez vezes aquela encontrada nas raízes primárias, indicando um potencial para nodulação secundária, que seria de grande importância para a manutenção dos níveis de fixação do N₂ nas fases vegetativa e reprodutiva do feijoeiro (Wolyn et al., 1989; Hardarson et al., 1993).

A verificação de parâmetros que se relacionam com a nodulação precoce do feijoeiro é de grande importância em programas que visem incrementar o período ativo de fixação do N₂ nessa cultura (Hungria & Thomas, 1987; Barradas & Hungria, 1989; Barradas et al., 1989). Os nódulos precoces, contudo, estão geralmente associados às raízes primárias que, pela natureza auto-regulatória da nodulação, podem inibir a nodulação posterior, particularmente nas raízes

secundárias (Pierce & Bauer, 1983; Rolfe et al., 1988; George et al., 1992). Nesse contexto, este trabalho procurou identificar cultivares com potencial de nodulação precoce, em que o estágio de troca de sinais moleculares fosse intensificado, mas que apresentassem, ao mesmo tempo, potencial de atração do rizóbio pelas raízes secundárias. Pode-se concluir que a nodulação e o N total fixado estiveram altamente associados às etapas de comunicação molecular e que as cultivares de grãos pretos, com os menores acúmulos de N proveniente da fixação, apresentaram uma relação mais estreita entre a adesão às raízes secundárias e a adesão às raízes primárias.

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que os parâmetros de indução dos genes *nod*, o aumento no número de pêlos radiculares e a relação entre adesão de bactérias à raiz primária e às raízes secundárias podem ser utilizados nos programas que visam incrementar o potencial simbiótico do feijoeiro. Nesses programas, deve-se investigar tanto o potencial infectivo das raízes primárias como o das raízes secundárias, para permitir a maximização das taxas de fixação do N₂.

CONCLUSÕES

1. As cultivares diferem quanto à exsudação dos indutores dos genes *nod* pela planta hospedeira e quanto ao fenótipo Hai, produzido em resposta aos fatores Nod, sintetizados pelo rizóbio.

2. As cultivares apresentam boa adesão do rizóbio e recuperam, em média, de 0,72% a 8,61% do inóculo inicial, respectivamente na raiz primária e nas raízes secundárias.

3. As cultivares de grãos com coloração bege ou amarela apresentam maior potencial de nodulação nas raízes secundárias do que as de grãos com coloração preta.

AGRADECIMENTOS

À Leny M. Miura, pelo auxílio técnico.

REFERÊNCIAS

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: IBGE, 1993.

- ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.91-120.
- BARRADAS, C.A.A.; BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Seleção de cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* para nodulação precoce e senescência tardia nos nódulos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.13, p.169-179, 1989.
- BARRADAS, C.A.A.; HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. I - Precocidade para nodulação e fixação do nitrogênio. **Turrialba**, Costa Rica, v.39, p.236-242, 1989.
- BHUVANESWARI, T.V.; TURGEON, B.G.; BAUER, W. D. Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p.1027-1031, 1980.
- BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. II - Senescência tardia nos nódulos. **Turrialba**, Costa Rica, v.40, p.33-39, 1990.
- BOHLOOL, B. B.; SCHMIDT, E. L. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Science**, Washington, v.185, p.269-271, 1974.
- BOIARDI, J.L.; GALAR, M.L. Nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. as affected by *Rhizobium phaseoli* growth phase. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.34, p.63-67, 1988.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Recomendações técnicas para o cultivo do feijoeiro, zonas 61 a 63**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1993. p.93.
- CHAVERRA, M.H.; GRAHAM, P.H. Cultivar variation in traits affecting early nodulation of common bean. **Crop Science**, Madison, v.26, p.911-916, 1992.
- COSTA, R.C.L.; LOPES, N.F.; OLIVA, M.A.; BARROS, N.F. Crescimento e conversão da energia solar em feijão submetido a três doses de nitrogênio e dois regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.12, p.1439-1450, 1989.
- DAZZO, F.B.; HUBBELL, D.H. Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis. **Applied Microbiology**, Washington, v.30, p.1017-1033, 1975.
- DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L.; BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N₂ fixation using

- ¹⁵N. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.88, p.333-343, 1985.
- FEENSTRA, W.J. Biochemical aspects of seedcoat colour inheritance in *Phaseolus vulgaris* L. **Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen**, Wageningen, v.60, p.1-53, 1960.
- FERRAZ, S.M.G. **Eficiência da fixação simbiótica em feijoeiro (*P. vulgaris* L.) quando consorciado com milho (*Zea mays* L.)**. Piracicaba: ESALQ, 1982., 55p., Tese de Mestrado.
- GEORGE, M.L.C.; ROBERT, F.M.; BOHLOOL, B.B. Nodulation suppression by *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* in bean split root system. **Symbiosis**, Rehovot, v.12, p.95-105, 1992.
- HADAS, R.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.5, p.241-247, 1987.
- HARDARSON, G.; BLISS, F.A.; GIGALES-RIVERO, M.R.; HENSON, R.A.; KIPE-NOLT, J.A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABRIALES, J.J.; PEREIRA, P.A.A.; SANABRIA, C.A.; TSAI, S.M. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.59-70, 1993.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p.339-364, 1994.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Relato da VI reunião de laboratórios para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S. (Eds.). **Microbiologia do Solo: desafios para o Século XXI**. Londrina: IAPAR, 1995. p. 476-489.
- HUNGRIA, M.; BARRADAS, C. A.; WALLSGROVE, R. M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, p.839-844, 1991a.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Effects of high temperatures on nodulation and N₂ fixation in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.149, p.95-102, 1993.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris*. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.65, p.341-346, 1988.
- HUNGRIA, M.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seed of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.751-758, 1991b.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Partitioning of nitrogen fixation from biological fixation and fertilizer in *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.69, p.55-63, 1987.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro; II - Absorção e translocação do N mineral e do N₂ fixado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.9, p.202-209, 1985.
- HUNGRIA, M.; PHILLIPS, D. A. Effects of a seed color mutation on rhizobial *nod*-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.6, p.418-422, 1993.
- HUNGRIA, M.; THOMAS, R. J. Effects of cotyledons and nitrate on nitrogen assimilation of *Phaseolus vulgaris* L. **Mircen Journal of Applied Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.3, p.411-419, 1987.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R.; MENDES, I.C. Identificação de parâmetros relacionados com a eficiência e capacidade competitiva do rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.285-325.
- KIPE-NOLT, J.A.; GILLER, K.E. A field evaluation using the ¹⁵N isotope dilution method of lines of *Phaseolus vulgaris* L. bred for increased nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.107-114, 1993.
- KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H.; GILLER, K.E. Nitrogen fixation in breeding lines of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.103-106, 1993.
- NICOLOSO, F.T.; SANTOS, O.S. Efeitos do nitrogênio mineral, molibdênio e inoculação com *Rhizobium* no feijoeiro comum. **Revista Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v.20, p.23-35, 1990.
- PEREIRA, P.A.A.; ARAUJO, R.S.; ROCHA, R.E.M.; STEINMETZ, S. Capacidade de genótipos de feijoeiro de fixar N₂ atmosférico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, n. 7, p.811-815, 1984.

- PIERCE, M.; BAUER, W.D. A rapid regulatory response governing nodulation in soybean. **Plant Physiology**, Bethesda, v.90, p.1347-1352, 1983.
- PUEPPKE, S.G. Adsorption of slow- and fast-growing rhizobia to soybean and cowpea roots. **Plant Physiology**, Bethesda, v.75, p.924-928, 1984.
- ROLFE, C.M.; YAO, P.Y.; VINCENT, J.M. Nodulating competitiveness amongst strains of *Rhizobium meliloti* and *R. trifolii*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.25, p.317-319, 1988.
- SMIT, G.; KIJNE, J. W.; LUGTENBERG, B. J. J. Correlation between extracellular fibrils and attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.168, p.821-827, 1986.
- SMITH, G.B.; WOLLUM II, A.G. Bacterial culture history affects the attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to host *Glycine max* roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.37, p.730-736, 1991.
- SMITH, G.B.; WOLLUM II, A. G. Nodulation of *Glycine max* by six *Bradyrhizobium japonicum* strains with different competitive abilities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v.55, p.1957-1962, 1989.
- SOMASEGARAM, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume - Rhizobium technology**. Hawaii: Niftal, 1985. 367p.
- VESPER, S.J.; BAUER, W.D. Characterization of *Rhizobium* attachment to soybean roots. **Symbiosis**, Rehovot, v.1, p.139-162, 1985.
- VESPER, S.J.; BAUER, W. D. Role of pili (fimbriae) in attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, p.134-141, 1986.
- VINCENT, J.M. **A Manual for the practical study root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1970. 164p. (IBP Program Handbook, 15).
- WOLYN, O.J.; ATTEWEL, 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**, Dordrecht, v.113, p.181-187, 1989.