

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

TESE

INOCULANTE OLEOSO E SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO SUBMETIDO À
SECA E À ALTA TEMPERATURA APÓS A SEMEADURA DO FEIJOEIRO.

ANA CRISTINA BROUCK DE ARAUJO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

INOCULANTE OLEOSO E SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO SUBMETIDO À
SECA E À ALTA TEMPERATURA APÓS A SEMEADURA DO FEIJOEIRO.

ANA CRISTINA BROUCK DE ARAUJO

Sob a orientação do Doutor
Avílio Antônio Franco

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau
de *Magister Scientiae*.
Àrea de concentração em Ciência
do Solo.

Itaguaí, Rio de Janeiro

1993

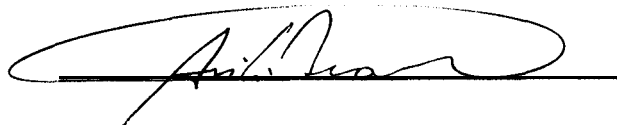
INOCULANTE OLEOSO E SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO SUBMETIDO À
SECA E À ALTA TEMPERATURA APÓS A SEMEADURA DO FEIJOEIRO.

AUTORA

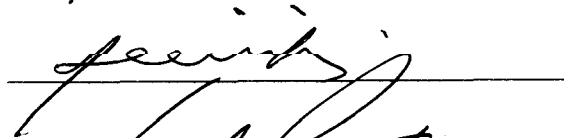
ANA CRISTINA BROUCK DE ARAUJO

Aprovado em : 19 / 11 / 93

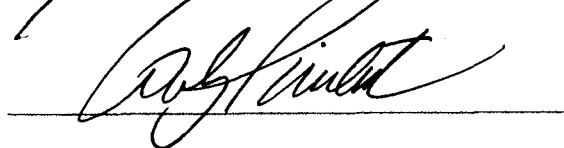
Dr Avílio Antônio Franco



Dr. Helvécio De-Polli



Dr. Carlos Pimentel



Dedico esta tese ao meu esposo
Nelson, pelo apoio e incentivo
durante esta fase de minha vida
profissional.

AGRADECIMENTOS

- Em especial ao Dr. Avílio Antônio Franco, pela orientação, amizade e incentivo no decorrer do trabalho;
- Aos amigos Ellen de Oliveira, Eliane de Oliveira, Maria de Lourdes, Fátima Moreira, Luis Cláudio, Marcos Gervásio, Daniel Vidal, Eli, Verônica Reis e Bruno Alves pelo apoio, incentivo e solidariedade;
- Aos demais amigos, pelo incentivo e companheirismo;
- Ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação da UFRRJ, que contribuiu para a minha formação profissional;
- Aos pesquisadores e funcionários da EMBRAPA/CNPAB, e todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Ana Cristina Brouck de Araujo nasceu a 29 de abril de 1965, no Rio de Janeiro. Fez seu curso primário e secundário no Colégio Metropolitano, Méier-RJ. Graduiu-se Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1987. Em agosto de 1986 começou a desenvolver trabalhos de pesquisa na EMBRAPA/CNPAB, como bolsista de Iniciação Científica. Ingressou no curso de "Mestrado em Ciência do Solo" da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1988, conduzindo o trabalho de tese na EMBRAPA/CNPAB, Km 47, Itaguaí-RJ.

SUMÁRIO

	Página
1- RESUMO GERAL.....	xiv
GENERAL ABSTRACT.....	xvii
2- INTRODUÇÃO GERAL.....	1
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:	
3.1- PRODUÇÃO DE INOCULANTE PARA LEGUMINOSAS	4
3.1.1- ASPECTOS GERAIS	4
3.1.2- EFEITO DO VEÍCULO DO INOCULANTE NA SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO.....	6
3.2- EFEITO DOS FATORES AMBIENTAIS SOBRE A SIMBIOSE DE RIZÓBIO COM ESPÉCIES LEGUMINOSAS.....	10
3.2.1- ASPECTOS GERAIS.....	10
3.2.2- EFEITO DE ALTAS TEMPERATURAS DO SOLO NA SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO.....	12
3.2.3- EFEITO DA BAIXA UMIDADE DO SOLO NA SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO.....	15
4- CAPÍTULO I:	
OBTENÇÃO DE INOCULANTE OLEOSO COM ALTO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS.....	18
4.1- RESUMO.....	19
4.2- INTRODUÇÃO.....	21

4.3- MATERIAIS E MÉTODOS:	
4.3.1- OBTENÇÃO DE INOCULANTE.....	24
4.3.1.1- ESTIRPE DE RIZÓBIO E MEIO DE CULTIVO.....	24
4.3.2- CONTAGEM DE RIZÓBIO MISTURADO EM ÓLEO	24
4.3.3- SOBREVIVÊNCIA DE RIZÓBIO CENTRIFUGADO E/ OU LIOFILIZADO MISTURADO EM ÓLEO.....	26
4.3.4- EFEITO DA ARMAZENAGEM NA SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO LIOFILIZADO MISTURADO EM ÓLEO.	28
4.3.5- PRODUÇÃO DE INOCULANTE OLEOSO.....	30
4.3.6- PRODUÇÃO DE INOCULANTE TURFOSO.....	30
4.4- RESULTADOS.....	31
4.5- DISCUSSÃO.....	36
4.6- CONCLUSÕES.....	39
 5-CAPÍTULO II	
SOBREVIVÊNCIA DE RIZÓBIO EM INOCULANTE OLEOSO E TURFOSO SUBMETIDO A ALTA TEMPERATURA E BAIXA UMIDADE.....	40
5.1- RESUMO.....	41
5.2- INTRODUÇÃO	43
5.3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
5.4- RESULTADOS.....	51
5.5- DISCUSSÃO	57
5.6- CONCLUSÕES	60

6- CAPÍTULO III	
EFEITO DE INOCULANTE OLEOSO E TURFOSO NA NODULA- ÇÃO E PRODUÇÃO DO FEIJOEIRO NO CAMPO, SUBMETIDO A ESTRESSE DE SECA APÓS A SEMEADURA.....	61
6.1- RESUMO.....	62
6.2- INTRODUÇÃO.....	64
6.3- MATERIAIS E METODOS.....	67
6.4- RESULTADOS.....	72
6.5- DISCUSSÃO	82
6.6- CONCLUSÕES	85
7- CONCLUSÕES GERAIS.....	86
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
9- APÊNDICE.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1- Avaliação da sobrevivência do rizóbio em inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco (seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) e irrigado (irrigado desde o plantio), mantidos a temperatura ambiente (28°C - 30°C) ou à 40°C, 8 horas por dia, nos seguintes substratos:	
(a)vermiculita-areia.....	53
(b)solo Planossolo.....	54
(c)solo Podzólico Vermelho Amarelo.....	55
(d)solo Gley Húmico.....	56
Figura 2- Umidade do solo durante o período de estresse. Amostras coletadas de 0-10 cm de profundidade	70
Figura 3- Temperatura do ar e do solo durante o período de estresse, tomadas às 14:00h.....	70

- Figura 4- Número de nódulos de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco(seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) e irrigado (irrigado desde o plantio). Pontos da mesma coleta com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 76
- Figura 5- Peso de nódulos secos de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco (seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) e irrigado(irrigado desde o plantio). Pontos da mesma coleta com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 77
- Figura 6- Número, peso de nódulos secos e redução de acetileno de raízes de feijoeiro, cv.Carioca 80, inoculado com inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco(seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) e irrigado(irrigado. desde o plantio). Plantas colhidas 45 DAG. Colunas com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 78

- Figura 7- Redução de acetileno (atividade da nitrogênase) de raízes de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco (seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) e irrigado (irrigado desde o plantio). Pontos da mesma coleta com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 79
- Figura 8- Produção de matéria seca da parte aérea do feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega seco (seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) e irrigado (irrigado desde o plantio). Colunas com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 80
- Figura 9- Produção de grãos (kg/ha) de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco (seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) e irrigado (irrigado desde o plantio). Colunas com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 81

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1- Efeito do detergente na dispersão de células de rizóbio em diluições sucessivas para contagem.	33
Tabela 2- Avaliação da sobrevivência do rizóbio centrifugado e/ou liofilizado misturado ao óleo.....	34
Tabela 3- Avaliação da sobrevivência do rizóbio liofilizado misturado ao óleo nujol, guardado em frascos com tampa rosqueada ou com rolha de algodão...	35
Tabela 4- Análise química e granulométrica dos solos usados no experimento II.....	49
Tabela 5- Umidade inicial dos solos com ou sem estresse hídrico.....	50
Tabela 6- Análise química e granulométrica do solo (Planossolo - série Ecologia) do experimento de campo, antes da correção da fertilidade.....	71

1- RESUMO GERAL

Nos trópicos a nodulação e o aumento da produção de grãos de leguminosas, e principalmente do feijoeiro, são frequentemente limitados por condições adversas (acidez do solo, deficiência de fósforo, pragas, doenças, altas temperaturas e deficiência hídrica), afetando de forma mais acentuada, tanto a performance da inoculação, como a simbiose rizóbio-leguminosas. O sucesso na inoculação das sementes de leguminosas requer veículo de inoculante capaz de manter grande número de células de rizóbio, como é observado em turfa. Além disso, especialmente nas culturas de ciclo curto, é necessário que as bactérias inoculadas, mesmo sob condições adversas, sobrevivam e se multipliquem no solo em número suficiente para garantir uma nodulação abundante em plantas ainda jovens. O objetivo deste trabalho foi identificar um veículo para inoculante que permitisse maior sobrevivência

do rizóbio após o plantio das sementes e colonização das raízes após a germinação do feijoeiro sob condições de alta temperatura e baixa umidade. Após o desenvolvimento do inoculante misturando rizóbio liofilizado com óleo, foram feitos experimentos sob condições controladas em laboratório, usando três tipos de solos (Planossolo, Podzólico Vermelho Amarelo e Gley Húmico) e mistura, em volume, de vermiculita com areia (2:1) esterilizados, para estudar o efeito de alta temperatura e baixa umidade, na sobrevivência de rizóbio nas sementes, após inoculação e plantio do feijoeiro. Quando foi usado o inoculante convencional em turfa e as sementes plantadas em solo seco e mantido a 40°C por três dias, a sobrevivência do rizóbio foi praticamente nula. Por outro lado o inoculante oleoso apresentou uma redução de 10^7 para 10^4 células por semente. Nos tratamentos mantidos em solo seco a 30°C, o inoculante convencional em turfa apresentou uma redução de 10^7 para 10^3 células por semente, contra 10^7 para 10^5 para o inoculante oleoso. Nos três tipos de solos estudados, após o período de estresse hídrico, a irrigação proporcionou um rápido aumento do número de rizóbio para 10^8 células por semente, em todos os tratamentos, enquanto que na mistura vermiculita:areia esta recuperação não ocorreu. Em experimento em campo, em solo arenoso (Planossolo) foi confirmado que o inoculante oleoso, além de propiciar nodulação mais uniforme, no

tratamento com irrigação logo após o plantio, proporcionou nodulação e produtividade muito superior ao inoculante convencional em turfa, quando o solo foi mantido sem irrigação por 4 dias após a semeadura.

GENERAL ABSTRACT

In tropical areas, nodulation and increased grain yield by leguminous crops, in general and specially for *Phaseolus*, are often limited by adverse conditions (soil acidity, phosphorus deficiency, diseases, high temperature and water stress), affecting the inoculant quality as much as the legume-*Rhizobium* symbiosis. Successful seed inoculation with rhizobia requires carriers capable to maintain high numbers of rhizobia, as observed in peat. Beside that, especially in short cycle crop, it is necessary a survival of high number of rhizobia inoculated and their multiplication in the soil sufficient for early nodulation of the plants. The objective of this study was to identify inoculant carrier which allowed large survival of rhizobia after sowing the seeds and colonization of roots after germination of bean subject to high temperature and water stress. After obtaining an inoculant containing freeze dried *Rhizobium*

mixed with dry oil, experiments were conducted under controlled conditions, using three sterile soils (Planossolo, Podzólico Vermelho Amarelo e Gley Húmico) and a mixture of vermiculite with sand (2:1), to study the effect of high temperature and water stress on the survival of *Rhizobium*, after inoculation and sowing of seeds of *Phaseolus vulgaris*. In seeds inoculated with peat-based inoculum (107 cells/seed), after three days sown in dry soil under 40°C no survival of rhizobia was detected. In contrast when the inoculum was oil-based, under the same conditions at the end of treatment, 104 cells/seed could be recovered. For treatments maintained in dry soil at 30°C, the peat-based inoculant showed decline from 107 to 103 cells/seed, and from 107 to 105 for oil-base inoculant. On the three soils studied, after the period of water stress, the irrigation promoted increases in the number of rhizobia to 10s cells/seed, while on the mixture of vermiculite and sand these recuperation did not occurred. In a field experiment, conducted in a sandy soil (Planossolo), oil-based inoculum promoted more uniform and more abundant nodulation, than peat-base inoculum. When inoculated seeds were sown in dry soil and were maintained in such condition four days before irrigation, oil-based inoculum promoted early and more abundant nodulation and higher grain yield than peat-based inoculum.

2- INTRODUÇÃO GERAL

O feijão é uma importante fonte de proteína para os povos de muitos países, principalmente os da América Latina. No Brasil ele tem uma importância muito grande, onde representa a principal fonte de proteínas para as populações de baixa renda.

O feijão vem se destacando dentre os produtos que compõem agricultura nacional, pelo incentivo implícito via preço, pela incorporação de tecnologias melhoradas e estruturas de irrigação nas grandes propriedades, havendo inclusive aumento de produtividade nos últimos anos (CONAB-MARA, 1993).

Atualmente o Brasil conta com uma área plantada de cerca de $1,874 \times 10^6$ ha, produzindo cerca de $1,230 \times 10^6$ t, com produtividade média (92/93) em torno de 656 kg/ha, que está ainda muito abaixo do potencial produtivo desta cultura (CONAB-MARA, 1993).

Diversos fatores contribuem para a baixa produtividade do feijoeiro. Entre os principais fatores limitantes podemos destacar: baixa fertilidade natural e acidez dos solos, pragas, doenças, falta de aplicação de insumos, o uso de técnicas e manejo inadequados e aos estresses de seca e de calor.

O feijoeiro, assim como outras leguminosas, apresenta a vantagem de poder beneficiar-se da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, sendo capaz de formar uma estrutura especializada (nódulo) nas raízes, onde, através de um complexo enzimático denominado nitrogenase, tais bactérias captam o N_2 atmosférico, transformando-o em amônia, que pode ser então utilizada pela planta. Em troca a planta fornece à bactéria energia e fonte de carbono obtida através da fotossíntese.

O potencial de fixação de nitrogênio no feijoeiro é entretanto variável, já que tanto a planta quanto a bactéria são bastantes sensíveis aos estresses ambientais. Altas temperaturas e baixa umidade do solo tem se mostrado fatores limitantes a essa simbiose (Vincent, 1965; Lie, 1971, 1974; Scudder, 1975; Balasundaram, 1988).

Um fator importante para que ocorra boa nodulação e fixação de nitrogênio é a qualidade do inoculante utilizado. Como veículo do inoculante comercial no Brasil tem sido utilizada a turfa, que devido a falta de esterilização, falta de uniformidade, tem limitado os

benefícios esperados pelo uso dessa tecnologia.

O objetivo deste trabalho foi testar um veículo para inoculante que permitisse maior sobrevivência e colonização das raízes do feijoeiro sob condições de alta temperatura e baixa umidade do solo.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- PRODUÇÃO DE INOCULANTE PARA LEGUMINOSAS

3.1.1- ASPECTOS GERAIS

No Brasil, a produção de inoculantes com rizóbio para leguminosas a nível industrial iniciou-se na década de 1950. No início as culturas de rizóbio foram acondicionadas essencialmente sobre agar, porém, logo em seguida foi usado como veículo, o solo esterilizado e finalmente a turfa, seguindo a mesma tendência que ocorria em outros países (Freire, 1968; Vincent, 1970; Roughley, 1976).

Burton (1981) relata que apesar da turfa ser o veículo mais utilizado para produção de inoculantes comerciais, não é fácil de ser encontrada em muitos países, em alguns casos não atingindo as especificações de

um bom veículo para inoculante, além disso, raramente é feita esterilização da turfa antes do preparo do inoculante.

A qualidade dos inoculantes é estimada pela concentração de células viáveis de rizóbio, sendo determinada no início e durante o período de validade do produto, que tem sido de seis meses. Ela está condicionada ao tipo de veículo, umidade, aeração e fundamentalmente, pelas condições ambientais a que é submetido o inoculante até sua utilização.

Condições ambientais adversas tais como: calor e ressecamento, podem causar rápida diminuição no número de células viáveis (Kremer & Peterson, 1983).

Vincent (1980) relata que existe influência de outros fatores na viabilidade do rizóbio. A temperatura de armazenamento, a umidade e a troca de gases são importantes, como também o tipo de esterilização da turfa.

No Brasil, por lei regulamentada nº 86955 de 18 de fevereiro de 1982, oficializou-se o controle de qualidade dos inoculantes comerciais, indicando especificações, garantias e tolerâncias para os inoculantes. Para os inoculantes que contenham microrganismos fixadores de nitrogênio, estes deverão apresentar concentração mínima de 10^7 células viáveis por grama do produto no momento do uso.

3.1.2- EFEITO DO VEÍCULO DO INOCULANTE NA SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO.

Para ser um bom veículo a turfa deve ter qualidades tais como: alta retenção de umidade, uniformidade e facilidade de processamento, ausência de íons tóxicos para a bactéria (Cl^- , Na^+ , Al^{3+} , Mn^{2+} , etc), facilidade de esterilização, disponibilidade em quantidade adequada, baixo custo, boa adesão às sementes (Roughley, 1976). Além disso é necessário permitir controle de qualidade, o que nem sempre é possível com a turfa.

Devido a heterogeneidade da turfa, alto custo da esterilização, muitos trabalhos tem sido realizados buscando alternativas que possam substituir a turfa. Muitos materiais tem sido testados como veículos, tais como: palha de milho e minerais como apatita (Smith, 1987); carbono (Munevar & Graham, 1977; Packowski & Berryhill, 1979; Gonzalez et al., 1986); bagaço de cana (Leiderman, 1971; Graham et al., 1974); casca de arroz e casca de algodão (Gonzalez et al., 1986); diatomita, pó de casca de coco, vermiculita, vinhaça e composto urbano (Figueiredo, 1989), óleo (Kremer & Peterson, 1982; Eagleshan & Goldman, 1985); torta de filtro de usina de açúcar (Moretti & Saito, 1978) e outros.

Vantagens e desvantagens de diversos materiais para veículos transportadores tem sido discutidas nas

revisões feitas por Date & Roughley (1977), Burton (1979), Paczkowski & Berryhill (1979), Hiltbold et al. (1980) e Skipper et al. (1980), que relatam que estirpe, número de rizóbio viável e tipo de veículo podem contribuir para largas variações na eficiência dos inoculantes.

A eficiência da inoculação depende, entre outros fatores, da manutenção de alto número de células viáveis de rizóbio no inoculante desde a fabricação até o seu uso pelo agricultor (Meade et al., 1985). Além disso o veículo pode também afetar a sobrevivência do rizóbio após a inoculação, a germinação das sementes até o início do crescimento das raízes (Kremer & Peterson, 1982).

Entre outros fatores, condições adversas do meio ambiente (tais como acidez, toxidez de alumínio e manganês, deficiência de fósforo, altas temperaturas e baixa umidade) podem causar um rápido declínio no número de rizóbios aplicados às sementes (Bowen & Kennedy, 1959; Brockwell & Phillips, 1970; Scudder, 1975; Hardaker & Hardwick, 1978), restringindo anodulação e a fixação simbiótica de nitrogênio (Rai & Prasad, 1983).

Trabalhos tem sido desenvolvidos visando aumentar a sobrevivência do rizóbio na turfa, sob várias condições de temperatura e umidade. Associação de calcário, superfosfatos e outros materiais à turfa frequentemente melhoram a sobrevivência do rizóbio quando submetidas a altas temperaturas e a baixa umidade, mas não

de forma consistente (Brockwell & Phillips, 1970; Brockwell & Whalley, 1970).

O efeito deletério do ressecamento do veículo turfa na sobrevivência do rizóbio foi notado por Hedlin & Newton (1948); Vincent (1958); Freire (1963); Thompson et al. (1968) e Jauhri & Gupta (1987). Por outro lado o excesso de umidade também prejudicou a sobrevivência de *Rhizobium meliloti* (Van Schreven, 1954 citado por Roughley, 1968).

A influência da temperatura foi estudada por Spencer & Newton (1953); Gunning & Jordan (1954); Vincent (1958) e Roughley & Vincent (1967), que usando turfa aquecida verificaram que houve restrição no crescimento do rizóbio.

Culturas de células liofilizadas inoculadas em sementes foram hábeis na nodulação de plantas após período prolongado de armazenagem a 25°C (Appleman & Sears, 1944). Tem sido ainda observado que o uso de culturas liofilizadas são mais estáveis ao calor e a dessecação. Inóculo de *Rhizobium trifolii* liofilizado, após 6 meses de armazenagem em temperaturas menores ou iguais a 37°C mantinham a habilidade de nodulação (McLeod & Roughley, 1961). Por outro lado, rizóbio liofilizado aplicado em sementes em suspensão aquosa sobreviveram menos do que rizobio aplicado em outras formas de inoculante (Vincent, 1965). Contudo, em rizóbio liofilizado suspenso em veículo

não aquoso, como por exemplo o óleo, houve aumento da sobrevivência do rizóbio pela minimização dos efeitos do calor e da baixa umidade após a inoculação das sementes (Kremer & Peterson, 1982, 1983).

3.2- EFEITO DE FATORES AMBIENTAIS NA SIMBIOSE DE RIZÓBIO COM ESPÉCIES LEGUMINOSAS.

3.2.1- ASPECTOS GERAIS

A agricultura nas regiões tropicais está sujeita à estresses de solo: PH, deficiência de P, K, micronutrientes, erosão, compactação (Munns & Franco, 1982), altas temperaturas (Cooper, 1973; Graham & Halliday, 1976) e deficiência hídrica (Boyer, 1976; Fisher & Turner, 1978).

O feijão é uma cultura tropical originária de região de clima ameno. Dentre os vários fatores ambientais limitantes, o efeito das temperaturas elevadas tem sido indicado como um dos fatores mais limitantes à nodulação e a fixação de nitrogênio em feijoeiro, em áreas tropicais e subtropicais (Graham & Halliday, 1976).

De um modo geral as plantas dependentes da simbiose são mais sensíveis às condições de estresse do que as adubadas com nitrogênio mineral (Ferrari et al., 1967; Lie, 1974; Gibson, 1977).

A temperatura no solo em algumas partes nos trópicos atingem até 65,5°C a 2,5 cm abaixo da superfície do solo (Marshall & Roberts, 1963) ou acima de 50°C na profundidade de plantio (Balasundaram, 1975 citado por Balasundaram, 1988).

Dados de geoterma de um solo descoberto,

coletados na "Estação Ecologia Agrícola da Pesagro-Rio", Itaguaí-RJ, confirmam essas observações sobre os limites de temperatura dos solos tropicais, que frequentemente atingem médias superiores à 40°C, podendo chegar até 60°C nos primeiros cm do solo (Marcante, 1993).

Mesmo que o feijoeiro seja plantado fora dos períodos mais quentes, tem a possibilidade de ocorrer picos de altas temperaturas, que quase sempre estão associados a períodos de deficiência hídrica (Vieira et al., 1991).

A manutenção da umidade do solo tem também grande importância na sobrevivência do rizóbio (Willatt, 1967; Smith & Ecurra, 1982; Narencha Kumar & Chandra, 1986).

3.2.2- EFEITO DE ALTAS TEMPERATURAS DO SOLO NA SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO

As temperaturas elevadas podem interferir no desenvolvimento da planta, na sobrevivência do rizóbio no solo ou na simbiose, limitando a nodulação e a fixação de nitrogênio nas espécies leguminosas (Mulder et al., 1977 ; Graham, 1992).

Lie (1974), Frings (1976) e Gibson (1977) verificaram que a simbiose rizobio-leguminosa é mais afetada pela temperatura na raiz do que pela temperatura na parte aérea.

O efeito da temperatura na raiz é muito complexo, variando com as espécies hospedeiras, com as estirpes de rizóbio e com a interação entre elas (Bowen & Kennedy, 1959; Pate, 1961; Lie, 1971; Gibson, 1977).

Döbereiner & Aronovich (1965) verificaram que, na *Centrosema pubescens* Benth, temperaturas do solo acima de 30°C prejudicaram a nodulação, a fixação e a produção de forragem, sendo o mesmo observado por Ferrari et al., (1967) na soja perene.

Barrios et al., (1963) verificaram que, em feijão, grande número de nódulos por unidade radicular e porcentagem de raiz nodulada foram obtidas a 25°C, porém não foram formados nódulos a 33°C. Halliday & Pate (1976) mostraram dados similares para trevo.

Jones & Tisdale (1921) e Frings (1976) verificaram para *Phaseolus vulgaris*, que em altas temperaturas houve redução na formação de pelos radiculares, reduzindo os sítios para nodulação. A aderência da bactéria também foi afetada (Frings, 1976), e o processo de infecção parece ser particularmente sensível (Barrios et al., 1963; Frings, 1976).

Joffe et al., (1961) verificaram para *Arachis hypogea* e *Trifullium pratense*, que a fixação de N₂ atmosférico é um processo termosensível, no qual o funcionamento da simbiose é dependente do estreito limite de temperatura.

Mercante (1993) verificou que a fixação de N₂ no feijoeiro foi mais afetada do que a formação dos nódulos quando o sistema radicular do feijoeiro foi submetido a um regime de 8h por dia a 38°C.

O limite de temperatura para fixação de N₂ em feijoeiro é considerada entre 30°C (Guss & Döbereiner, 1972; Fankhurst & Sprent, 1976; Graham & Halliday, 1977) e 33°C (Barrios et al., 1963). Declínio na fixação de N₂ nesta cultura foi observada acima de 28°C (Fiha & Munns, 1987).

Mercante (1993) trabalhando com estirpes de *R. tropici* obtidas do isolamento de nódulos de *Leucaena* e CIAT 899 que foi isolada de feijoeiro mas que também nodula e fixa nitrogênio em *Leucaena*, obteve nodulação e

fixação de nitrogênio em feijoeiro sob o regime de temperatura de 38°C, 8h por dia.

3.2.3- EFEITO DA BAIXA UMIDADE DO SOLO NA SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO.

A susceptibilidade do rizóbio a seca foi bem estabelecida por Vincent (1962), que mostrou que a sobrevivência do *Rhizobium trifolii* declinou marcadamente sob estresse hídrico tanto em superfície inerte (vidro) como na superfície de sementes.

Marshall (1964) observou que a população de *Rhizobium trifolii* diminuiu em 100 vezes quando em solo seco a 30°C. Contudo, é sabido que o rizóbio pode sobreviver por longos períodos em solo seco ao ar (Chao & Alexander, 1982). Marshall (1964) e Bushby & Marshall (1977) notaram ainda que a redução do número de rizóbio durante a falta de umidade foi afetado pelo tipo de solo e conteúdo de argila. Foi observado ainda no primeiro trabalho que os rizóbios de crescimento rápido foram mais susceptíveis a dessecação em solos arenosos do que as espécies de crescimento lento. Entretanto, em solos arenosos, a adição de certas argilas (montmorilonita, ilita), aumentou a sobrevivência do rizóbio de crescimento rápido. A sobrevivência desse rizóbio foi satisfatória em solos com textura pesada (Marshall, 1964; Danso & Alexander, 1974).

Nas associações rizóbio-leguminosas a deficiência hídrica diminui a infecção dos pelos

absorventes pelo rizóbio, chegando até a inibir completamente a produção dos nódulos (Worrall & Roughley, 1976; Smith & Escurra, 1982). Contudo, a irrigação de plantas submetidas a baixa umidade do solo permitiram que a nodulação ocorresse em taxas equivalentes a plantas que não foram submetidas ao estresse. Em *Vicia faba* o estresse hídrico retardou a expansão dos nódulos, porém um rápido aumento ocorreu após irrigação (Gallacher & Sprent, 1978).

O abaixamento do potencial hídrico do solo também tem efeito direto na fixação de nitrogênio principalmente através da diminuição da produção de fotossintatos pela planta (Sprent, 1976). A fixação de nitrogênio parece ser mais sensível do que a nodulação. Nódulos de trevo vermelho apresentaram uma baixa atividade quando o conteúdo de umidade do solo ficou abaixo de 8% (Holter, 1978 citado por Sprent et al., 1982), e em trevo branco houve um declínio marcante na atividade da nitrogenase quando o solo foi seco, atingindo 50% da capacidade de campo (Foulds, 1978 citado por Sprent et al., 1982).

O estresse hídrico reduz também o conteúdo de N na planta, sugerindo que o efeito na fixação é maior do que no crescimento da planta (Engin & Sprent, 1973). Contudo, Aparico-Tejo et al., (1980) observaram a estreita relação entre o decréscimo do potencial hídrico da folha e a fixação de nitrogênio para diversas leguminosas forrageiras, sugerindo que o efeito é mediado via planta

hospedeira.

Revisando dados de estresse hídrico Sprent (1976) conclui que esses efeitos podem operar diretamente nos nódulos, como indiretamente via redução do suprimento de fotossintatos de folhas estressadas. A importância dos fotossintatos em regular a intensidade e periodicidade da fixação de nitrogênio já foi ha muito reconhecida e a interdependência entre processos de fotossíntese e a fixação de nitrogênio já foi demonstrada. Tratamentos que diminuem o fornecimento de fotossintatos invariavelmente decrescem a atividade dos nódulos, enquanto que, aqueles que incrementam a fotossíntese irão aumentar a fixação e a longevidade dos nódulos (Neves, 1981; Neves & Hungria, 1987).

Alta temperatura e baixa umidade deterioram a qualidade do inoculante, causando uma diminuição da população de rizóbio, prejudicando a nodulação e posterior fixação de nitrogênio. O inoculante deve manter alta qualidade, sendo capaz de proteger o rizóbio de condições adversas do meio ambiente até a nodulação do hospedeiro.

Desta forma este trabalho teve como objetivo testar um veículo de inoculante que permitisse uma maior sobrevivência do rizóbio e colonização das raízes do feijoeiro, submetidos à condições de alta temperatura e baixa umidade do solo.

4- CAPÍTULO I

OBTENÇÃO DE INOCULANTE OLEOSO COM ALTO NUMERO DE CÉLULAS
VIÁVEIS.

4.1- RESUMO

Inoculantes de leguminosas são geralmente expostos à condições adversas durante armazenagem, transporte e plantio. Isto pode diminuir a sobrevivência do rizóbio e resultar em nodulação deficiente. Tem sido testados várias materiais para veículos de inoculante visando melhorar a sobrevivência do rizóbio. A turfa tem sido considerada superior na habilidade de manter alto número de células viáveis na inoculação de sementes, contudo, quando há estresse de alta temperatura ou baixa umidade, não tem sido considerada um bom veículo. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um inoculante usando células liofilizadas suspensas em óleo, capaz de manter alto número de células viáveis. Primeiramente foi feito um experimento para avaliar a necessidade de se utilizar detergente como emulsificante para melhorar a contagem em placa, não sendo encontrado nenhum efeito dos

detergentes usados. Outros dois experimentos foram feitos utilizando-se células centrifugadas e/ou liofilizadas misturadas e/ou apenas cobertas com óleo, mantido à temperatura ambiente em frascos com tampa rosqueada ou com rolha de algodão. O tratamento com células liofilizadas misturado com óleo e guardado em frascos com tampa rosqueada, sem acesso de ar ou umidade, foi o que manteve por tempo mais prolongado células viáveis.

4.2- INTRODUÇÃO

A inoculação de leguminosas com estirpes de rizóbio eficientes e competitivas geralmente aumenta a quantidade de nitrogênio fixado e a produção da planta. Contudo, os inoculantes utilizados são geralmente expostos à condições adversas (temperatura, umidade, luz solar, pH, etc) durante sua armazenagem, transporte e no plantio até a germinação das sementes, podendo resultar no decréscimo da viabilidade do rizóbio e na baixa nodulação da planta (Peterson & Loynachan, 1981).

A perda da viabilidade do rizóbio em sementes inoculadas foi observada por Fred et al. citado por Vincent (1962) onde concluíram a importância da natureza do meio de suspensão, e também da temperatura a qual os inoculantes são expostos.

Várias formulações de veículos de inoculantes tem sido desenvolvidas para melhorar a sobrevivência do

rizóbio. Entretanto, a turfa tem sido considerada o melhor veículo, em condições de manter alto número de células viáveis na inoculação de sementes (Strijdon & Deschodt, 1975; Burton, 1976).

O melhoramento da sobrevivência do rizóbio nos inoculantes para regiões tropicais pode ser conseguido usando células liofilizadas, já que esse tipo de cultura é mais estável durante armazenagem em altas temperaturas do que outras formas de inócula. Inócula de *Rhizobium trifolii*, após 6 meses de armazenagem em temperaturas menores ou iguais a 37°C mantinham a habilidade de nodulação (McLeod & Roughley, 1961). Por outro lado, rizóbio liofilizado aplicado em sementes em suspensão aquosa sobreviveram menos do que o rizóbio aplicado em outras formas de inoculante (Vincent, 1965). Contudo, em rizóbio liofilizado suspenso em veículo não aquoso, como por exemplo o óleo, houve aumento da sobrevivência do rizóbio pela minimização dos efeitos do calor e da baixa umidade após a inoculação das sementes (Kremer & Peterson, 1982, 1983).

Para que a inoculação de sementes seja eficiente é necessário que os inoculantes sejam capazes de manter alta quantidade de rizóbio efetivo, sob condições adversas, para assegurar a nodulação da leguminosa hospedeira. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um inoculante usando células liofilizadas

suspensas em óleo, capaz de liberar alto número de células viáveis.

4.3- MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1- OBTENÇÃO DE INOCULANTE

4.3.1.1- ESTIRPE DE RIZÓBIO E MEIO DE CULTIVO

Nos experimentos preliminares foi usada a estirpe de *Rhizobium etli* BR 365 (=CNPAC 146). Nos experimentos de sobrevivência após a inoculação e no campo foi usada a estirpe *R. tropici* BR 322 (=CIAT 899), identificada como tolerante às temperaturas elevadas (Hungria et al., 1993; Mercante, 1993).

As culturas foram crescidas durante 5 dias a 30°C em meio extrato de levedura agarizado (Fred & Waksman, 1928) e colhidas em solução de sais do mesmo meio, diluída a 1/4 da concentração inicial.

4.3.2- CONTAGEM DE RIZÓBIO MISTURADO AO ÓLEO

Para estudar a necessidade de se utilizar detergente como emulsificante foi feito um experimento com dois tipos de detergentes comerciais (arkopal N-60 e neutral) e dois tipos de óleo: óleo de soja bruto (não refinado, OB) e óleo de soja comercial refinado da marca Liza (OR).

Foram usados os seguintes tratamentos: 0,5 ml da emulsão com OB; 0,5 ml da emulsão com OB, com adição de 1 gota de neutral; 0,5 ml da emulsão com OB, com adição de 1

gota de arkopal; 0,5 ml da emulsão com OR; 0,5 ml da emulsão com OR, com adição de 1 gota de neutral; 0,5 ml da emulsão com OR, com adição de 1 gota de arkopal.

A cultura de bactérias foi crescida conforme descrito anteriormente, centrifugada, 11300 G à 20°C por 15 minutos. Após centrifugação para cada 2 ml de pelete foram adicionados 2 ml de OB ou OR. Após a adição do óleo, fez-se uma homogeneização por intermédio de várias passagens em agulha de seringa até se formar uma emulsão uniforme e muito consistente.

A determinação da sobrevivência foi feita em placas usando o método de Miles & Misra (1938), conforme descrito por Vincent (1970), 5 dias após a mistura com óleo e/ou detergente, usando duas séries de diluições por tratamento.

4.3.3- SOBREVIVÊNCIA DE RIZÓBIO CENTRIFUGADO E/OU LIOFILIZADO MISTURADO AO ÓLEO.

Para o teste de sobrevivência do rizóbio foram usados os seguintes tratamentos:

- a) 1 ml do pelete do centrifugado de células misturado com 0,5 ml de óleo de soja bruto (OB) + 0,5 ml de OB adicionado sobre a suspensão após a homogeneização, para evitar contato direto das bactérias com o ar;
- b) 1 ml do pelete misturado com 0,5 ml de óleo refinado (OR) + 0,5 ml de OR adicionado sobre a suspensão após a homogeneização para evitar contato direto das células com o ar;
- c) 1 ml do pelete suspensão em solução de peptona (5%) + sacarose (10%), colocado 1 ml da suspensão em cada frasco, congelado em nitrogênio líquida e liofilizado por 24 horas, posteriormente misturado com 0,9 ml de OB (homogeneizado como em 4.3.2);
- d) 1 ml da suspensão obtida em (c) misturado com 0,9ml de OB (fez-se homogeneização) + 2,0 ml de OB sobre a suspensão;
- e) 1 ml da suspensão obtida em (c) + 2,0 ml de OB sobre a suspensão (sem fazer homogeneização).

A obtenção do pelete foi feita conforme descrita em 4.3.2. Após centrifugação, descartando o sobrenadante, o pelete foi misturado ao óleo, fazendo-se homogeneização como em 4.3.2.

Todos os tratamentos foram guardados em frascos com tampa rosqueada a temperatura ambiente. O óleo utilizado foi autoclavado e seco colocando os frascos em dessecador contendo sílica gel previamente seca, até o uso.

Foi efetuada contagem de células viáveis 2, 7 e 30 dias após o preparo, usando o método de Miles & Misra (1938), com duas séries de diluições por tratamento, e duas repetições por série.

4.3.4- EFEITO DA ARMAZENAGEM NA SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO LIOFILIZADO MISTURADO AO ÓLEO.

Foram testados os seguintes tratamentos:

- a) material liofilizado misturado com 1 ml de óleo nujol (ON), homogeneizado conforme descrito em 4.3.1.3, guardado em frascos com tampa rosqueada;
- b) material liofilizado misturado com 1 ml de ON (homogeneizado), guardado em frascos com rolha de algodão;
- c) material liofilizado coberto com 2 ml de ON (sem homogeneização), guardado em frascos com tampa rosqueada;
- d) material liofilizado coberto com 2 ml de ON (sem homogeneização), guardado em frascos com rolha de algodão.

Foi usado o mesmo procedimento para obtenção do pelete descrito em 4.3.2. O pelete foi suspenso em solução de peptona (5%) + sacarose (10%), colocando 1 ml em cada frasco, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado por 46 horas.

O óleo utilizado foi autoclavado e seco colocando os frascos em dessecador contendo sílica gel previamente seca, até o uso.

Foi efetuada contagem das células viáveis, usando o método Miles & Misra (1938), 2, 7, 30 e 60 dias após o preparo, com duas séries de diluições por tratamento, sendo que em uma delas foi adicionado 10% de leite em pó da marca molico desnatado, para verificar possível melhoria na homogeneização durante as diluições.

Foram feitas duas repetições por série de diluição.

4.3.5- PRODUÇÃO DO INOCULANTE OLEOSO

A suspensão de células obtidas em 4.3.1.1 foi centrifugada, 11300 G à 20°C por 15 minutos, descartando o sobrenadante. O pelete foi suspenso em solução de peptona de carne (5%) e sacarose (10%), congelado em nitrogênio líquido e liofilizado segundo Vincent (1970) e mantidas em dessecador até o uso, por no máximo dois dias após a liofilização. Para obtenção do inoculante oleoso, as células liofilizadas foram misturadas ao óleo mineral nujol, previamente seco a 100°C por 72 h e resfriado em dessecador contendo sílica gel previamente seca, passando forçado por uma agulha hipodérmica B-D 30x20 e seringa de vidro até a uniformização e obtenção de uma emulsão consistente.

4.3.6- PRODUÇÃO DE INOCULANTE TURFOSO

Da suspensão de células obtidas em 4.3.1.1, 15 ml foram inoculados, usando uma seringa esterilizada, em sacos plásticos de polietileno contendo 35g de turfa (previamente moída, seca, e acidez corrigida pela adição de 4% de CaCO_3) esterilizados por duas passagens a 120°C em autoclave com intervalo de 24h. Após deixar a 30°C por 24h, a população de rizóbio estabilizou-se em torno de 10⁸ células por g de inoculante úmido. O inoculante foi conservado a 4°C até o uso.

4.4- RESULTADOS

- Os resultados do primeiro teste são apresentados na tabela 1 e mostram que não houve efeito da adição dos detergentes neutral ou arkopal, utilizados visando melhor individualizar as células viáveis.

- Os resultados do segundo teste são apresentados na tabela 2 e mostram que já aos 2 dias após o preparo, com o uso do óleo refinado (trat. b) a contagem foi zero. Os demais tratamentos nesta época não apresentaram diferenças significativas entre si, sendo que o tratamento com óleo bruto colocado sobre as células liofilizadas (trat. e) tendeu a ser pior. Na segunda contagem (7 dias após a mistura) houve um decréscimo no número de células, mas mantendo-se a mesma tendência entre os tratamentos observada aos 2 dias após a mistura. Na terceira contagem (30 dias após a mistura) em todos os tratamentos não houve sobrevivência do rizóbio, em número suficiente para ser detectado nas contagens.

Os resultados deste teste mostram que nenhum dos tratamentos usados apresentou sobrevivência satisfatória desde a primeira contagem aos 2 dias após o preparo do inoculante.

Os resultados do terceiro teste são

apresentados na tabela 3 e mostram na primeira contagem (2 dias após o preparo do inoculante) diferenças entre tratamentos. As células liofilizadas misturadas com óleo nujol e guardadas em frascos com tampa rosqueada (trat. a) obteve maior sobrevivência.

Na segunda contagem, 7 dias após o preparo do inoculante, observou-se a mesma tendência, havendo ainda sobrevivência no tratamento (b) material liofilizado misturado com óleo nujol e guardado em frascos com rolha de algodão. Nos tratamentos (c) e (d) não houve sobrevivência do rizóbio que fosse detectável na menor diluição usada (10^2).

Nas contagens aos 30 e 60 dias após o preparo do inoculante somente no tratamento (a) células liofilizadas misturadas com óleo nujol e guardadas em frascos com tampa rosqueada apresentou sobrevivência significativa das células. No tratamento com células liofilizadas e cobertos com óleo nujol em frascos hermeticamente fechados (trat. c) não se detectou na menor diluição utilizada (10^2) células viáveis aos 7 dias após o preparo, enquanto que aos 30 dias foi observado em média 103 células/ml de inoculante. Isso pode ter sido devido a dificuldade de uniformização das diluições durante a contagem ou diferenças entre os frascos amostrados.

A adição de leite em pó nas diluições não contribuiu para melhorar a homogeneização.

TABELA 1: Efeito do detergente na dispersão de células de rizóbio em diluições sucessivas para contagem.

TRATAMENTOS			LOG Nº CÉLULAS VIÁVEIS/ml
Tipo de óleo ^a		Detergente	
OB			9,17
OB	+	neutral	9,11
OB	+	arkopal	9,17
OR			9,18
OR	+	neutral	9,13
OR	+	arkopal	9,19

^a OB= óleo de soja bruto, OR= óleo de soja comercial, refinado da marca Liza.

TABELA 2: Avaliação da sobrevivência do rizóbio centrifugado e/ou liofilizado misturado ao óleo.

TRATAMENTOS ^a	LOG Nº CÉLULAS/ml DE INOCULANTE		
	Dias após o preparo do inoculante		
	2	7	30
Células centrifugadas, misturadas com OB e OB em cobertura.	8,97 A ^b	7,26 A ^b	0,00
Células centrifugadas, misturadas com OR e OR em cobertura.	0,00 B	0,00 B	0,00
Células liofilizadas, misturadas com OB.	7,97 A	6,66 A	0,00
Células liofilizadas, misturadas com OB e OB em cobertura.	8,84 A	6,15 A	0,00
Células liofilizadas, com OB em cobertura.	6,74 A	7,52 A	0,00

CV(%)

10,2

8,0

^aOB= óleo de soja bruto

OR= óleo de soja comercial, refinado da marca Liza

^bValores na mesma coluna com letras diferentes diferem entre si segundo o teste de Tukey a $p < 0,05$.

TABELA 3: Avaliação da sobrevivência do rizóbio liofilizado misturado ao óleo nujol, guardado em frascos com tampa rosqueada ou com rolha de algodão.

PREPARO DO INOCULANTE	LOG Nº DE CÉLULAS/ml DE INOCULANTE				
	Dias após o preparo do inoculante				
	adição de leite	2 ^b	7 ^b	30 ^c	60 ^c
Rizóbio liofilizado misturado com ON ^a , guardado em frascos c/ tampa rosqueada.	sem	9,33	7,98	3,90 ^d	7,32
	com	9,36	8,82	4,09 ^d	6,60
	média	9,35 A	8,40 A	3,99	6,96
Rizóbio liofilizado misturado com ON guardado em frascos c/rolha de algodão.	sem	6,72	5,33	0,00	0,00
	com	7,86	6,81	0,00	0,00
	média	7,84 B	6,07 A	0,00	0,00
Rizóbio liofilizado coberto com ON, guardado em frascos c/ tampa rosqueada.	sem	7,82	0,00	2,29 ^d	0,00
	com	7,87	0,00	2,74 ^d	0,00
	média	7,86 B	0,00 B	2,51	0,00
Rizóbio liofilizado coberto com ON guardado em frascos c/rolha de algodão.	sem	7,43	0,00	0,00	0,00
	com	8,30	0,00	0,00	0,00
	média	7,84 B	0,00 B	0,00	0,00

CV(%) 4,5 25,3

^aON= óleo nujol

^b Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem entre si segundo o teste de Tukey a $p < 0,05$.

^c Nas contagens aos 30 e 60 dias não foram efetuadas análises estatísticas.

^d Em uma repetição a contagem do número de células foi zero.

4.5- DISCUSSÃO

O uso dos dispersantes arkopal e neutral visando eliminar aglomerados de células durante as contagens, não mostrou nenhum efeito.

Comparando os resultados do segundo teste com o terceiro, observamos que no segundo teste não se detectou nenhuma célula sobrevivente a partir dos 7 dias após o preparo do inoculante, em todos os tratamentos. Já no terceiro teste o tratamento, onde as células liofilizadas foram misturadas com óleo nujol e guardadas em frascos hermeticamente lacrados, foi possível detectar células viáveis até os 60 dias após o preparo do inoculante. A falta de sobrevivência das células pode ter sido devido a troca gasosa nos recipientes, permitindo a entrada de oxigênio e umidade ou ao tempo de liofilização que neste caso foi de 48h em comparação com 24h do segundo teste, e/ou ao tipo de óleo que foi utilizado.

Kremer & Peterson (1982) usando óleo de amendoim, seco a 120°C por 12 horas para misturar as células liofilizadas, observaram 107 células 56 dias após o preparo do inoculante. Posteriormente, Eaglesham & Goldman (1985) não conseguiram o mesmo resultado, mesmo usando vários tipos de óleos.

Ao compararmos os tratamentos do terceiro teste, onde o tempo de liofilização e o tipo de óleo foi o mesmo

para todos, o tratamento em que houve a mistura do óleo com a bactéria e guardado em frascos com tampa rosqueada, foi o que manteve melhor resultado, seguido do tratamento em que as células não foram misturadas com óleo, apenas adicionou-se o óleo e guardado em frascos com tampa rosqueada, em seguida o tratamento em que as células foram misturadas ao óleo, guardadas em frascos com rolha de algodão e por último o tratamento em que foi adicionado o óleo as células liofilizadas e guardado em frascos com rolha de algodão. Esse resultado demonstrou que, o fato das células serem misturadas com o óleo, ficaram mais protegidas, devido a fina camada de óleo envolvendo a bactéria, evitando assim a rehidratação, mantendo o estado de latência, com isso, aumentando o período de sobrevivência. Kremer et al. (1932) verificou essa fina camada de óleo através de um microscópio, onde grande parte das células foram dispersas individualmente pela suspensão em óleo. No tratamento em que não houve a homogeneização da bactéria com o óleo, pelo resultado obtido, conclui-se que houve rehidratação das células, e recuperação parcial da atividade metabólica que levou a morte das mesmas. Esse efeito da não homogeneização das células com o óleo, foi somado ao tipo de condicionamento dos inoculantes, se em frascos com tampa rosqueada, em que não há entrada de umidade, ou em frascos com rolha de algodão, que permitiu a entrada de umidade.

O inoculante a base de óleo nujol, mas sem exclusão da umidade, comercializado no Brasil, também não apresentou boa sobrevivência. Estes resultados mostram que a presença de preservativo, ou de água no óleo diminuem a sobrevivência do rizóbio. Há necessidade entretanto, de mais pesquisas visando a produção de inoculante oleoso com viabilidade de longo prazo.

4.6-CONCLUSÕES

- A utilização de detergentes ou leite nas diluições de inoculante oleoso não aumentou a dispersão de células durante as diluições.

- O tratamento utilizando células liofilizadas misturadas com óleo nujol, guardado com tampa rosqueada, sem acesso de ar e umidade, foi o que manteve por tempo mais prolongado células viáveis.

5- CAPÍTULO II

SOBREVIVÊNCIA DO RIZÓBIO EM INOCULANTE OLEOSO E TURFOSO
SUBMETIDO À ALTA TEMPERATURA E BAIXA UMIDADE.

5.1- RESUMO

Em sistemas agrícolas, o rizóbio inoculado nas sementes de leguminosas é muitas vezes submetido à condições adversas antes ou após o plantio, que podem afetar a sobrevivência da bactéria e a subsequente nodulação. O presente trabalho foi realizado para avaliar o efeito de alta temperatura e da baixa umidade do solo na sobrevivência do rizóbio inoculado em sementes de feijão, comparando inoculante oleoso com o turfoso. Foram feitos dois experimentos sob condições controladas em laboratório, usando-se duas temperaturas: 40°C/8h por dia ou temperatura ambiente (28°C-30°C); dois sistemas simulados de rega: irrigado desde o plantio e seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio. O primeiro experimento utilizou como substrato uma mistura (2:1) de vermiculita e areia, e o segundo experimento utilizou 3 tipos de solo (Planossolo, Podzólico Vermelho Amarelo e

Gley Húmico). Em ambos experimentos quando não houve estresse hídrico, não houve diferenças marcantes entre os tipos de inoculantes. Quando foi aplicado o estresse de seca, o inoculante oleoso proporcionou uma maior sobrevivência ao rizóbio em comparação com o inoculante turfoso. Essa diferença se mostrou mais marcante nos tratamentos submetidos à temperatura de 40°C/8h por dia. De uma maneira geral o estresse de seca apresentou maior efeito sobre a sobrevivência da bactéria, após a inoculação, do que o estresse de calor. Nos solos estudados após o período de estresse, com a irrigação houve uma recuperação do número de rizóbio, sendo que essa recuperação não foi observada quando utilizou-se a mistura vermiculita com areia.

5.2- INTRODUÇÃO

Os benefícios da inoculação das sementes dependem da sobrevivência do rizóbio introduzido no solo. É necessário que haja sobrevivência após o plantio para que ocorra nodulação na planta ainda jovem, e em plantas perenes é desejável que ele persista no solo nos anos subsequentes (Boonkerd & Weaver, 1982). Imediatamente após a aplicação nas sementes, o rizóbio é geralmente exposto à condições adversas que podem limitar a performance do inóculo, inibindo a infecção, a formação de nódulos e/ou a fixação de nitrogênio nos nódulos que já tenham sido formados.

Vários trabalhos tem sido feitos para identificar fatores físicos, químicos e biológicos que possam influenciar e regular o número de rizóbio no solo. Altas temperaturas (Bowen & Kennedy, 1959), baixa umidade (Marshall, 1964), acidez do solo (Rice et al., 1977) tem

demonstrado afetar a sobrevivência do rizóbio introduzido no solo.

Altas temperaturas e baixa umidade são condições que geralmente prevalecem nas áreas tropicais durante a época de plantio de leguminosas. Esses fatores são prejudiciais a sobrevivência do rizóbio inoculado nas sementes (Vincent, 1965; Boonkerd & Weaver, 1982) e no impedimento subsequente da nodulação (Bowen & Kennedy, 1959; Brockwell & Phillips, 1970).

Acredita-se que a faixa de temperatura do solo mais favorável à nodulação e a fixação de nitrogênio em feijoeiro deva estar entre 25°C e 32°C (Guss & Döbereiner, 1972; Pankhurst, 1973; Graham & Halliday, 1977). Entretanto, as temperaturas nos trópicos atingem frequentemente, médias superiores a 40°C nas camadas mais superficiais (Diatloff, 1970; Sidiras & Pavan, 1986), estando portanto acima das temperaturas consideradas ótimas para sobrevivência e multiplicação do rizóbio (Somasegaran & Hoben, 1985).

O rizóbio, como outros organismos gram-negativos são particularmente sensíveis à condições de baixa umidade do solo. A diminuição do número de células viáveis tem sido verificada nos primeiros estágios de armazenagem das sementes (Vincent et al., 1962; Burton, 1967). Greenwood (citado por Vincent, 1958) observou uma rápida diminuição do número de células (1000 vezes em 24 horas). Além disso,

Burton (1967) observou uma drástica queda no número de células viáveis nas primeiras horas após a inoculação.

O efeito da baixa umidade do solo na simbiose parece variar entre as espécies de leguminosas, porém geralmente o estresse de seca, resulta na diminuição da infecção dos pelos absorventes e a fixação de nitrogênio, chegando até a inibir completamente a produção de nódulos (Worrall & Roughley, 1976; Smith & Escurra, 1982).

A baixa sobrevivência do rizóbio no inoculante em turfa aplicado às sementes é causada pela exposição do rizóbio ao excesso de calor e a seca, durante e após o plantio, resultando geralmente na deficiente nodulação da planta (Scudder, 1975).

Muitos trabalhos tem sido desenvolvidos visando aumentar a sobrevivência do rizóbio na turfa sob várias condições de temperatura e umidade. A adição de calcário, goma arábica, açúcar e outros materiais à turfa frequentemente melhoram a sobrevivência do rizóbio quando submetidos a altas temperaturas e a baixa umidade do solo, mas não de forma consistente (Brockwell & Phillips, 1970; Brockwell & Whalley, 1970; Sims et al., 1974; Burton, 1975).

Células liofilizadas são mais estáveis ao calor e a dessecação. Rizóbio liofilizado suspenso em óleo, aumentou a sobrevivência do rizóbio pela minimização dos efeitos do calor e da baixa umidade após a inoculação das

sementes (Kremer & Peterson, 1982, 1983).

Muitos autores associam a maior gravidade dos efeitos de temperaturas elevadas e da baixa umidade, aos estádios iniciais de desenvolvimento das culturas, quando o solo permanece descoberto sujeito a grandes oscilações de temperatura e umidade (Lal, 1974; Sidiras et al., 1984). Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência do rizóbio no inoculante oleoso ou turfoso submetido a condições de alta temperatura e baixa umidade, logo após a inoculação e plantio do feijoeiro.

5.3- MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar a sobrevivência do rizóbio em inoculante oleoso ou turfoso submetido a estresse de seca e calor foram conduzidos dois experimentos em condições de laboratório com temperatura controlada. Foram usados frascos de vidro contendo substrato plantado com sementes de feijão cv. carioca 80 inoculadas com inoculante oleoso (item 4.3.5) ou inoculante turfoso (item 4.3.6), submetidos a um tratamento de temperatura de 40°C/8h por dia, ou mantidas continuamente a temperatura ambiente (28°C-30°C). Dois sistemas simulados de rega foram adotados: irrigado (irrigado desde o plantio), e seco (seco inicialmente e irrigado 4 dias após o plantio). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em fatorial 2x2x2 com 4 repetições.

Como substrato foi usado uma mistura de areia com vermiculita (2:1,v:v), fechados com rolha de algodão e esterilizados em autoclave durante 30 minutos a 125°C.

Antes da inoculação e plantio, as sementes foram esterilizadas superficialmente da seguinte forma: colocadas em álcool durante 30 segundos, depois imersas em solução de HgCl₂ (1:500) durante 1,5 minutos e, em seguida, lavadas com água destilada estéril por 7 vezes. Foram colocadas dentro do substrato 3 sementes inoculadas em cada frasco.

No segundo experimento foi acrescentado um fator constando de três tipos de solos (Planossolo, Podzólico Vermelho Amarelo e Gley Húmico). A análise dos solos utilizados são apresentados na tabela 4. Foi determinada a umidade inicial dos tratamentos (Tabela 5).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em fatorial $2 \times 2 \times 2 \times 3$ (temperatura, inoculante, sistema de rega e tipo de solo), com 2 repetições e 2 séries de diluições em cada repetição.

Foi efetuada contagem do número de células viáveis no dia do plantio, 3 e 7 dias após o plantio, utilizando o método de diluições e contagem em placas (Vincent, 1970).

TABELA 4: Análise química e granulométrica dos solos usados no experimento II.

ANÁLISE QUÍMICA	PLANOSSOLO	PVA	GLEY HÚMICO
Fósforo (ppm)	6.1	16.9	58.0
Potássio (ppm)	62.0	50.0	318.0
Al^{3+} (mE/100cm ³)	0.0	0.2	1.2
pH	5.8	5.4	4.9
Mg^{2+} (mE/100cm ³)	1.0	1.6	4.9
Ca^{2+} (mE/100cm ³)	1.5	2.1	6.0
Carbono (W)	0.72	0.78	3.75
Mat. Orgânica (W)	1.24	1.34	6.46
Mineral adicionado^a	2 ton/ha	2 ton/ha	6 ton/ha
ANÁLISE GRANULOMÉTRICA	PLANOSSOLO	PVA	GLEY HUMICO
Argila (W)	2	28	33
Areia (%)	81	50	40
Silte (W)	17	22	27
Textura	Areia Franca	Franco Argilo Arenoso	Franco Argiloso

^a Para cálculo da quantidade de calcário considerou-se 2.10⁶kg solo por ha. Calagem acima da recomendação visando eliminar qualquer possibilidade de estresse por acidez, Al ou Mn.

TABELA 5: Umidade inicial dos solos com ou sem estresse hídrico.

TRATAMENTOS		UMIDADE*
Solo	Sistema rega	(%)
Planossolo	Trat. seco	0.34
Planossolo	Trat. úmido	13.80
PVA	Trat. seco	1.44
PVA	Trat. úmido	28.62
Gley Húmico	Trat. seco	6.03
Gley Húmico	Trat. úmido	48.50

* Método Umidade Atual. Manual de Métodos de Análise do Solo, EMBRAPA, Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos, RJ, 1979.

5.4- RESULTADOS

Os resultados do primeiro experimento, usando a mistura de vermiculita com areia como substrato para a germinação das sementes (Figura 1a), mostram que na ausência de estresse hídrico, não houve queda da população de rizóbio de ambos inoculantes tanto a 30°C como a 40°C. Entretanto, quando as sementes foram plantadas em substrato seco e a irrigação só foi efetuada 4 dias após o plantio, detectou-se diferenças marcantes na sobrevivência do rizóbio em função do tipo de inoculante e da temperatura ambiente. Sob estresse de seca o inoculante oleoso proporcionou maior sobrevivência do rizóbio após inoculação das sementes tanto a 30°C como a 40°C. No substrato usado neste experimento, isento de matéria orgânica, não ocorreu aumento da população de rizóbio entre as contagens 3 e 7 dias após o plantio. Indicando que mesmo com a adição de água no quarto dia após o plantio, o início da germinação das sementes não favoreceu a multiplicação das bactérias.

Os resultados do segundo experimento, onde a sobrevivência do rizóbio em sementes inoculadas, foram testadas em solo Planossolo, solo Podzólico Vermelho Amarelo e solo Gley Húmico (Figura 1b, c e d), apresentaram a mesma tendência dos resultados obtidos quando as sementes foram plantadas em vermiculita misturada com

areia. O solo Podzólico Vermelho Amarelo conferiu maior proteção ao rizóbio nos tratamentos sem estresse de seca em ambos inoculantes. Nos três solos, o efeito da baixa umidade somado ao efeito da temperatura elevada (40°C), reduziu em apenas 3 dias após o plantio, a população do rizóbio a níveis não detectáveis no tratamento em que foi utilizado o inoculante turfoso. Houve entretanto, nos três solos, uma rápida recuperação da população do rizóbio com a adição de em ambos os tipos de inoculante e em ambas temperaturas.

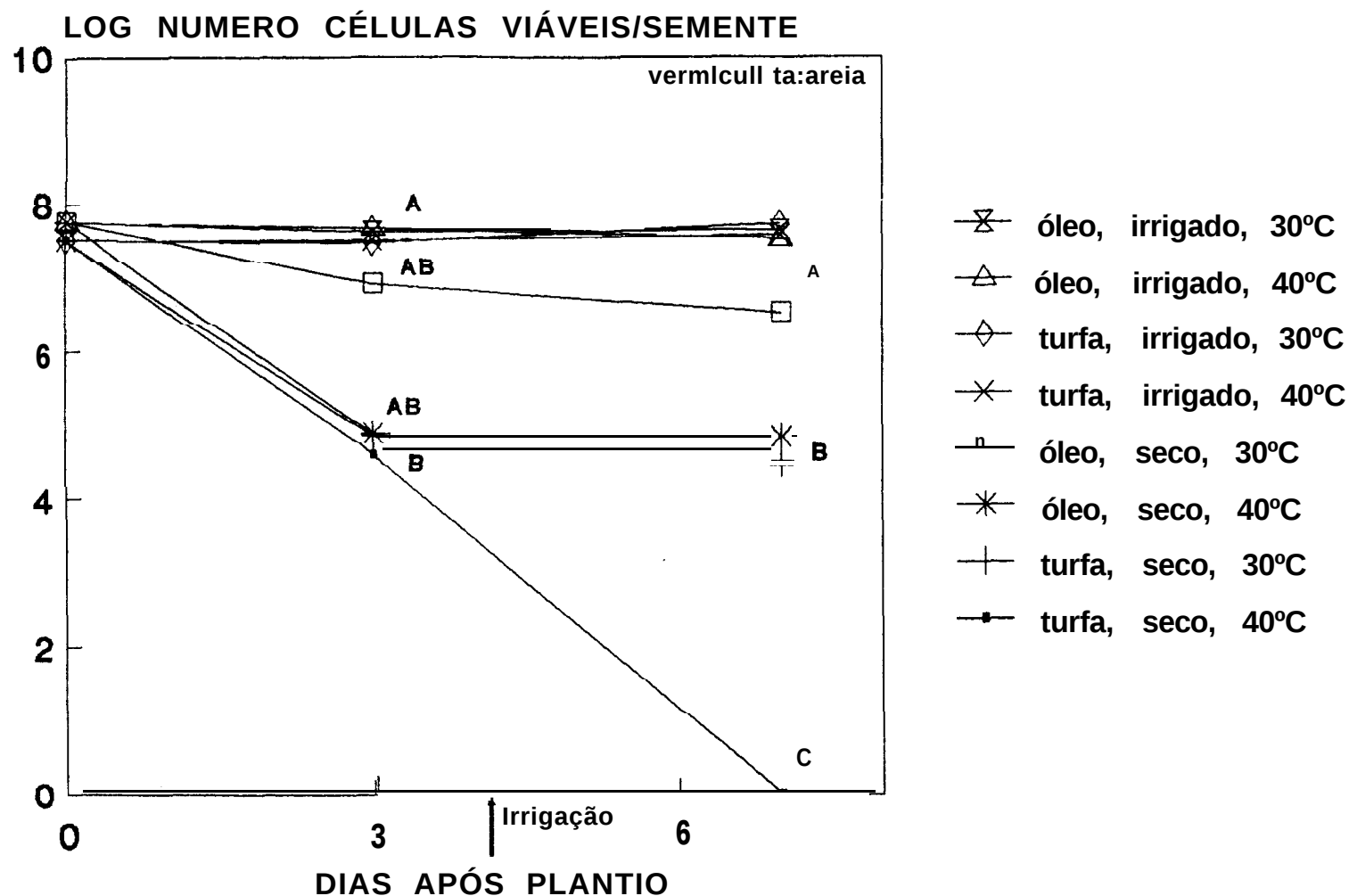


Figura 1a: Avaliação da sobrevivência do rizóbio em Inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco (seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) e irrigado (irrigado desde o plantio), mantido a temperatura ambiente (28°C-30°C) ou à 40°C, 8h/dia. Pontos da mesma coleta com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

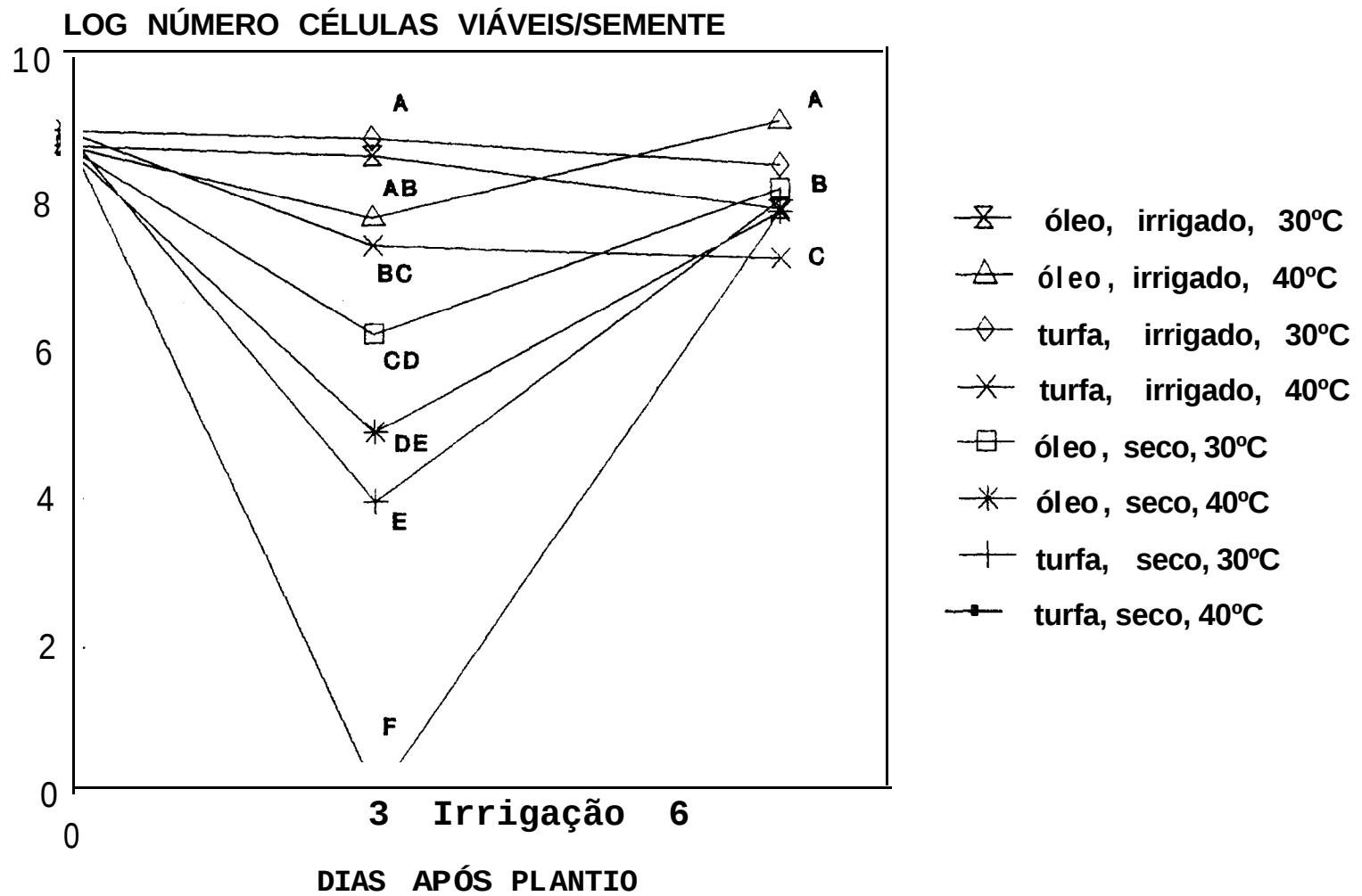


Figura 1b: Solo Pianossolo
Pontos da mesma coleta com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

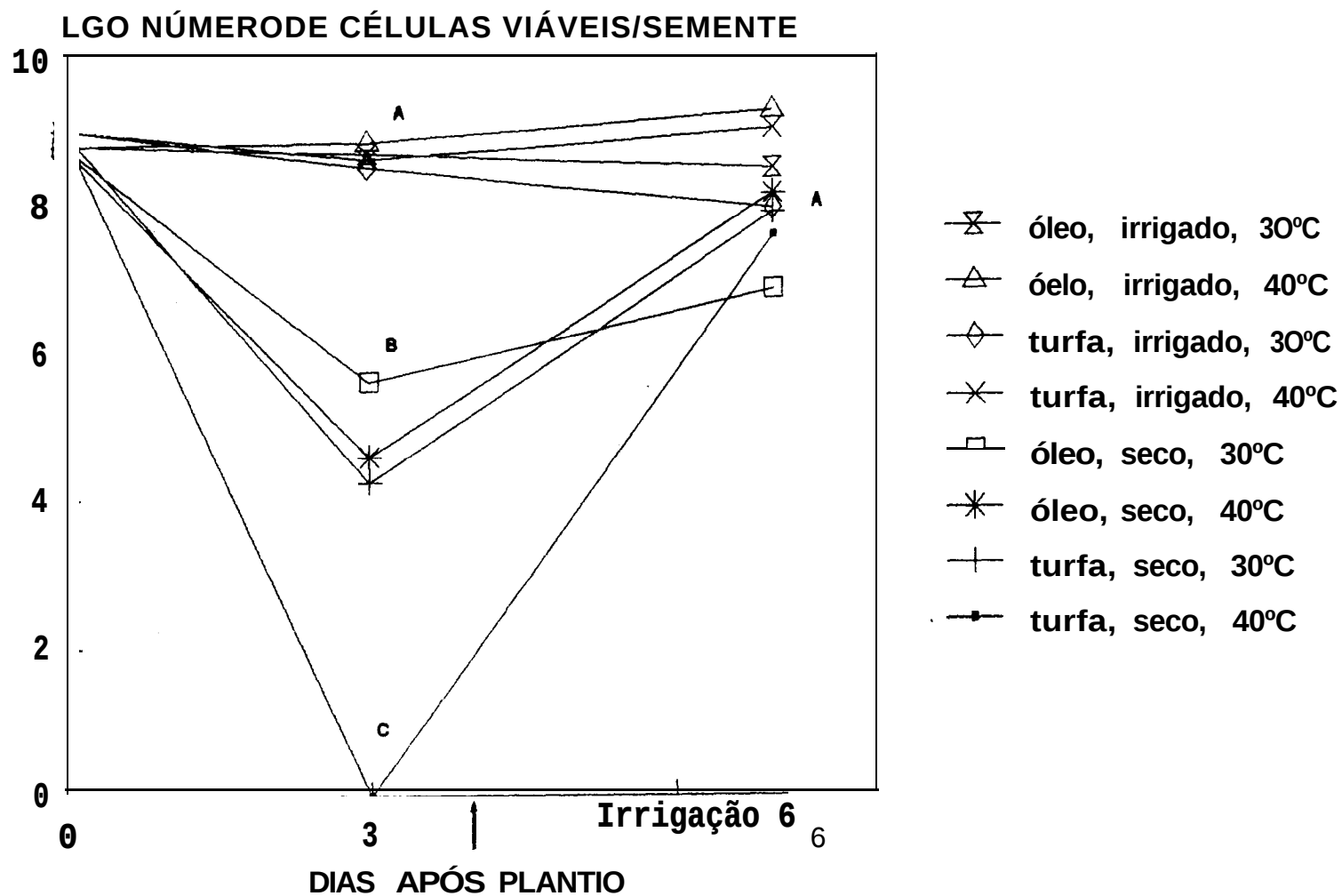


Figura 1c: Solo Podzólico Vermelho Amarelo

Pontos da mesma coleta com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

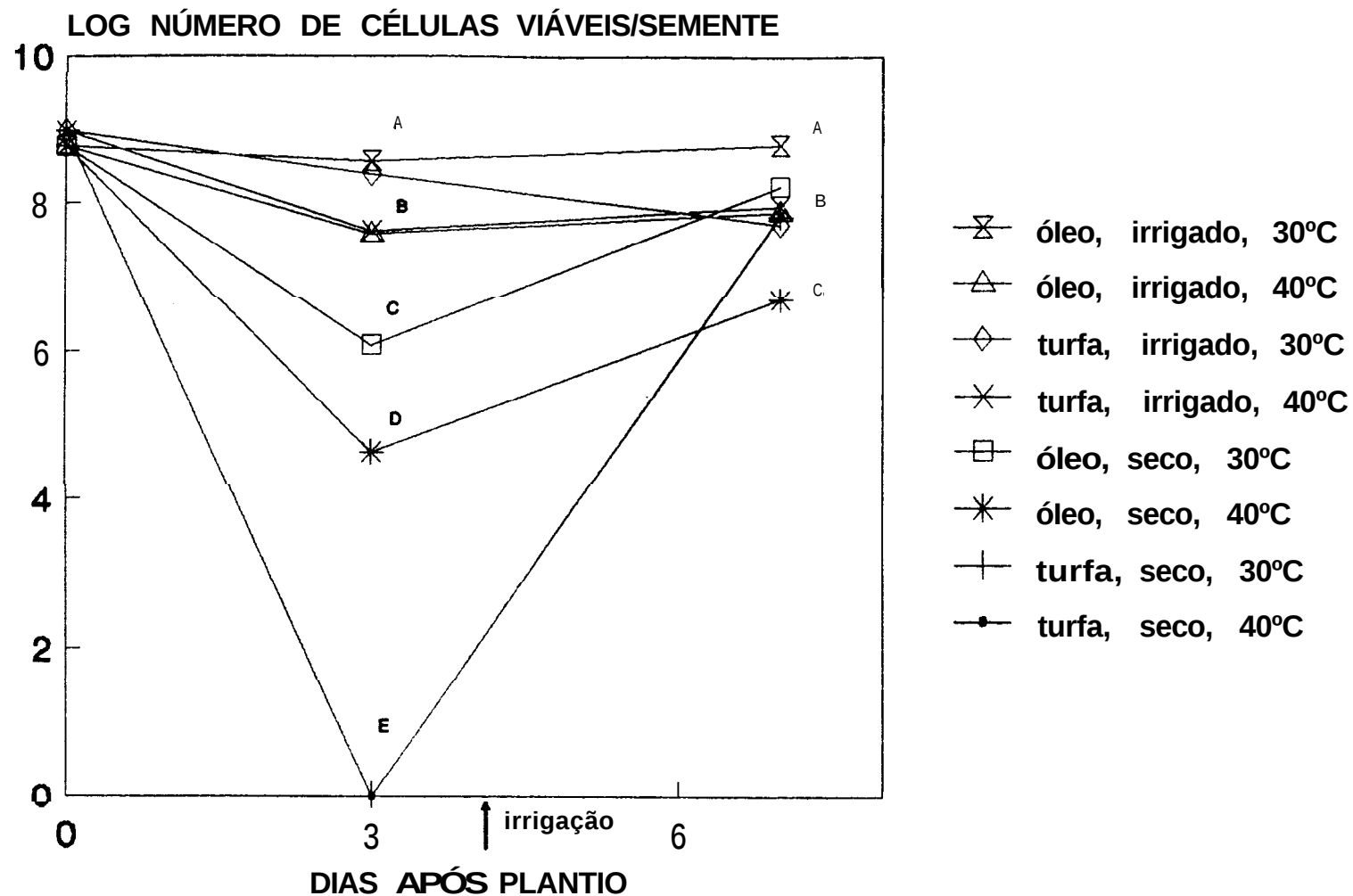


Figura 1d : Solo Gley Húmico

Pontos da mesma coleta com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

5.5- DISCUSSÃO

Os resultados encontrados demonstraram que a sobrevivência do rizóbio inoculado nas sementes foi afetada pelo tipo de inoculante, pela temperatura e pelo regime hídrico a que foram submetidos e pelo tipo de substrato utilizado.

A contagem em sementes indicou que o inoculante em óleo mineral nujol foi superior ao inoculante em turfa, em promover a sobrevivência do rizóbio inoculado nas sementes, quando foram submetidos ao estresse de seca e a temperatura de 40°C. A aparente baixa sobrevivência do rizóbio durante os dias de estresse de seca e de calor sugere que as culturas em turfa foram mais susceptíveis a essas condições do que as culturas em óleo. Kremer & Peterson (1982) encontraram resultados semelhantes, onde o inoculante em óleo promoveu uma maior sobrevivência do rizóbio comparado ao inoculante em turfa. Eaglesham & Goldman (1985) também verificaram a superioridade do inoculante em óleo em relação a turfa, quando aplicado em sementes e estocado em condições de seca. Após 17 dias em areia seca submetida à 45°C, a viabilidade do rizóbio em sementes inoculadas com inoculante em óleo foi superior a das sementes inoculadas com o inoculante em turfa submetido a 25°C.

Bowen & Kennedy (1959) e Vincent (1965) observaram que rizóbio inoculado em sementes com inoculante em turfa foram altamente susceptíveis a dessecação quando encontraram condições de calor e seca.

Quando óleo mineral foi usado como agente de revestimento para inoculante em turfa com cultura de *R. japonicum* em sementes de soja, ocorreu uma melhor sobrevivência do rizóbio na semente estocada em 15°C para 30°C (Davidson & Reuszer, 1978).

O óleo envolvendo acélula seca de rizóbio parece protegê-la da temperatura alta e da falta de umidade, por mantê-la sem atividade metabólica até que a presença de umidade permita a sua rehidratação.

A sobrevivência do rizóbio também foi afetada pelo tipo de substrato usado. Quando foi usado a mistura vermiculita-areia, após a irrigação (4 dias após o plantio), não foi verificado aumento da população do rizóbio. Entretanto, quando utilizou-se solo Planossolo, solo Podzólico Vermelho Amarelo e solo Gley Húmico, houve aumento da população de rizóbio após irrigação. Esse resultado pode ser explicado pelo substrato vermiculita-areia não conter matéria orgânica. Chao & Alexander (1982) verificaram que a maior sobrevivência das bactérias foi relacionado com o conteúdo de matéria orgânica do solo.

Entre os solos utilizados observou-se que houve uma maior proteção da bactéria submetida a temperatura de

30°C e 40°C, sem estresse de seca pelo solo Podzólico Vermelho Amarelo. A maior sobrevivência do rizóbio em solos com textura pesada em relação aos solos arenosos tem sido atribuída a presença de material coloidal como ilita, montmorilonita e hematita que parecem interagir com as células da bactéria, ao contrário de solos arenosos que geralmente contém pouca argila e com predominância de caulinita e/ou goetita, que parecem não promover proteção ao rizóbio. Marshall & Roberts (1963) atribui a queda de nodulação de trevo pelo baixo número de *R. trifolii* em solos arenosos submetidos a altas temperaturas. A adição de argila em solos arenosos pareceu resolver o problema. Resultados obtidos por Danso (1972) citado por Danso (1977) mostraram resultados semelhantes, onde o aumento da taxa de mortalidade de *R. meliloti* foi maior em solos arenosos do que em solos com maior conteúdo de silte e argila. A adição de areia ao solo diminui a sobrevivência do rizóbio, indicando que os coloídes protegem o rizóbio do efeito de altas temperaturas (Danso, 1977).

5.6- CONCLUSÕES

- Sem estresse de seca e de calor não houve diferenças marcantes entre os inoculantes oleoso e turfoso na sobrevivência do rizóbio após inoculação das sementes.

- Com estresse de calor, o inoculante oleoso conferiu maior sobrevivência do rizóbio após a inoculação das sementes do que o inoculante turfoso.

- Com estresse de seca e de calor, a sobrevivência do rizóbio após a inoculação das sementes foi praticamente nula com inoculante turfoso, enquanto que as sementes inoculadas com o inoculante oleoso mantinha 10^4 células de rizóbio por semente.

- Em substrato contendo matéria orgânica, 3 dias após a remoção do estresse de seca e de calor houve uma recuperação do número de rizóbio, praticamente igualando-se aos tratamentos sem estresse.

6- CAPÍTULO III

EFEITO DE INOCULANTE OLEOSO E TURFOSO NA NODULAÇÃO E PRODUÇÃO DO FEIJOEIRO NO CAMPO, SUBMETIDO A ESTRESSE DE SECA APÓS A SEMEADURA.

6.1- RESUMO

Muitas espécies leguminosas são autosuficientes na nutrição nitrogenada quando em associação simbiótica com bactérias nodulantes de raízes. O sucesso da inoculação com estirpes de rizóbio selecionadas em cultivares de importância econômica, é muitas vezes prejudicada pelas condições adversas de alta temperatura, dessecação e estresses de solo, resultando na redução do número de bactérias viáveis, baixa nodulação e diminuição na produção de grãos. Temperatura elevada e falta de água após a semeadura, são estresses que ocorrem com frequência na cultura do feijoeiro. O objetivo deste trabalho foi comparar o inoculante em óleo mineral nujol desenvolvido no capítulo I com o inoculante convencional em turfa, sob condições de estresse de seca nos 4 primeiros dias após o plantio no campo. Os resultados demonstraram a superioridade do inoculante oleoso em relação ao turfoso,

em todos os parâmetros de nodulação analisados (número, peso de nódulos e atividade da nitrogenase), e na produção de matéria seca resultando em maior produção de grãos.

6.2- INTRODUÇÃO

A produção de grãos pelas leguminosas é dependente de um adequado suprimento de nitrogênio, que pode ser obtido, em muitos casos, pela fixação biológica de nitrogênio, ocasionado pelo rizóbio nativo ou através da inoculação.

Apesar do potencial de fixação de nitrogênio por *Phaseolus vulgaris* L. ser muitas vezes subestimado, resultados experimentais mostram que para as cultivares mais utilizadas, com ciclo entre 80 e 90 dias, quando Gem noduladas e em condições favoráveis, podem apresentar taxas de fixação superiores a 40 kg N/ha (Franco, 1978). Desta forma, o fornecimento de nitrogênio da simbiose poderia ser suficiente para duplicar a produtividade média nacional, sem o uso de adubo nitrogenado. Entretanto, nas áreas tropicais e subtropicais, a nodulação e o aumento da produção de grãos por leguminosas são geralmente limitados

por fatores que afetam a simbiose leguminosa-*Rhizobium* .

Altas temperaturas e dessecação pela baixa umidade do solo são condições que prevalecem na época de plantio de leguminosas. Diatloff (1970) observou que temperaturas do solo de 40°C por 4 horas em uma área úmida onde se encontrava sementes de soja inoculadas, houve um ligeiro declínio na nodulação, porém não foi crítico para subsequente nodulação. Entretanto, se altas temperaturas são simultaneamente experimentadas com um outro fator de estresse, como a dessecação, a queda na nodulação é mais crítica. A umidade do solo modifica a temperatura do solo, logo, esses dois fatores estão intimamente ligados.

Condições adversas como calor e seca no plantio podem causar uma redução na qualidade do inoculante utilizado pela diminuição do número de rizóbio aplicado às sementes (Kremer & Peterson, 1982). A manutenção de alto número de células viáveis entre a produção e a aplicação do inóculo é um fator importante para o sucesso do uso de inoculantes (Meade et al., 1985).

O inoculante em óleo mineral nujol desenvolvido conforme descrito no capítulo I melhorou a sobrevivência do rizóbio inoculado nas sementes, em condições controladas. O objetivo deste trabalho foi comparar o inoculante oleoso desenvolvido com o inoculante convencional em turfa, na nodulação, na fixação de nitrogênio e na produção de grãos em condições de campo,

com a simulação de estresse de seca nos 4 primeiros dias após o plantio.

6.3- MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi instalado no campo experimental da EMBRAPA/CNPAB, Itaguaí-RJ, em março de 1991, em solo arenoso, em uma área onde não havia sido plantado feijão, há pelo menos 20 anos.

Foram testados dois inoculantes (oleoso preparado como indicado no item 4.3.5 e turfoso preparado como indicado no item 4.3.6) e testemunha (sem inoculação), submetidos a dois sistemas simulados de rega: irrigado (irrigado desde o plantio) e seco (seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio). O delineamento experimental foi um fatorial em blocos ao acaso com dois fatores (inoculante x regime hídrico), com parcelas de 2,5m x 4m, tendo cada parcela seis fileiras, sendo a segunda fileira utilizada para avaliar a nodulação, a quarta e a quinta fileiras para avaliar a produção, e as demais serviram como bordadura.

Como o experimento foi em campo, para garantir o estresse de seca e evitar a contaminação, foram construídos canais entre as parcelas para o escoamento da água das chuvas ou da irrigação. As parcelas em que aplicou-se o estresse de seca, foram cobertas com plástico preto de polietileno para garantir que o solo ficasse seco até o início da rega. Foi feita determinação da temperatura e umidade do solo nos 5 primeiros dias após o

plantio (Figuras 2 e 3). Fez-se adubação e correção de acidez do solo (80 kg/ha de P_2O_5 , e 0,5 t/ha de calcário dolomítico calcinado Minercal), conforme recomendado pela análise do solo (tabela 6) segundo o Manual de Adubação para o Estado do Rio de Janeiro.

O período em que as parcelas com estresse de seca ficaram cobertas, foi de chuva contínua, não havendo diferenças marcantes de temperatura entre as parcelas cobertas e não cobertas (Figura 3).

O plantio ocorreu em sulcos, colocando-se 3 sementes inoculadas a cada 10 cm. Sete dias após a germinação foi feito um desbaste, deixando-se apenas 1 planta a cada 10 cm.

A cultivar utilizada de *Phaseolus vulgaris* L. foi a CFN2234 safra 1990 proveniente do campo experimental da EMBRAPA/CNPAB. A esterilização das sementes foi feita conforme descrito em 5.3.

A inoculação das sementes foi feita da seguinte forma: Após as sementes serem esterilizadas foram misturadas ao inoculante oleoso (obtido conforme descrito em 4.3.5) ou ao inoculante turfoso (obtido conforme descrito em 4.3.6), até que todas sementes estivessem cobertas pelo inoculante e em seguida plantadas e imediatamente cobertas com solo.

Os seguintes parâmetros foram analisados: número e peso de nódulos secos a 65°C até peso constante,

atividade da nitrogenase, peso da parte aérea seca a 65°C até peso constante e produção de grãos (11% de umidade). Foram efetuadas 6 coletas para avaliação da nodulação e da fixação de nitrogênio (8, 12, 16, 20, 24 e 45 dias após a germinação), duas coletas para avaliar peso da parte aérea seca (45 e 66 DAG) e uma coleta para avaliar produção de grãos (66 DAG).

A avaliação da atividade da nitrogenase foi feita da seguinte forma: Após cada coleta, as raízes foram destacadas e colocadas em frascos de vidro (300 ml), vedados com tampa de borracha (Subaseal). Em seguida, 10 % do ar foi substituído por gás acetileno, deixando-se em incubação por 15 minutos. Ao final deste período, amostras de 0,5 ml da mistura gasosa foram retiradas e levadas para análise em cromatógrafo de gás. A medição da atividade da nitrogenase foi avaliada através da determinação do etileno evoluído pela redução do acetileno, conforme descrito por Boddey (1982). Após a determinação da atividade da nitrogenase, os nódulos foram destacados, contados e colocados para secagem a 65°C, para obtenção do peso da matéria seca.

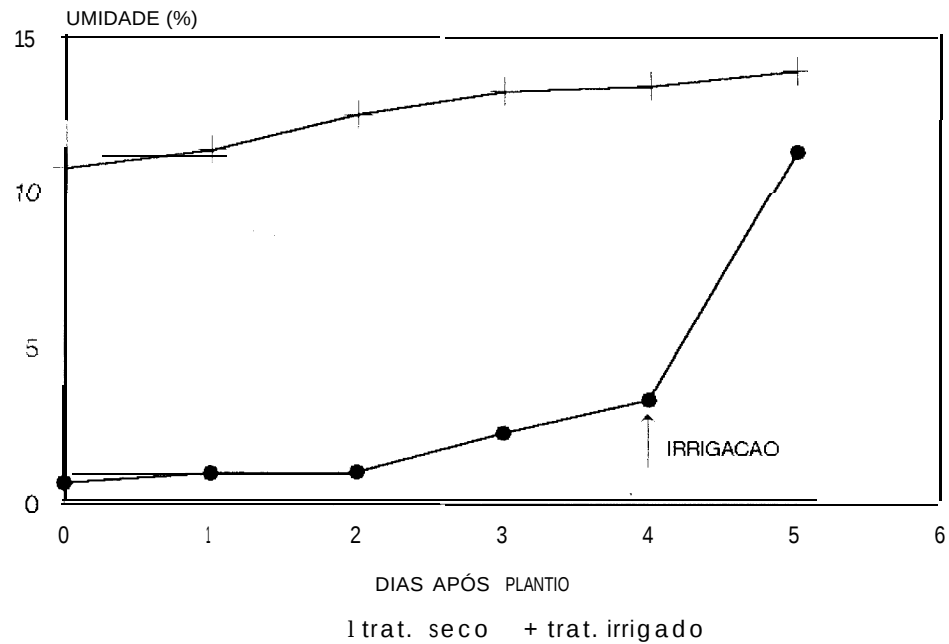


Figura 2 : Umidade do solo durante o período de estresse. Amostras coletadas de 0 - 10cm de profundidade.

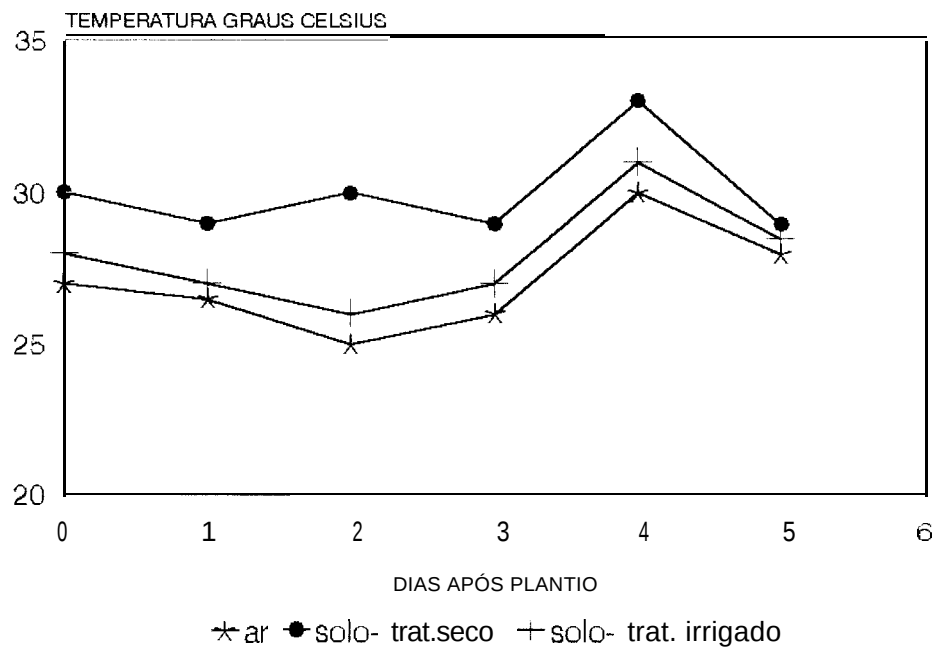


Figura 3 : Temperatura do ar e do solo durante o período de estresse , tomadas às 14:00h.

TABELA 6: Análise química e granulométrica do solo (Planossolo-série Ecologia) do experimento de campo, antes da correção da fertilidade.

ANÁLISE QUÍMICA	AMOSTRA
Fósforo (ppm)	3.7
Potássio (ppm)	44.5
Al^{3+} (mE/100cm ³)	0.0
pH	6.1
Mg^{2+} (mE/100cm ³)	1.3
Ca^{2+} (mE/100cm ³)	0.5
Carbono (%)	0.75
Mat. Orgânica (%)	1.29
Nitrogênio (%)	0.121

ANÁLISE GRANULOMÉTRICA	AMOSTRA
Argila (%)	6
Areia (%)	87
Silte (%)	7
Textura	Areia Franca

6.4- RESULTADOS

Na avaliação do número de nódulos (Figura 4) observou-se que mesmo na ausência do estresse de seca, as plantas inoculadas com o inoculante oleoso apresentaram valores significativamente mais elevados comparado com as plantas inoculadas com o inoculante turfoso. Estas diferenças foram muito superiores na presença do estresse de seca. As plantas sem inoculação apresentaram nodulação mínima até os 24 DAG.

A mesma tendência dos resultados anteriores foi observada quando avaliou-se o peso de nódulos seco (Figura 5). As plantas inoculadas com o inoculante oleoso mostraram-se inicialmente melhores do que as plantas inoculadas com o inoculante turfoso. Com a aplicação do estresse de seca as plantas inoculadas com o inoculante oleoso apresentaram uma vantagem ainda maior em relação as plantas inoculadas com o inoculante turfoso.

Quando a avaliação do número e peso de nódulos foi feita aos 45 DAG (Figura 6) observou-se que o inoculante oleoso proporcionou uma excelente nodulação, apesar do estresse de seca inicial, enquanto que com o inoculante turfoso não houve recuperação da nodulação, mesmo que somente 4 dias de estresse de seca tenha sido aplicado após o plantio. O excesso de umidade inicial também prejudicou os tratamentos. As plantas testemunhas

apresentaram nodulação mínima até esta avaliação.

Na avaliação da atividade da nitrogenase (Figura 7) observou-se que os poucos nódulos produzidos pelas plantas testemunhas não apresentaram fixação, portanto foram ineficientes. Nos tratamentos em que não foi aplicado estresse de seca, o excesso de umidade atrasou o início da fixação de N_2 com ambos inoculantes. Com o estresse de seca as plantas inoculadas com o inoculante oleoso apresentaram fixação de N_2 superior as plantas inoculadas com o inoculante turfoso. Foi observada uma queda na atividade da nitrogenase e na nodulação entre 16 e 24 DAG, que foi devido ao ataque de larvas de *Cerotoma arcuata*, que foi controlado com o inseticida de contato, ingestão, fumigante e de profundidade, DIAZINON (100 ml/100 l H_2O aplicado aos 15 DAG) e o inseticida sistêmico RAMIDOL com extravon (100 ml/100 l H_2O aplicado aos 34 DAG e 49 DAG). Quando foi feita a última avaliação da atividade da nitrogenase aos 45 DAG (Figura 6), observou-se valores superiores de fixação de N_2 , indicando que houve recuperação das plantas ao ataque do *Cerotoma arcuata*. Mesmo assim, apesar da recuperação, as plantas inoculadas com o inoculante oleoso e que foram submetidas ao estresse de seca alcançaram valores superiores aos demais tratamentos. Observou-se uma grande recuperação das plantas inoculadas com inoculante turfoso submetidas ao estresse de seca, que nas avaliações anteriores

apresentaram sempre valores inferiores aos demais tratamentos. Os tratamentos em que não houve aplicação do estresse de seca apresentaram valores semelhantes de fixação. As plantas testemunhas até 45 DAG apresentaram valores da atividade da nitrogenase insignificantes.

Na avaliação da produção de matéria seca feita aos 45 e 66 DAG (Figura 8), observou-se que nas duas avaliações a testemunha apresentou uma produção de matéria seca bem menor em relação aos demais tratamentos. As plantas inoculadas com o inoculante oleoso apresentaram valores de matéria seca superiores às plantas inoculadas com o inoculante turfoso. Com o estresse de seca, as plantas inoculadas com o inoculante oleoso tenderam a ser superiores na primeira avaliação aos 45 DAG, porém essa diferença não foi observada no crescimento total das plantas aos 66 DAG. O excesso de umidade na época do plantio refletiu em menor crescimento das plantas até os 45 DAG, havendo uma recuperação aos 66DAG.

Na avaliação da produção de grãos (Figura 9), observou-se que o excesso de umidade inicial referido nas avaliações anteriores refletiu-se, prejudicando a produção. A produção de grãos das plantas inoculadas com o inoculante oleoso foi superior à produção das plantas inoculadas com o inoculante turfoso. Com o estresse de seca houve superioridade das plantas inoculadas com o inoculante oleoso. As plantas testemunhas apresentaram

valores de produção significativamente inferiores aos demais tratamentos. A produção do melhor tratamento chegou a obter em média 600 kg/ha a mais em relação a produção da testemunha.

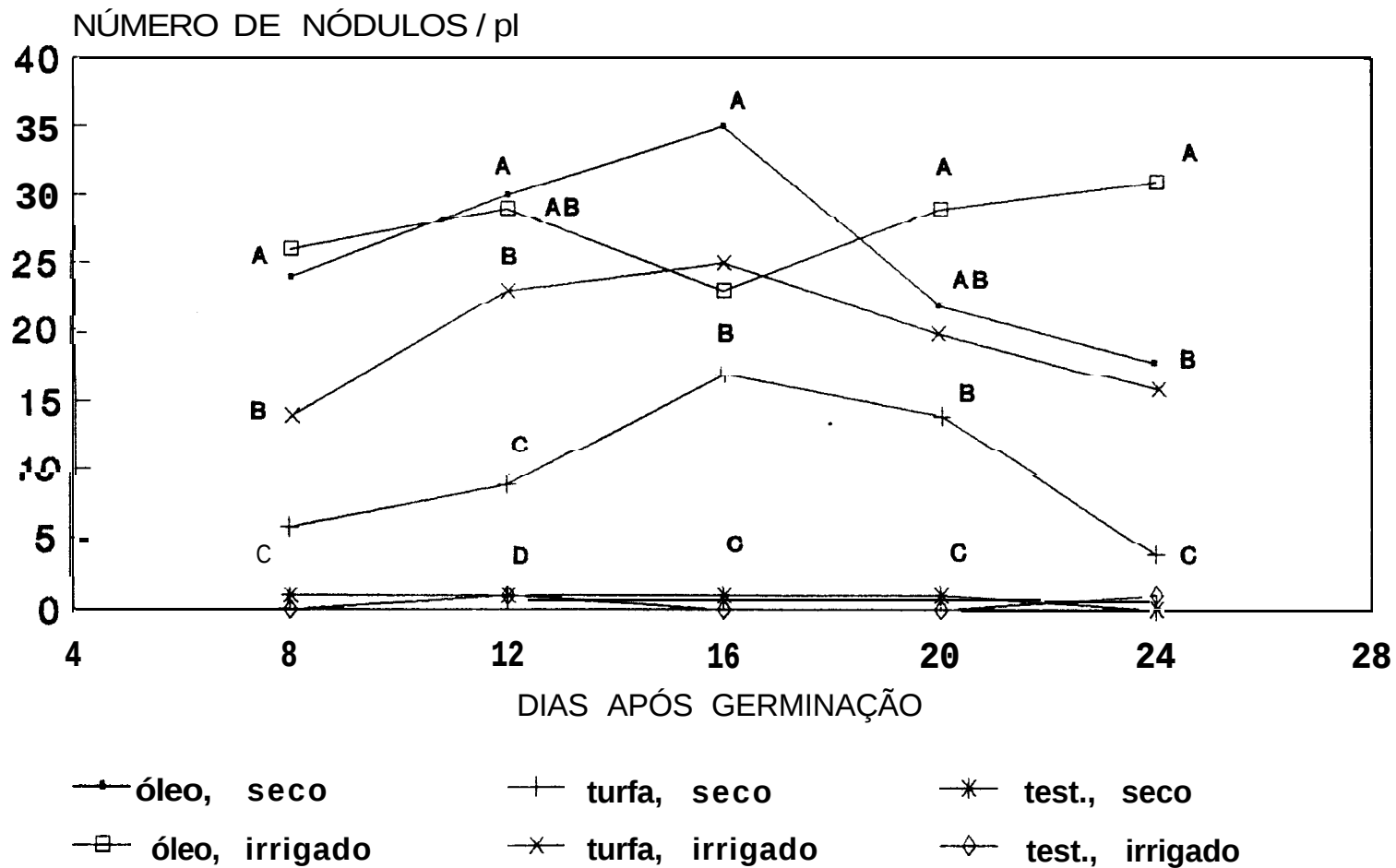


Figura 4: Número de nódulos de feijoeiro cv. Carloc 80, Inoculado com inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco (seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) ou Irrigado (irrigado desde o plantio). Pontos da mesma coleta com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

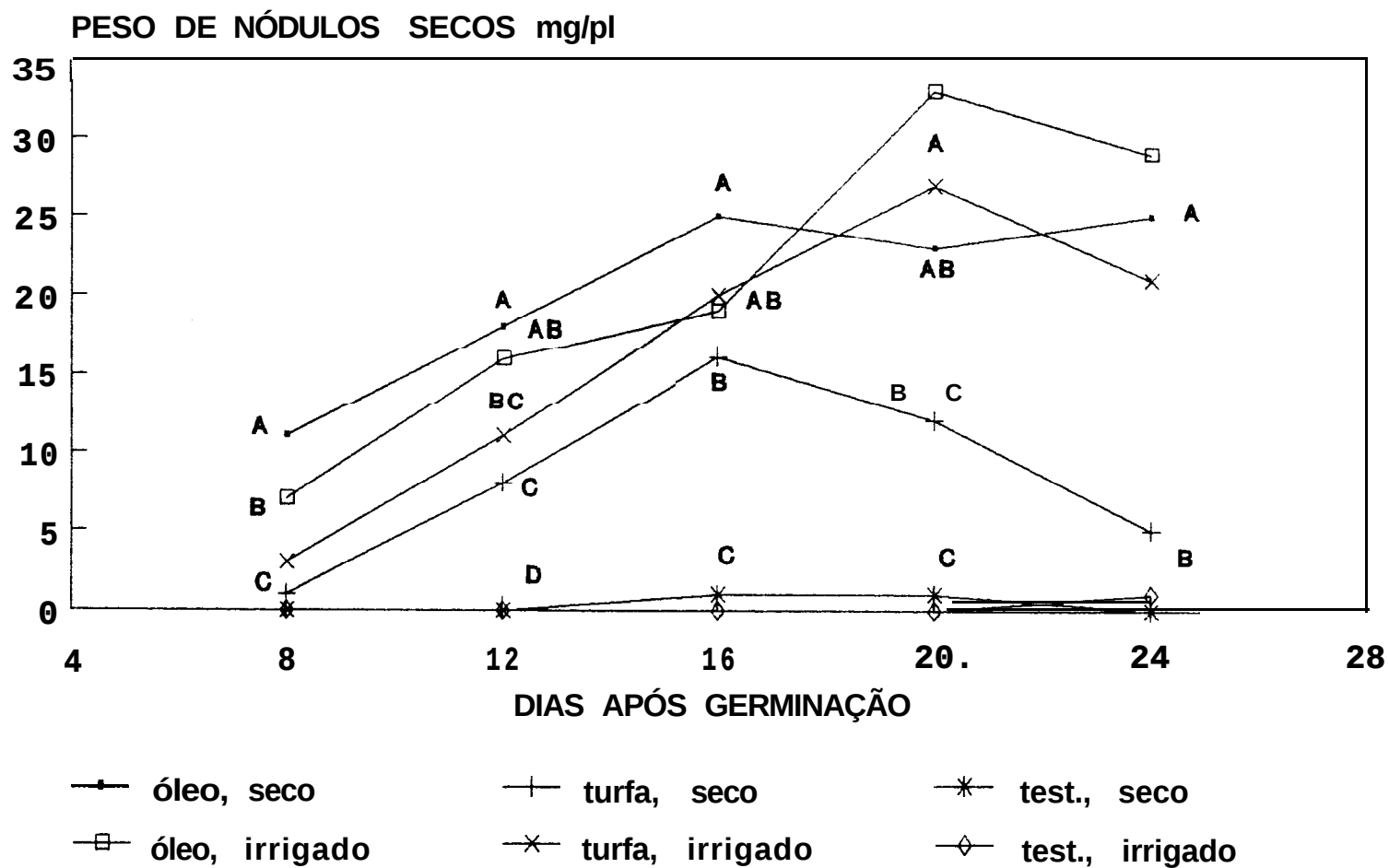


Figura 5: Peso de nódulos secos de feijoeiro, cv. Carioca 80, Inoculado com Inoculante oleoso ou turfoso Submetido a dois sistemas de rega: seco (seco Inicialmente, Irrigado 4 dias após o plantio) ou Irrigado (Irrigado desde o plantio). Pontos da mesma coleta com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

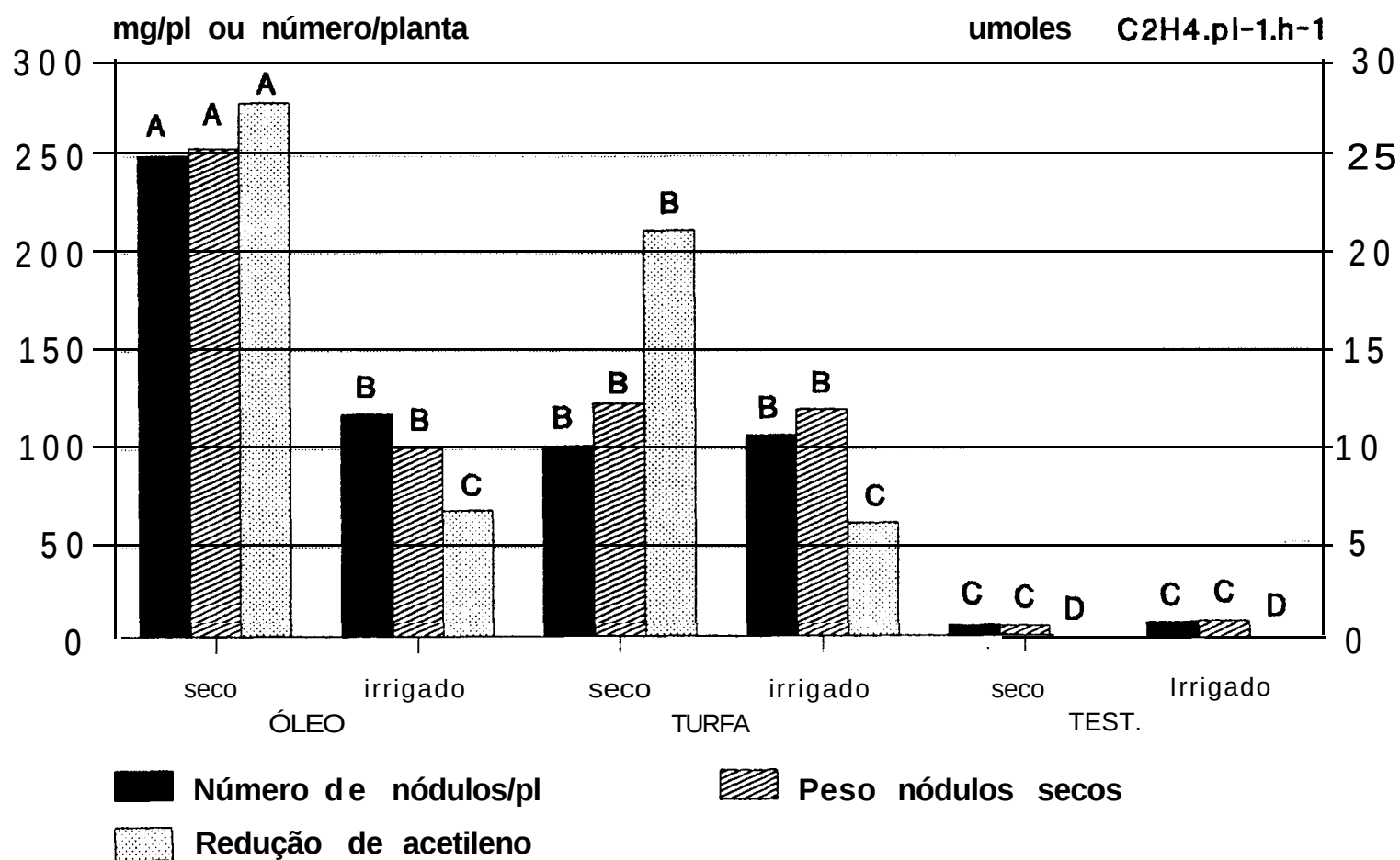


Figura 6: Número, peso de nódulos secos e redução de acetileno de raízes de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com Inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco (seco Inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) ou irrigado (irrigado desde o plantio). Plantas colhidas 45 DAG. Colunas com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

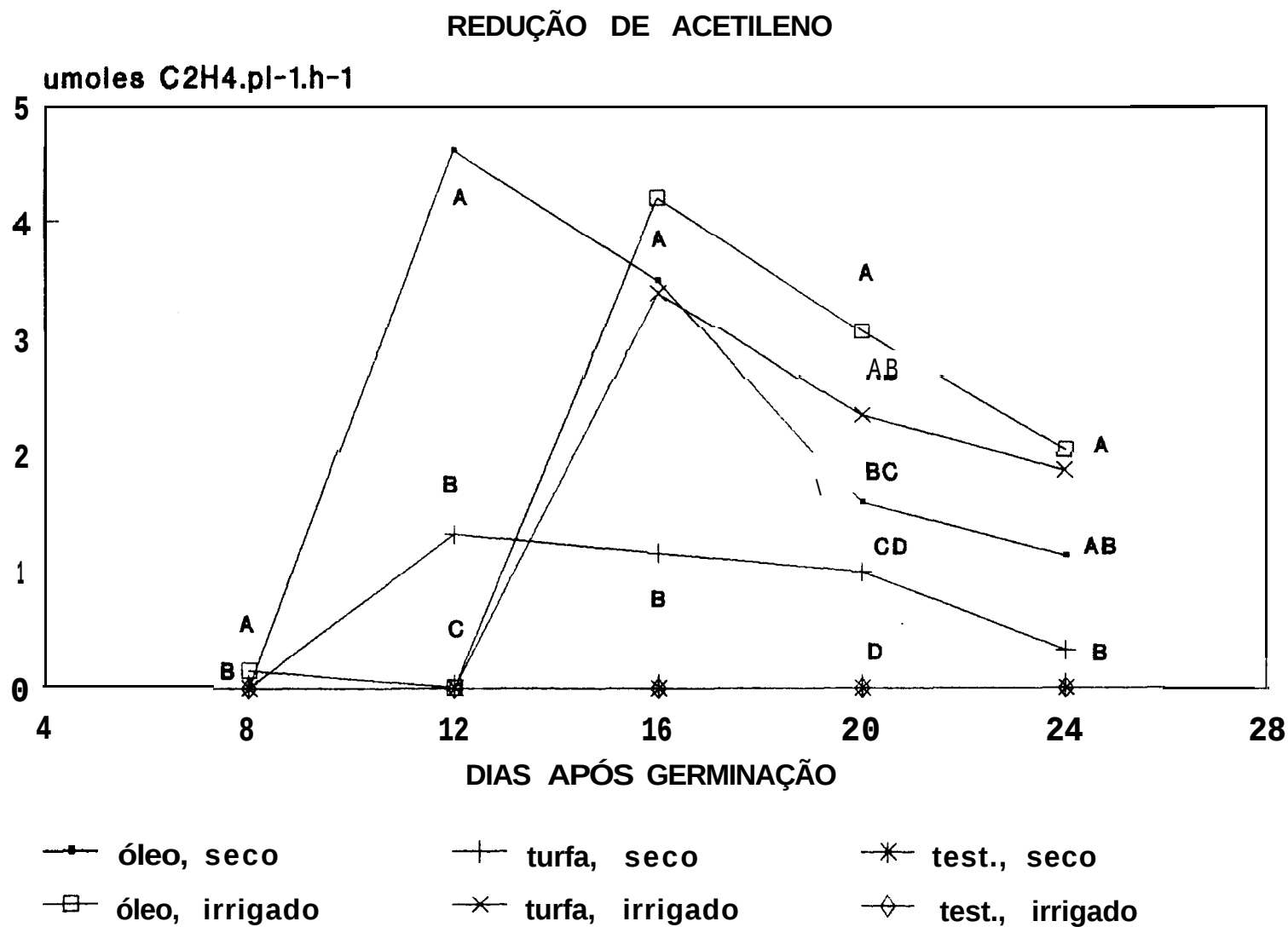


Figura 7: Redução de acetileno (atividade da nitrogenase) de nódulos em raízes de feijoeiro, cv. Carioca 80 Inoculado com Inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco (seco inicialmente, irrigado 4 dias após plantio) ou Irrigado (Irrigado desde o plantio). Pontos da mesma coleta com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

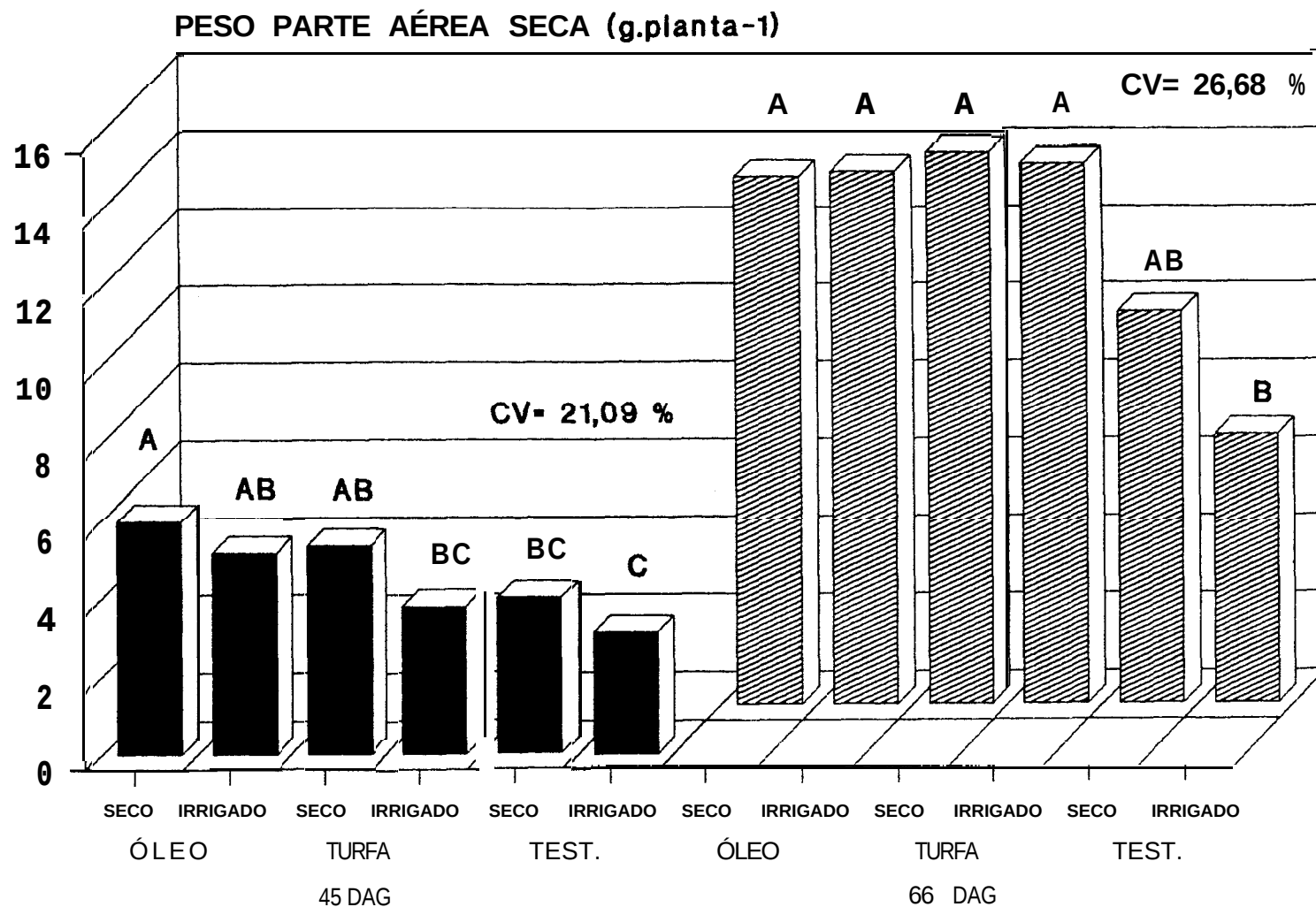


Figura 8: Produção de matéria seca da parte aérea do feijoeiro, cv. Carioca 80, Inoculado com Inoculante oleoso ou turfoso, submetido a dois sistemas de rega: seco (seco inicialmente, Irrigado 4 dias após o plantio) ou Irrigado (Irrigado desde o plantio). Colunas com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

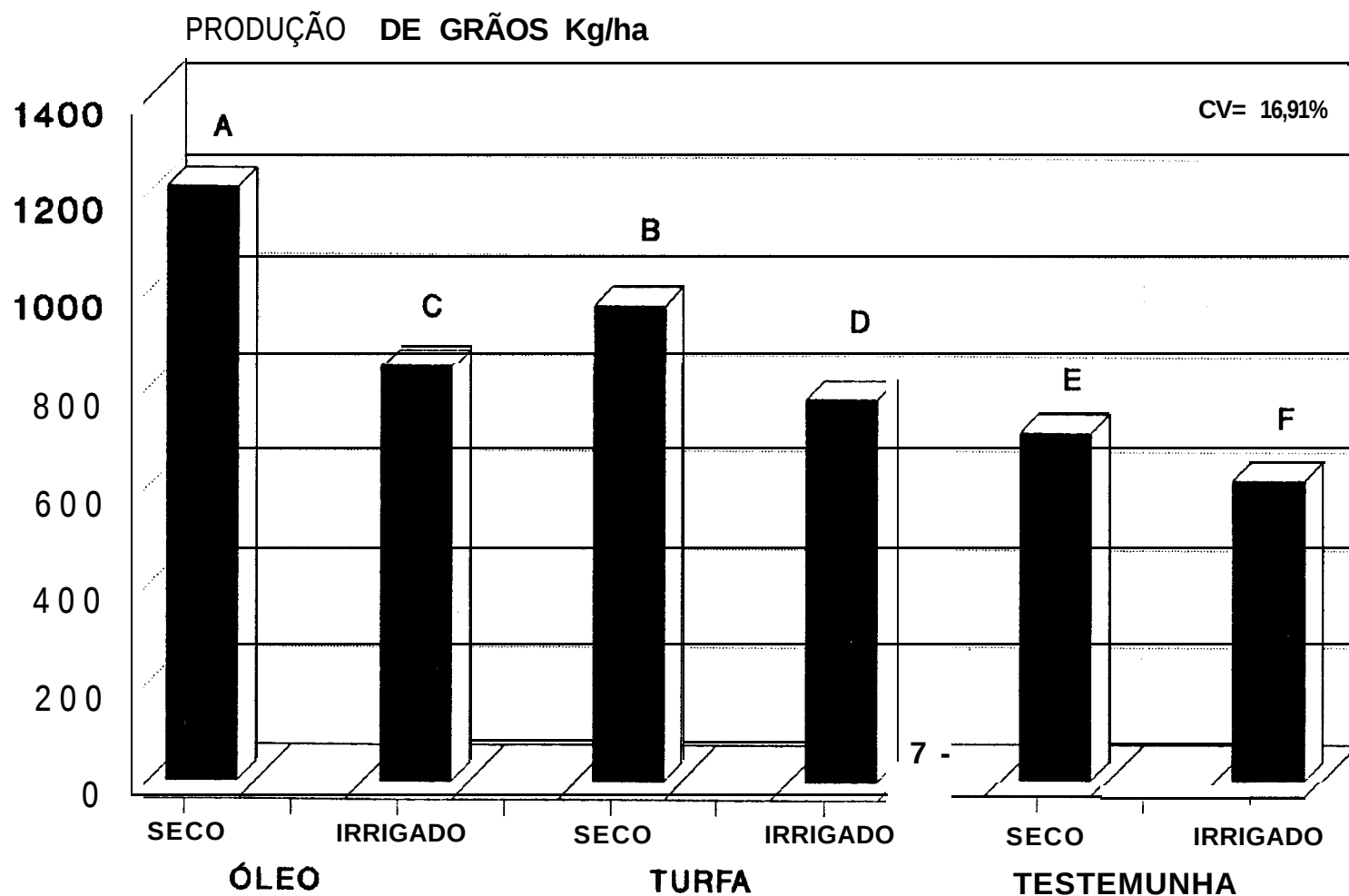


Figura 9: Produção de grãos(kg/ha) de feijoeiro, cv.Carioca 80, inoculado com Inoculante oleoso ou turfos, submetido a dois sistemas de rega: seco (seco inicialmente, irrigado 4 dias após o plantio) ou irrigado (Irrigado desde o plantio). Colunas com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$).

6.5 DISCUSSÃO

De uma maneira geral os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que as plantas inoculadas com inoculante oleoso apresentaram maior nodulação, crescimento das plantas e produção de grãos do que as plantas inoculadas com inoculante turfoso. Resultados semelhantes foram obtidos por Kremer & Peterson (1982).

A maior nodulação observada, reflete a maior sobrevivência das bactérias após a inoculação das sementes, observada nos três tipos de solos e na mistura de vermiculita com areia, estudada no capítulo II. Além do mais, este efeito foi mais pronunciado quando as sementes inoculadas foram submetidas ao estresse de seca, resultando em maior nodulação em plantas mais jovens, mais nitrogênio fixado, resultando em um acréscimo de 240 kg/ha de grãos em relação as plantas inoculadas com inoculante turfoso.

As plantas que foram submetidas ao estresse de seca em todos os tratamentos apresentaram resultados superiores em relação as plantas que não foram submetidas ao estresse. Esses resultados indicam que o excesso de umidade logo após a semeadura do feijoeiro é prejudicial a cultura. Nesse trabalho não foi possível separar o efeito do excesso de umidade sobre o crescimento da planta, do efeito sobre a sobrevivência da bactéria. Entretanto,

Afiana & Alexander (1979) observaram que a sobrevivência de *R. trifolii* e de *R. japonicum* diminuíram com o progressivo aumento de umidade (10%, 22%, 35% e 45%). Roughley & Vincent (1967) também verificaram que tanto o excesso como a falta de umidade foram prejudiciais a sobrevivência do rizóbio.

O excesso de água diminui o vigor das plantas e isto pode estar relacionado com a falta de oxigênio durante a germinação e posteriormente no desenvolvimento do sistema radicular e na nodulação. Kornelius & Freire (1974) concluíram que aeração e umidade tem grande influência no desenvolvimento do sistema radicular, da nodulação e da parte aérea do feijoeiro.

Nesse trabalho não foi possível detectar o efeito de altas temperaturas associado com a falta de umidade durante o plantio, ou após o cessamento do estresse, estudado no capítulo II, pois, durante todo o experimento a temperatura máxima e mínima do ar foram de 32°C e 22°C respectivamente, sendo considerada a faixa ótima de temperatura para nodulação, funcionamento da simbiose e crescimento do feijoeiro (Guss & Döbereiner, 1972; Pankhurst, 1973; Graham & Halliday, 1977).

Os resultados de produção obtidos pelo melhor tratamento deste trabalho (1213 kg/ha), quase o dobro da produtividade média nacional conseguida na safra de 92/93 que foi de 656 kg/ha (CONAB-MARA, 1993), confirma, a

importância da fixação simbiótica de nitrogênio para o feijoeiro, obtida através da inoculação de sementes com inoculantes contendo bactérias eficientes e veículos de inoculantes capazes de proteger a bactéria contra fatores adversos, que geralmente ocorrem na época de plantio, como altas temperaturas e baixa umidade.

Estes resultados confirmam a possibilidade de dobrar a produção nacional do feijoeiro, sem aumentar a área plantada ou a necessidade de adubos nitrogenados, podendo resultar em economia superior a 100 milhões de dólares. Entretanto, há necessidade do desenvolvimento de um inoculante oleoso comercial que mantenha alta viabilidade até o uso.

6.6- CONCLUSÕES

- O excesso de umidade logo após a semeadura do feijoeiro prejudicou o crescimento das plantas e a produção de grãos em todos os tratamentos.

- O inoculante em óleo mineral conferiu maior nodulação inicial resultando em maior produção de grãos do que o inoculante convencional em turfa. Este efeito foi muito mais pronunciado quando ocorreu estresse de seca logo após a semeadura das sementes inoculadas.

- A recuperação no crescimento das plantas na última colheita (66 DAG) no tratamento com inoculante convencional, não refletiu em aumento na produção de grãos.

- O melhor tratamento de inoculação (inoculante em óleo mineral) aumentou em 600 kg/ha de grãos em relação ao controle sem nodulação.

7- CONCLUSÕES GERAIS

- A sobrevivência de rizóbio no inoculante em óleo mineral nujol foi dependente da exclusão de umidade durante a estocagem do mesmo.

- O estresse de seca prejudicou mais a sobrevivência do rizóbio após a inoculação, do que o estresse de calor.

- O inoculante em óleo mineral nujol proporcionou maior sobrevivência do rizóbio após a inoculação das sementes, quando submetidos a estresse de calor e seca, que o inoculante em turfa.

- O inoculante em óleo mineral nujol propiciou maior nodulação em plantas jovens, resultando em maior produção de grãos que o inoculante em turfa. Este efeito foi muito mais pronunciado quando as sementes foram plantadas em solo seco e mantidas 4 dias sem irrigação.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APARICO-TEJO, P. M.; SANCHEZ-DIAZ, M. F. & PENA, J. L. Nitrogen fixation and stomatal response and transpiration in *Medicago sativa*, *Trifolium repens* and *T. subterraneum* under water stress and recovery. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.48, p.1-4, 1980.
- APPLEMAN, M. D. & SEARS, O. H. The possibility of using lyophilized cultures as comercial legume inoculants. Soil Science Society American Proceeding, Madison, v.9, p.98-100, 1944.
- BALASUNDARAM, V. R. Perfomance of *Rhizobium japonicum* strains tolerant to high temperature and low soil moisture. Indian Journal of Agricultural Sciences, v.58, n.10, p.776-778, 1988.
- BARRIOS, S.; RAGGIO, N. & RAGGIO, M. Effect of temperature on infection of isolated bean roots by rhizobia. Plant Physiology, v.38, n.2, p.171-174, 1963.
- BODDEY, R. M. The acetylene reduction technique. Apostila do curso intensivo sobre fixação biológica de nitrogênio, Rio de Janeiro, EMBRAPA/CNPq, 1982.

- BOONKERD, N. & WEAVER, R. W. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.43, n.3, p.585-589, 1982.
- BOWEN, G. D. & KENNEDY, M. M. Effect of high soil temperatures on *Rhizobium* spp. *Queensland Journal Agriculture Science*, v.16, p.177-197, 1959.
- BOYER, J. S. Water deficits and photosynthesis. In: KOSLOWSKI, T.T., ed. *Water deficits and plant growth*, England. v.4, p.153-190, 1976.
- BROCKWELL, J. & PHILLIPS, L. J. Studies on seed pelleting as an aid to legume seed inoculation 3. Survival of *Rhizobium* applied to seed sown into hot, dry soil. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, v.10, p.739-744, 1970.
- BROCKWELL, J. & WHALLEY, R. D. B. Studies on seed pelleting as an aid to legume seed inoculation. 2. Survival of *Rhizobium meliloti* applied to medic seed sown into dry soil. *Australian Journal Experimental Agriculture Animal Husbandry*, v.10, p.455-459, 1970.

- BURTON, J. C. *Rhizobium* culture and use. In: PEPPLER, H-J., ed. Microbial Technology. Van Nostrand-Reinhold, New York, p.1-33, 1967.
- BURTON, J. C. Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. In: NUTMAN, P.S., ed. Symbiotic nitrogen fixation in plants, Cambridge: Cambridge Univ. Press, p.175-189, 1975.
- BURTON, J. C. Some practical aspects of legume inoculation. Proceedings, Winter Meeting Mississippi Section, American Society of Agronomy, p.51-68, 1976.
- BURTON, J. C. *Rhizobium* species. In: PEPPLER, H.J. & PELMAN, D., eds. Microbial Technology. 2 ed. New York, Academic Press, v.1, p.29-57, 1979.
- BURTON, J. C. *Rhizobium* inoculante for developing countries. Tropical Agriculture, London, v.58, n.4, p.291-303, 1981.
- BUSHBY, H. V. A. & MARSHALL, K. C. Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.9, p.143-147, 1977.

BUSHBY, H. V. A. & MARSHALL, K. C. Water status of rizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite. *Journal of General Microbiology*, London, v.99, p.19-27, 1977.

CHAO, WEI-LIANG & ALEXANDER, M. Influence of soil characteristics on the survival of *Rhizobinn*, in soils undergoing drying. *Soil Science Society of American Journal*, Madison, v.46, n.5, p.949-952, 1982.

CONAB-MARA. Abril, 1993. Ano 17, N° 04. Acompanhamento da safra 92/93.

COOPER, A. J. Root temperature and plant growth. *Research Review* n° 4. Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops, East Malling, Maidstone, Kent, 73p., 1973.

DANSO, S. K. A. The ecology of *Rhizobium* and recent advances in the study of the ecology of *Rhizobium*. In: AYANABA, A. & DART, P.J., eds. *Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics*. Chichester, John Wiley, p.115-125, 1977.

- DANSO, S. K. A. & ALEXANDER, M. Survival of two strains of *Rhizobium* in soil. Soil Science Society American Proceeding, Madison, v.38, p.86-89, 1974.
- DATE, R. A. & ROUGHLEY, R. J. Preparation of legume seed inoculants. In: HARDY, W.F. & GIBSON, A.H., eds. A treatise on dinitrogen fixation. New York, Wiley, p.243-76, 1977.
- DAVIDSON, F. & REUSZER, H. W. Persistence of *Rhizobium japonicum* on the soybean seed coat under controlled temperature and humidity. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.35, p.94-96, 1978.
- DIATLOFF, A. Relationship of soil moisture, temperature and alkalinity to a soybean nodulation failure. Queensl. J. Agric. Anim. Sci., v.27, p.279-293, 1970
- DÖBEREINER, J. & ARONOVICH, S. Efeito da calagem e da temperatura do solo na fixação de nitrogênio de *Centrosema pubescens* Benth. em solo com toxidez de manganês. Anais IX Congr, Intern. Pastagens, p.1121-1124, 1965.

- EAGLESHAN, A. R. J. & GOLDMAN, B. J. Oil based inoculants for preinoculation of *Centrosema macrocarpum*. Workshop on *Rhizobium Legume* Inoculants. Porto Alegre, RS., Anais, p. 283-288, 1985.
- ENGIN, M. & SPRENT, J. 1. Effects of water stress on growth and nitrogen-fixing activity of *Trifolium repens*. New Phytology, v.72, p.117-126, 1973.
- FERRARI, E.; SOUTO, S. M. & DÖBEREINER, J. Efeito da temperatura do solo na nodulação e no desenvolvimento da soja perene (*Glycine javanica* L.). Pesquisa Agropecuária Brasileira, Rio de Janeiro, v.2, p.461-466, 1967.
- FIGUEIREDO, M. V. B. Eficiência simbiótica e sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp, (Clitoria) em diferentes substratos para inoculação. Recife: UFRP, 1989. 123p. Tese de Mestrado.
- FISHER, R. A. & TURNER, N. C. Plant productivity in the arid and semiarid zones. Annual Review of Plant Physiology (EE.UU.), v.29, p.277-317, 1978.

- FRANCO, A. A. Contribution of the legume-*Rhizobium* symbiosis to the ecosystem and food production. In: DÖBEREINER, J.; BURRIS, R.H. & HOLLAENDER, A., eds. Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. New York: Plenum, p.65-74, 1978.
- FRED, E. B. & WAKSMAN, S. Laboratory manual of general microbiology. New York, Mc Graw-Hill Book Company Inc., 1928.
- FREIRE, J. R. J. Influência da temperatura de armazenagem e da perda de umidade na longevidade dos inoculantes de leguminosas. Separata de Rev. de Fac. de Agron. e Vet., v.6, n.2, 1963.
- FREIRE, J. R. J. Trabalhos em rizobiologia no RGS. In: Reunião Latino Americana, Inoculantes Leguminosa, 4, Porto Alegre, Anais..., s. ed., p.19-24, 1968.
- FRINGS, J. F. J. The *Rhizobium*-pea symbiosis as affected Whigh temperature. Meded Landbougeshool Wageningen, v.76, p.1-76, 1976.

GALLACHER, A. E. & SPRENT, J. I. The effects of different water regimes on growth and nodule development of greenhouse grown *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany*, London, p.413-423, 1978.

GIBSON, A. H. The influence of the environment and managerial practices on the Legume-*Rhizobium* symbiosis. In: HARDY, R.W.F. and GIBSON, A.H., eds. *A Treatise on dinitrogen fixation IV, Agronomy and ecology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1977.

GONZALES, N. M. de; AYUNDA, A. de; GOMEZ, M. & GONZALEZ, R., Evaluation de algunos materiales de soporte para inoculantes bacterianos. *Turrialba, Costa Rica*, v.36, n.4, p.447-452, 1986.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, v.38, n.6, p.475-484, 1992.

GRAHAM, P. H. & HALLIDAY, J. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. Bean production Program, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colômbia, South America, p. 313-334, 1976.

- GRAHAM, P. H. & HALLIDAY, J. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. In: VINCENT, J.M., WHITNEY, A.S. and BOSE, J. eds. Exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture, Univ. Hawaii, Coll. Trop. Agric., Misc. Pub., v.145, p.313-334, 1977.
- GRAHAM, P. H.; MORALES, V. M. & CAVALLO, R. Materiales excipientes y adhesivos de posible uso en inoculation de leguminosas en Colombia. Turrialba, Costa Rica, v.24, n.1, p.47-50, 1974.
- GUNNING, C. & JORDAN, D. C. Studies on humus type legume inoculants. Canadian Journal Agriculture Science, v.34, p.225-233, 1954.
- GUSS, A. & DÖBEREINER, J. Effects of mineral nitrogen and soil temperature on nitrogen fixation of field beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Pesquisa Agropecuária Brasileira, Rio de Janeiro, v.7, p.87-92, 1972.
- HALLIDAY, J. & FATE, J. S. The acetylene reduction assay as a means of studying nitrogen fixation in white clover under sward and laboratory conditions. J. Brit. Grassl. Soc., v.31, p.29-35, 1976.

- HARDAKER, J. M. & HARDWICK, R. C. A note on *Rhizobium* inoculation of beans (*Phaseolus vulgaris*) using the fluid drill techniques. Experimental Agriculture, London, v.14, n.1, p.17-21, 1978.
- HEDLIN, R. A. & NEWTON, J. D. Some factors influencing the growth and survival of rhizobia in humus and soil culture. Canadian Journal Research, Camb., v.26, p.174, 1948.
- HILTBOLD, D.A.E.; THURLOW, D.L. & SKIPPER, H. D. Evaluation of commercial soybean inoculants by various techniques. Agronomy Journal, Madison, v.72, p.675-681, 1980.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. & SPRENT, J. I. New sources of high temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris*. Plant and Soil, v.149, p.103-109, 1993.
- JAUHRI, K. S. & GUPTA, M. Improvement of carrier material for development of rhizobial inoculants. Current Science, v.56, n.20, p.1061-1062, 1987.
- JOFFE, A.; WEYER, F. & SAUBERT, S. The role of root temperature in symbiotic nitrogen fixation. South Afr. Journal Science, v.57, p.278, 1961.

JONES, F. R. & TISDALE W. B. Effect of soil temperature upon the development of nodules on the roots of certain legumes. Journal of Agriculture Research, Washington, v.22, n.10, p.17-31, 1921.

KORNELIUS, E. & FREIRE, J. R. J. Aeração e umidade do solo como fatores limitantes da nodulação em *Phaseolus vulgaris* L. Agron. sulriograndense, Porto Alegre, v.10, n.2, p.247-260, 1974.

KREMER, R. J. & PETERSON, H. L. Effect of inoculant carrier on survival of *Rhizobium* on inoculated seed. Soil Science, Baltimore, v.134, n.2, p.117-125, 1982.

KREMER, R. J. & PETERSON, H. L. Field evaluation of selected *Rhizobium* in an improved legume inoculant. Agronomy Journal, Madison, v.75, n.1, p.139-143, 1983.

KREMER, R. J.; POLO, J. & PETERSON, H. L. Effect of suspending agent and temperature on survival of *Rhizobium* in fertilizer. Soil Science Society of America Journal, Madison, v.46, n.3, p.539-542, 1982.

- LAL, R. Soil temperature, soil moisture and maize yield from mulched and unmulched tropical soils. *Plant and Soil*, The Hague, v.40, p.129-143, 1974.
- LEIDERMAN, J. El bagazo como excipiente de inoculantes para leguminosas. *Rev, Indust. Agric. de Tucumán*, v.48, p.51-58, 1971.
- LIE, T. A. Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. *Plant and Soil*, Dordrecht, (Special Volume), p.117-127, 1971.
- LIE, T. A. Environmental effects on nodulation and symbiotic nitrogen fixation. In: QUISPEL, A. ed. *The biology of Nitrogen Fixation*, Amsterdam, North-Holland, p.555-578, 1974.
- MARSHALL, K. C. Survival of root-nodule bacteria in dry soils exposed to high temperatures. *Australian Journal of Agricultural Research*, Victoria, v.15, p.273-281, 1964.
- MARSHALL, K. C. & ROBERTS. Influence of lime particle materials on survival of *Rhizobium trifolii* in sandy soil. *Nature*, London, v.198, p.410-411, 1963.

- MCLEOD, R. W. & ROUGHLEY, R. J. Freeze dried cultures as commercial legume inoculants. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry, v.1, p.29-33, 1961.
- MEADE, J.; HIGGINS, P. & O'GARA, F. Production and storage of *Rhizobium leguminosarum* cell concentrates for use as inoculants. Journal of Applied Bacteriology, London, v.58, n.5, p.571-524, 1985.
- MERCANTE, F. M. Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante à temperatura elevada para inoculação do feijoeiro. Itaguaí: UFRRJ, 1993. 149p. Tese de Mestrado.
- MILES, A. A. & MISRA, S. S. The estimation on bactericidal power of blood. J. Hyg., Camb., v.38, p.732-749, 1938.
- MORETTI, V. L. & SAITO, S. M. T. Crescimento e sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em torta de filtro de cana "platmon" e turfa comercial. O Solo, Piracicaba, v.70, n.1, p.44-48, 1978.

- MULDER, E. G.; LIE, T. E. & HOUWERS, A. The importance of legumes under temperate conditions. In: HARDY, R.W.F. & GIBSON, A.H., eds. A treatise on dinitrogen fixation. New York: John Wiley, p.221-242, 1977.
- MUNEVAR, F. & GRAHAM, P. H. Supervivencia de *Rhizobium trifolii* en tres portadores. Revista ICA, Bogotá (Colombia), v.12, n.3, p.225-230, 1977.
- MUNNS, D. N. & FRANCO, A. A. Soil constraints to legume production. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C., eds. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Cali, CIAT, p.133-152, 1982.
- NARENCHA KUMAR, R. P. P. N. & CHANDRA, R. Survival of chickpea *Rhizobium* on seed under different soil moisture levels. Journal Indian Soc, Soil Science, v.34, p.196-197, 1986.
- NEVES, M. C. P. Interdependencia fisiológica entre os componentes do sistema simbiótico *Rhizobium*-leguminosas. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v.5, n.2, p.80-92, 1981.

NEVES, M. C. P. & HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.6, n.3, p.267-321, 1987.

OSA-AFIANA, L. O. & ALEXANDER, M. Effect of moisture on the survival of *Rhizobium* in soil. *Soil Science Society American Journal*, v.43, p.925-930, 1979.

PACZKOWSKI, M. W. & BERRYHILL, D. L. Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal based legume inoculants. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.38, n.4, p.612-615, 1979.

PANKHURST, C. E. *Rhizobium* strain influence on disruption of clover nodule development at high root temperature. *Journal of General Microbiology*, London, v.74, p.219-231, 1973.

PANKHURST, C. E. & SPRENT, J. I. Effects of temperature and oxygen tension on nitrogenase and respiratory activities of turgid and water stressed soybean and french bean root nodules. *Journal of Experimental Botany*, London, v.27, n.96, p.1-9, 1976.

- PATE, J. S. Temperature characteristics of bacterial variation in legume symbiosis. *Nature*, London, v.192, p.637-639, 1961.
- PETERSON, H. L. & LOYNACHAN, T. E. The significance and application of *Rhizobium* in agriculture. *Int. Rev. Cytol, Suppl.*, v.13, p.311-331, 1981.
- PIHA, M. I. & MUNNS, D. N. Sensivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.98, p.183-194, 1987.
- RAI, R. & PRASAD, V. Studies on compatibility of nitrogen fixation by high-temperature-adapted *Rhizobium* strains and *Vigna radiata* genotypes at two moisture levels in calcareous soil. *Journal of Agriculture Science, Camb.*, v.101, p.377-381, 1983.
- RICE, W. A.; PENNY, D. C. & NYBORG, M. Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. *Canadian Journal of Soil Science*, v.57, p.197-203, 1977.

ROUGHLEY, R. J. Some factors influencing the growth and survival of root nodule bacteria in peat culture. *Journal of Applied Bacteriology*, v.31, n.2, p.259-265, 1968.

ROUGHLEY, R. J. The production of high quality inoculants and their contribution to legume yield. In: NUTMAN, F. S. ed. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge, University Press, p.125-136, 1976.

ROUGHLEY, R. J. & VINCENT, J. M. Growth and survival of *Rhizobium* spp in peat culture. *Journal of Applied Bacteriology*, v.30, n.2, p.362-376, 1967.

SCUDDER, W. T. *Rhizobium* inoculation of soybeans for subtropical and tropical soil. I. Initial field trials. *Proc. Soil Crop Science Soc., Florida*, v.34, p.79-82, 1975.

SIDIRAS, N.; DERFSCH, R. & HEINZMANN, F. X. Influência da adubação verde de inverno e seu efeito residual sobre o rendimento nas culturas de verão, em Latossolo Roxo distrófico. *Plantio Direto, Ponta Grossa*, v.9, n.2, p.4-5, 1984.

- SIDIRAS, N. & PAVAN, M. A. Influência do sistema de manejo na temperatura do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.10, n.3, p.181-184, 1986.
- SIMS, J. L.; SIGAFUS, R. E. & TIARANAN, N. Effect of lime, inoculant and molybdenum pelleting on growth and nitrogen content of crown vetch. *Agronomy Journal*, Madison, v.66, p.446-449, 1974.
- SKIPPER, H. D.; PALMER, J. H.; GIDDENS, J. E. & WOODRUFF, J. M. Evaluation of commercial soybean inoculants from south Carolina and Georgia. *Agronomy Journal*, Madison, v.72, p.673-674, 1980.
- SMITH, R. S. Production and quality control of inoculants. In: ELKAN, C.H., ed. *Symbiotic nitrogen fixation technology*. New York, Marcel Dekker, p. 392-411, 1987.
- SMITH, R. S. & ESCURRA, G. A. del Rio. Soybean inoculant types and rates evaluated under dry and irrigated field conditions. *Journal of Agriculture of the Univ, of Puerto Rico*, v.66, n.4, p.241-249, 1982.

- SOMASEGARAM, P. & HOBEN, H. I. Methods in legume-*Rhizobium* technology. Hawaii: NIFTAL MIRCEN, 1985, 367p.
- SPENCER, J. F. T. & NEWTON, J. D. Factors influencing the growth and survival of rhizobia in humus and soil cultures. II Canadian Journal of Botany, Ottawa, v.31, p.253, 1953.
- SPRENT, J. I. In: NUTMAN, P.S., ed. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge Univ. Press, London, p.405-420, 1976.
- SPRENT, J. I.; MINCHIN, F. R. & THOMAS, R. J. Environmental effects on physiology of nodulation and nitrogen fixation. In: DAVIES, D. R. and JONES, D. G., eds. The physiology, genetics and nodulation of temperate legumes, 1982.
- STRIJDON, B. W. & DESCHODT, C. C. Carriers of rhizobia and the effects of prior treatment on the survival of rhizobia. In: NUTMAN, P.S., ed. Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge Univ. Press, Cambridge, England, p.151-168, 1975.

- THOMPSON, J. A.; BATTHANY, C.; LABANDERA, C. & JAURECHE, C. Sobrevivencia de *Rhizobium* en inoculantes comerciales uruguayos. Actas de la Reunion Latino Americana sobre inoculantes para leguminosas, 1968.
- VIEIRA, S. R.; NASCIMENTO, P. C. do; SARVASI, F. O. C. & MOURA, E. G. de. Umidade e temperatura da camada superficial do solo em função da cobertura morta por resteva de soja em plantio direto. Rev. Bras-Ciência do Solo, Campinas, v.15, n.2, p.219-224, 1991.
- VINCENT, J. M. Survival of the root nodule bacteria. In: HALLSWORTH, E. G. ed. Nutrition of the legumes, Butterworths, London, p.108-123, 1958.
- VINCENT, J. M. Presidential address. Australian Studies of the root nodule bacteria. A. Review. Froceedings of the Linnean Society of New Sowth Wales, v.37, part 1, n.87, p.8-38, 1962.
- VINCENT, J. M. Environmental factor in the fixation of nitrogen by the legume. In: BARTHOLOMEW, W. & CLARK, F. E. eds. Soil Nitrogen Agronomy nº 10. Ami. soc Agron. Inc. Fube., Madison, p.384-435, 1965.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. London International Biological Programme, 159p. Oxford, Blackwells scientific Publications (64p.), 1970.

VINCENT, J. M. Factors controlling the legume-*Rhizobium* symbiosis. In: NEWTON, N.E. & ORME-JOHNSON, W.H. Nitrogen fixation. Baltimore, v.2, p.103-129, 1980.

WILLATT, S. T. Soil moisture studies under soya beans. Rhod, Zamb. Mal. Journal of Agriculture Research, v.5, p.229-232, 1967.

WORRAL, V. S. & ROUGHLEY, R. J. The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifolii*. Journal of Experimental Botany, Dang, v.27, n.101, p.1233-1241, 1976.

9- APÊNDICE

ANEXO 1

Resumo da análise de variância (valores F e coeficiente de variação) do Log do número de células/semente dos resultados apresentados no capítulo II.

Substratos	Fonte de variação	Valor F	
		3 DAG	7 DAG
vermiculita: areia	inoculante	3.91	39.36*
	sist. de rega	43.71*	147.39*
	temperatura	3.53	10.41*
	inoc.x temp.	2.77	0.20
	inoc.x rega	2.98	41.65*
	rega x temp.	3.76	7.89*
	inoc x rega x temp.	2.81	0.13
Coeficiente de Variação (%)		31.5	17.8
Solo Planossolo	inoculante	52.24*	1.72
	sist. de rega	217.73*	3.13
	temperatura	17.88*	0.64
	inoc. x temp.	0.72	15.66*
	inoc. x rega	43.0*	6.89*
	rega x temp.	1.23	0.00
	inoc x rega x temp.	0.13	13.70*
Coeficiente de Variação (%)		16.1	5.0
Solo Podzólico Vermelho Amarelo	inoculante	33.54*	2.87
	sist. de rega	176.49*	11.61*
	temperatura	6.72*	7.31*
	inoc. x temp.	2.03	0.82
	inoc. x rega	17.09*	1.42
	rega x temp.	2.52	1.04
	inoc x rega x temp.	0.02	0.63
Coeficiente de Variação (%)		19.5	22.3
Solo Gley Húmico	inoculante	783.60*	0.31
	sist. de rega	3228.60*	13.85*
	temperatura	64.99*	20.36*
	inoc. x temp.	14.54*	20.72*
	inoc. x rega	819.15*	6.86*
	rega x temp.	0.03	7.95*
	inoc x rega x temp.	16.55*	0.48
Coeficiente de Variação (%)		5.0	4.5

*Significativo $p < 0,05$ pelo teste de Duncan.

ANEXO 2

Resumo da análise de variância (valores F e coeficiente de variação) de número de nódulos/pl, peso de nódulos secos/pl e redução de acetileno dos resultados apresentados no capítulo III.

Variável	Fonte de variação	Valor F Coletas (DAG)					
		8	12	16	20	24	45
Número de nódulos/ planta	inoculante sist. rega inoc x rega	69.50*	92.44*	47.74*	39.0*	93.57*	90.34*
		4.76*	3.77	0.57	3.06	34.41*	14.98*
		2.82	5.72*	5.33*	0.97	7.738	17.60*
Coef. de Variação (%)		37.0	26.9	35.0	40.0	31.0	26.9
Peso de nódulos secos/ planta	inoculante sist. rega inoc x rega	36.31*	42.56*	60.53*	20.55*	22.84*	116.90*
		1.07	0.11	0.30	5.17*	4.79*	30.30*
		3.22	0.88	3.60	1.78	2.12	30.32*
Coef. de Variação (%)		61.0	40.7	30.5	54.6	58.6	22.4
Redução de acetileno	inoculante sist. rega inoc x rega	2.92	24.49*	34.90*	15.95*	9.82*	82.96*
		3.07	49.88*	6.59*	7.71*	7.67*	106.84*
		2.92	24.22*	3.10	1.94	2.29	28.87*
Coef. de Variação (%)		279.7	69.0	45.5	63.8	81.9	27.5

* significativo pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).