

MARIA DE FÁTIMA DA SILVA

TAXA DE INÓCULO NA HABILIDADE COMPETITIVA DE RIZÓBIOS E EFICIÊNCIA NA FIXAÇÃO DO N₂ EM FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Tese apresentada pela doutoranda **Maria de Fátima da Silva** ao programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência do Solo.

RECIFE

2011

Ficha catalográfica

S586t Silva, Maria de Fátima da
Taxa de inóculo na habilidade competitiva de rizóbios e
eficiência na fixação do N₂ em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*
(L.) Walp.) / Maria de Fátima da Silva – 2011.
74 p. : il.

Orientadora: Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos
Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2011.

Inclui referências e apêndice.

1. Eficiência simbiótica 2. *Vigna unguiculata* 3. Inoculante
4. População rizobiana nativa 5. FBN 6. Competição nodular
I. Santos, Carolina Etienne de Rosália e Silva, orientadora
II. Título

CDD 631.4

MARIA DE FÁTIMA DA SILVA

TAXA DE INÓCULO NA HABILIDADE COMPETITIVA DE RIZÓBIOS E EFICIÊNCIA NA FIXAÇÃO DO N₂ EM FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência do Solo.

Tese aprovada em 28 de fevereiro de 2011 pela banca examinadora:

ORIENTADORA

Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos

EXAMINADORES:

Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas

Dr^a. Lindete Míria Vieira Martins

Dr^a. Márcia do Vale Barreto Figueiredo

Dr^a. Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo e que sempre ilumina os caminhos que percorremos.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de realizar este curso e financiamento deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

A Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, pela concessão da área e do solo para realização deste trabalho.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Agrobiologia pela concessão das estirpes utilizadas neste trabalho.

A minha orientadora, Dr^a. Carolina Etienne de Rosália Silva Santos, pela sua orientação em todas as etapas deste trabalho e principalmente pela sua simplicidade e serenidade.

As Co-orientadoras: Dr^a. Márcia do Vale Barreto Figueiredo e Dr^a. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra, pelas sugestões e esclarecimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

A Professora Dr^a. Lindete Míria Vieira Martins pela atenção e orientação informal.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Maria do Socorro Santana e Josué Camilo, pelo apoio e atenção.

Aos amigos de turma: Edvan, Maria Daniela, Michelangelo e Tâmara, pelo companheirismo e excelente convivência.

Aos amigos e companheiros desta jornada, Alexandra Oliveira, Antônio César, Antonio Granja, Cláudio José, Eliabe Roberto, Ernandes Medeiros, Luciana Remigio, Rafael Freitas e Rosemberg Vasconcelos, suas contribuições foram imprescindíveis para conclusão deste trabalho.

Aos amigos especiais, Clayton A. de Sousa, Renata S. L. Araújo, Roseângela Leão, Socorro Santana e Tâmara Cláudia, pelo grande apoio, atenção e por suavizar essa conquista.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Se não houver frutos, valeu a beleza das flores;
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas;
Se não houver folhas, valeu a intenção da semente.

Henfil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de nódulos (NN) por planta de feijão-caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR3267 presentes na semente inoculada.....	24
Figura 2: Biomassa seca de nódulos (MSN) por planta de feijão-caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR3267 presentes na semente inoculada.....	28
Figura 3: Biomassa seca da parte aérea (MSPA) por planta de feijão-caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR3267 presentes na semente inoculada.....	30
Figura 4: Eficiência relativa (efrC) por planta de feijão-caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR3267 presentes na semente inoculada.....	32
Figura 5: Acúmulo de N da parte aérea (ANPA) por planta de feijão-caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR3267 presentes na semente inoculada.....	33
Figura 6: Acúmulo de P na parte aérea (APPA) de plantas de feijão-caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR3267 presentes na semente inoculada.....	35
Figura 7. Dendrograma de similaridade, construído com base nas características fenotípicas dos 23 isolados de rizóbios nativos e das estirpes inoculantes BR 3267 (<i>Bradyrhizobium</i> sp.), BR 3262 (<i>Bradyrhizobium elkanii</i>), BR 3460 (<i>Rhizobium</i> sp.), BR 3461 (<i>Burkholderia nodosa</i>) e SEMIA 4080 (<i>Rhizobium tropici</i>).....	37

Figura 8: Número de nódulos em plantas de feijão-caupi cv. BRS Pujante cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 9 isolados de rizóbios de solo da Zona da Mata de Pernambuco, uma estirpe recomendada e ausência de inoculação.....	38
Figura 9: Biomassa seca de nódulos em plantas de feijão-caupi cv. BRS Pujante cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 9 isolados de rizóbios de solo da Zona da Mata de Pernambuco, uma estirpe recomendada e ausência de inoculação.....	39
Figura 10: Biomassa seca da parte aérea em plantas de feijão-caupi cv. BRS Pujante cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 9 isolados de rizóbios de solo da Zona da Mata de Pernambuco, uma estirpe recomendada e ausência de inoculação.....	40
Figura 11: Acúmulo de N na parte aérea em plantas de feijão-caupi cv. BRS Pujante cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 9 isolados de rizóbios de solo da Zona da Mata de Pernambuco, uma estirpe recomendada e ausência de inoculação.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características químicas, físicas e microbiológicas do Espodossolo Ferrocárbico Órtico.....	17
Tabela 2. Coeficientes de correlação e probabilidades entre as variáveis número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (MSN), biomassa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa ao controle (efrC), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA) e biomassa seca da raiz (MSR).....	25
Tabela 3. Coeficientes de correlação e probabilidades entre as variáveis número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (MSN), biomassa seca da parte aérea (MSPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA).....	40

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A. Resumo da análise de variância para as variáveis utilizadas na construção dos modelos de regressão: número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (MSN), biomassa seca da parte aérea (MSPA), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA) e biomassa seca da raiz (MSR).....	62
Apêndice B. Resumo da análise de variância das variáveis analisadas no experimento em substrato estéril: número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (MSN), biomassa seca da parte aérea (MSPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA).....	62

SILVA, Maria de Fátima da; Doutora em Agronomia/Ciência do Solo; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Fevereiro de 2011; Taxa de inóculo na habilidade competitiva de rizóbios e eficiência na fixação do N₂ em feijão-caupi (*vigna unguiculata* (L.) Walp.); Orientadora: Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos; Conselheiras: Márcia do Vale Barreto Figueiredo, Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra.

RESUMO

O feijão - caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é cultivado, no Brasil, nas mais diferentes condições edafoclimáticas. Devido a sua boa adaptabilidade às condições tropicais e por ser uma cultura de alto valor sócio-econômico, tem um papel importante para a capitalização de pequenos agricultores na região Nordeste. Por ser uma leguminosa, o feijão-caupi pode adquirir N em quantidades adequadas para suprir suas necessidades através do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) quando associado com bactérias específicas e efetivas. Entretanto a prática da inoculação não é muito utilizada devido ao baixo aporte tecnológico nas aéreas de cultivo e respostas inconsistentes com os inoculantes utilizados. O objetivo do presente estudo foi de avaliar o efeito da aplicação de diferentes taxas de inóculo, habilidade competitiva e eficiência para a FBN da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 na cultura do feijão-caupi em casa de vegetação. No primeiro experimento, conduzido em vasos com solo foram usados sete tratamentos, compreendendo cinco concentrações de células da estirpe BR 3267 (células/mL de inoculante), um tratamento sem inoculação e com adição de fertilizante nitrogenado, e um controle sem inoculação e sem adição de fertilizante nitrogenado. O segundo experimento constituiu de 17 tratamentos, compostos por 15 estirpes nativas, a estirpe BR 3267 e um tratamento sem inoculação e sem adição de nitrogênio, em vasos de Leonard com substrato estéril. A aplicação da dose mínima recomendada incrementou número e biomassa seca dos nódulos, biomassa seca da parte aérea e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Em substrato estéril a população rizobiana nativa não foi mais eficiente quando comparada à estirpe BR 3267. A estirpe BR 3267 foi mais competitiva e eficiência em relação à população rizobiana nativa. A cultivar BRS Pujante foi mais beneficiada pela FBN quando inoculada com a estirpe BR 3267, proporcionalmente à taxa de inóculo.

Palavras chaves: Eficiência simbiótica, inoculante, rizóbio nativo, feijão caupi.

SILVA, Maria de Fátima da; Doutora em Agronomia/Ciência do Solo; Universidade Federal Rural de Pernambuco; February/2011; Inoculum rate in competitiveness and effective ability for nitrogen fixation of rhizobia on Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.); Advisers: Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, Márcia do Vale Barreto Figueiredo, Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra.

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in Brazil is grown in the most different climatic conditions. By the adaptability to tropical conditions and recognized as a culture of high socioeconomic value, this legume has an important role for the capitalization of small farmers in the Northeast region. Cowpea may obtain adequate quantities of N by the process of biological nitrogen fixation (FBN) when associated with specific and effective bacteria. However, in Brazil the practice of inoculation is not widely processed due to the low agricultural technology and inconsistent responses using the seed inoculation process. The main goal of this study was to evaluate the effect of different rates of inoculum on effectivity and competitiveness of *Bradyrhizobium* (strain BR 3267) on cowpea grown in greenhouse conditions. The first experiment was carried out with five different concentration of strain BR 3267 (rhizobia cells/mL of inoculant), N mineral fertilizer treatment without inoculation, and a control without inoculation and N mineral fertilizer. The second experiment conducted in Leonard jars with inoculant produced with BR 3267 strain, 15 native rhizobia (isolated from the used soil), and a control treatment without inoculation and no N mineral fertilizer applied. The application of the low recommended rate increased number and dry biomass of nodules, shoot dry biomass and shoot N total uptake. In the Leonard jars experiment the rhizobia strain BR 3267 was more effective on nitrogen fixation and showed greater competitiveness compared to the native rhizobia isolates. The BRS Pujante cultivar was benefit by the FBN process when inoculated with strain BR 3267 proportional to the inoculum rate.

Keywords: Symbiotic Efficiency, native rhizobia population, cowpea bean

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE APÊNDICES.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	3
Material e métodos.....	16
Resultados e discussões.....	24
Conclusões.....	43
Referências.....	44
Apêndices.....	62

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), cultura que tem como centro de origem o continente africano, é uma das fontes alimentares mais importantes e estratégicas para as regiões tropicais e subtropicais do mundo (FREIRE FILHO et al., 2005). Seus grãos possuem altos teores de proteínas, carboidratos, fibras, minerais, e reduzido conteúdo lipídico (FROTA et al., 2008).

É uma planta cultivada em todo o Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, pela sua alta rusticidade, boa adaptabilidade às diversas condições edafoclimáticas e capacidade de se desenvolver em solo de baixa fertilidade (OLIVEIRA & CARVALHO, 1988). Estas características tornam o feijão caupi uma importante fonte de alimento e renda para os pequenos agricultores dessas regiões, onde são predominantes os cultivos em pequenas propriedades com baixos recursos tecnológicos (FILGUEIRAS et al., 2009).

Atualmente estimam-se um déficit de 81 e 68 mil toneladas de grãos de feijão-caupi na região Nordeste e Norte, respectivamente (FREIRE FILHO et al., 2007). Esses dados denotam a ausência de maiores investimentos relacionados à aplicação de tecnologias para explorar essa leguminosa e, conseqüentemente aumentar sua produtividade (FILGUEIRAS et al., 2009).

As pesquisas com feijão-caupi direcionadas para as regiões Norte e Nordeste têm se voltado para o desenvolvimento de cultivares produtivas, resistentes a doenças, condições adversas de clima e fertilidade do solo, tolerância a pragas e com qualidade nutricional mais adequada ao hábito alimentar (VILARINHO & FREIRE FILHO, 2007), não levando em consideração a característica simbiótica da cultura.

No Brasil, a prática da inoculação com bactérias, conhecidas como rizóbios, capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cultura do feijão-caupi não é muito utilizada, devido os solos conterem uma elevada população de rizóbios nativos capazes de nodular a cultura (LEITE et al., 2009; SOARES et al., 2006; ZILLI et al., 2004), gerando respostas inconsistentes com relação a esta prática de manejo. Associado a isto, o feijão-caupi é cultivado em condições de subsistência com baixo aporte tecnológico, além de não existir resultados satisfatórios dos inoculantes disponíveis no mercado até alguns anos atrás (ZILLI et al., 2007).

Um bom inoculante requer o uso de estirpes de rizóbios altamente eficientes na fixação do N₂ e com alta habilidade competitiva para formação dos nódulos. Estirpes eficientes nem sempre são melhores competidoras em relação à população nativa, ocasionando falha na inoculação (HAFEEZ et al., 2001).

De acordo com Brockwell et al. (1995), a melhor maneira de se estabelecer uma estirpe de rizóbio na presença de população rizobiana nativa é através da aplicação de uma taxa elevada de inóculo eficaz, colocando-o perto dos sítios de nodulação da planta, no caso a raiz.

Neste contexto, a introdução do uso de práticas culturais adequadas para o sistema agrícola da região Nordeste, como a utilização de inoculantes com quantidades adequadas de rizóbios competitivos e eficientes para o feijão-caupi poderá contribuir para aumentar a produtividade através da otimização da FBN, o que diminui os custos com fertilizantes nitrogenados e proporciona um manejo ecológico adequado, colaborando com a preservação dos recursos ambientais, visto que a produção de fertilizante nitrogenado consome grande quantidade de combustíveis fósseis.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação de diferentes taxas de inóculo, a habilidade competitiva e eficiência da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 para a FBN na cultura do feijão-caupi em solo da Zona da mata de Pernambuco.

REVISÃO DE LITERATURA

Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) trata-se de uma planta originária da África, é uma das fontes alimentares mais importantes e estratégicas para as regiões tropicais e subtropicais do mundo (FREIRE FILHO et al., 2005). Seus grãos possuem altos teores de proteínas, carboidratos, fibras e minerais, e reduzido conteúdo lipídico (FROTA et al., 2008).

Esta espécie de feijão é cultivada em todo o Brasil, principalmente nas Regiões Norte e Nordeste, devido a sua alta rusticidade, boa adaptabilidade às diversas condições edafoclimáticas e capacidade de se desenvolver em solo de baixa fertilidade (OLIVEIRA & CARVALHO, 1988).

Considerada uma importante fonte de alimento e renda para os pequenos agricultores das Regiões Norte e Nordeste, nas quais predomina o cultivo em pequenas propriedades com baixos recursos tecnológicos (FILGUEIRAS et al., 2009), nos últimos anos a região Centro Oeste vem assumindo posição de destaque, onde o feijão-caupi é cultivado na entressafra da cultura da soja, em áreas de grandes agricultores, que utilizam as mesmas práticas da cultura anterior (FILGUEIRAS et al., 2009).

A produção brasileira de feijão (*Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*) na safra 2009/2010 atingiu 3.322 mil toneladas de grãos, para uma área de 3.608 mil ha (CONAB, 2010). Na safra de 2009/2010, a região Nordeste apresentou uma área plantada de 1.843 mil ha, tendo produzido 698 mil toneladas de grãos, com uma produtividade média de 379 kg ha⁻¹, para a região Norte a produção de grãos foi de 82 mil toneladas, com uma área plantada de 143 mil ha e com produtividade de 573 kg ha⁻¹ (CONAB, 2010).

Estima-se um déficit de 81 e 68 mil toneladas de grãos de feijão-caupi na região Nordeste e Norte, respectivamente (FREIRE FILHO et al., 2007), o que denota a ausência de maiores investimentos relacionados à aplicação de tecnologias para explorar essa leguminosa e, conseqüentemente aumentar sua produtividade (FILGUEIRAS et al., 2009).

Devido a sua boa adaptabilidade às condições tropicais e por se tratar de uma cultura de grande valor alimentar, o feijão-caupi constitui-se uma cultura de grande potencial estratégico (FREIRE FILHO et al., 2007)

A Importância da Fixação Biológica de Nitrogênio para as leguminosas

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) é o processo pelo qual o nitrogênio atmosférico (N₂), indisponível, para a maioria dos organismos, se torna fisiologicamente e metabolicamente disponível sob a forma de amônia (NH₃). Apenas um pequeno número de microrganismos na natureza, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, é capaz de reduzir N₂ a NH₃, através do complexo enzimático da nitrogenase.



Dentre os processos de FBN existentes, destaca-se a associação simbiótica entre as bactérias que vivem no solo, chamadas de rizóbios e plantas pertencentes à família das leguminosas. A simbiose entre leguminosas e rizóbios é a fonte mais importante de nitrogênio (N) fixado biologicamente em sistemas agrícolas (GRAHAM & VANCE, 2003). Esta associação destaca-se das demais devido à sua importância econômica e pela maior eficiência do processo de fixação, decorrente de uma parceria mais evoluída entre macro e microssimbionte (MOREIRA & SIQUEIRA, 2008).

Os microssimbiontes são os rizóbios, bactérias Gram-negativas, aeróbicas, pertencentes às classes α e β proteobactérias, que se associam com plantas das famílias *Leguminosae* e *Ulmaceae* (*Parasponia* spp.). Quando estas bactérias se associam com as leguminosas, formam estruturas especializadas, denominadas de nódulos, geralmente localizados nas raízes. A formação dos nódulos é um processo complexo que ocorre em várias etapas e envolve mudanças morfofisiológicas, tanto na célula hospedeira (plantas), como na bactéria. As mudanças na bactéria visam o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e poder redutor, necessários para o processo da FBN, enquanto que as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pela bactéria (HUNGRIA & CAMPO, 2005).

Os macrossimbiontes são espécies da família botânica *Leguminosae* que está dividida em três subfamílias, *Caesalpinioideae*, com 169 gêneros e 2.223 espécies, *Mimosoideae*, com 77 gêneros e 3.315 espécies, e *Papilionoideae*, com 474 gêneros e 13.890 espécies (DOYLE & LUCKOW, 2003). As leguminosas apresentam uma ampla distribuição geográfica, estão

presentes em diferentes ecossistemas, como florestas tropicais, subtropicais e temperadas, desertos, montanhas e ambientes inundados (DOYLE & LUCKOW, 2003; SPRENT, 2007), possuem diferentes hábitos de crescimento, sendo encontradas espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas.

Estima-se que 44 a 66 milhões de toneladas métricas de N₂ são fixados anualmente por leguminosas de importância agrícola, e de 3 a 5 milhões de toneladas métricas fixados por leguminosas em ecossistemas naturais, fornecendo mais da metade de todo o N usado na agricultura (GRAHAM & VANCE, 2003). Quando comparada ao uso de fertilizantes nitrogenados, a fixação biológica apresenta vantagens como baixo custo, ausência de problemas ambientais e abundância do nitrogênio na atmosfera.

No contexto ambiental, além de reduzir o uso de fertilizantes fabricados à base da queima de combustíveis fósseis, a FBN ao permitir o crescimento e desenvolvimento de leguminosas em diversidade de ambientes, contribui para a capacidade dessas espécies seqüestrar carbono (C), visto como um meio de compensar os incrementos nos níveis de CO₂ na atmosfera, decorrentes de atividades antrópicas (GRAHAM & VANCE, 2003). Para se ter uma idéia, Resh et al. (2002) constataram que solos cultivados com leguminosas arbóreas, fixadoras de nitrogênio, tem seqüestrado 0,11 kg m² ano⁻¹ de carbono orgânico, enquanto que nenhuma mudança foi verificada em *Eucalyptus* spp.

Lovato et al. (2004), relataram que a inclusão de leguminosas herbáceas em sistemas de culturas contribuíram para uma maior adição de C e N ao solo, refletindo em maior acúmulo de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) do solo quando comparados ao sistemas de culturas formados exclusivamente por gramíneas e concluíram que sistemas de culturas com leguminosas, pela alta adição de C fotossintetizado e de N fixado simbioticamente, é uma boa alternativa para recuperar os estoques de COT e NT do solo e aumentar o rendimento das culturas.

A utilização das leguminosas para revegetação de áreas degradadas tem sido considerada uma estratégia eficiente de recuperação. Essa estratégia de revegetação baseia-se na elevada capacidade de adaptação e de produção de biomassa da maioria das leguminosas fixadoras de N, como também, sistemas radiculares mais profundos e ramificados permitindo uma maior reciclagem de nutrientes, além de priorizar o aporte de C e N ao solo (FRANCO & CAMPELLO, 2005; FRANCO & FARIA, 1997).

A presença das leguminosas em diferentes ecossistemas com baixa disponibilidade de N é atribuída, em grande parte, pela sua capacidade de fixar N em simbiose com rizóbios (GRAHAM & VANCE, 2003; SPRENT, 1994). Outra possibilidade de explicar essa grande diversidade de colonização em diferentes ecossistemas é a apresentada por Doyle & Luckow (2003) que relatam que independente de nodular ou não, as leguminosas têm uma alta demanda de nitrogênio devido a sua alta taxa fotossintética e produção de compostos de defesa, sugerindo que a simbiose rizóbio-leguminosa tenha evoluído para alimentar essa demanda de nitrogênio de forma mais eficaz.

Dentro da família leguminosa, a nodulação ocorre na maioria das espécies de *Papilionoideae* (96%) e *Mimosoideae* (90%), mas somente em 24% das espécies de *Caesalpinoideae* até agora analisadas. Entretanto, estima-se que a capacidade de nodular com rizóbio é desconhecida em cerca de 75% das espécies de leguminosas de todo o mundo, assim como seus microssimbiontes (MOREIRA, 2008). Na subfamília *Papilionoideae* estão contidas a maioria das espécies produtoras de grãos e de forragem de grande importância agronômica.

A grande quantidade e diversidade de leguminosas nodulantes colocam estas plantas como estratégicas no que diz respeito à sustentabilidade ecológica, econômica e social, principalmente no Brasil. Do ponto de vista ecológico, destaca-se sua ampla ocorrência e adaptação nos diversos biomas brasileiros. As leguminosas se prestam a uma gama de utilizações, como produção de grãos, frutos, forragem, carvão, celulose, madeira, adubação verde, arborização e regeneração de áreas degradadas (FRANCO & CAMPELLO, 2005).

Fatores que influenciam a interação rizóbio-leguminosa em condições tropicais

Uma associação rizóbio-leguminosa eficiente, na qual a necessidade da planta por nitrogênio seja totalmente suprida pela FBN, é o alvo de muitas pesquisas desenvolvidas no mundo, principalmente nos trópicos (HOWIESON & BALLARD, 2004; HUNGRIA & VARGAS, 2000). Vale salientar que o foco dessas pesquisas está em leguminosas cultivadas, principalmente as

produtoras de grãos. Sabe-se, porém, que diversos fatores bióticos e abióticos limitam o estabelecimento de uma simbiose eficiente, fatores estes relacionados às condições edafo-climáticas de um determinado local, às variabilidades genéticas das cultivares de leguminosa e das estirpes de rizóbios.

Em condições de clima tropical e subtropical, os principais fatores abióticos que afetam o potencial da FBN são: acidez do solo, salinidade, altas temperaturas no solo e baixa precipitação pluviométrica (CHALK et al., 2010; HUNGRIA & VARGAS, 2000; ZAHRAN, 1999). Salinidade e acidez do solo são geralmente acompanhadas por toxicidade mineral (toxicidade de íons específicos), deficiência de nutrientes e desordens nutricionais nas plantas (MACHANDA & GARG, 2008; ZAHRAN, 1999).

Em ambientes tropicais e subtropicais é comum encontrar solos com problemas de acidez e toxicidade de alumínio e manganês que são fatores que podem afetar negativamente a simbiose rizóbio-leguminosa. Hungria & Vargas (2000) comentam que o microsimbionte é usualmente mais sensível ao pH, e sua tolerância depende da habilidade de manter um pH intracelular entre 7,2 e 7,5, independente do pH do meio externo.

Watkin et al. (2003) relatam aumento de potássio e fósforo no citoplasma de células de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, estando este aumento relacionado à manutenção do pH intracelular e tolerância adaptativa em condições de acidez. Diferenças na composição dos lipopolissacarídeos (LPS), extrusão, exclusão (CHEN et al., 1993a; CHEN et al., 1993b) e síntese e acumulação de poliaminas (FUJIHARA, 2009; FUJIHARA & YONEYAMA, 1993) têm sido associado com o crescimento das células rizobianas em pH ácido.

As espécies de plantas tolerantes a solos ácidos exsudam ácidos orgânicos e outros ligantes que formam quelatos estáveis com Al e reduzem a atividade química e toxicidade desse elemento (KOCHIAN et al., 2004). Cultivares de soja tolerantes acumulam mais ácido cítrico do que cultivares sensíveis, estando este acúmulo diretamente envolvido na complexação e desintoxicação do Al (MENOSSO et al., 2001).

A deficiência hídrica e salinidade do solo ocasionam redução da produção de biomassa, fotossíntese, nodulação, atividade da nitrogenase e conteúdos de N na parte aérea (MACHANDA & GARG, 2008; ZAHRAN, 1999).

As leguminosas e a simbiose rizóbio-leguminosa são mais sensíveis aos sais e estresse osmótico que os rizóbios (FLOWERS et al., 2010; ZAHRAN, 1999). O estresse salino reduz a nodulação em leguminosas pela inibição dos eventos simbióticos iniciais (RUMJANEK et al., 2005; ZAHRAN, 1999).

Muitas espécies de bactérias são adaptadas às condições salinas através da acumulação intracelular de solutos orgânicos de baixo peso molecular (CSONKA & HANSON, 1991).

Zahran (2001) relata como importante resposta da célula de rizóbio à salinidade, a alteração da síntese de exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) celular, que tem sido observada tanto em leguminosas cultivadas, como arbóreas (ZAHRAN, 1992; ZAHRAN et al., 1994).

Um dos fatores mais limitantes em solos tropicais são as baixas concentrações de fósforo disponível às plantas, o que compromete a eficiência da simbiose rizóbio-leguminosa. As leguminosas utilizam diferentes mecanismos para adquirir fósforo em solos com deficiência desse elemento, entre eles, acidificação da rizosfera, exsudação de fosfatase ácida, mudança na arquitetura da raiz e simbiose com micorrizas (KOCHIAN et al., 2004; VANCE et al., 2003).

Almeida et al. (2000) relatam que leguminosas em simbiose aumentam os níveis de asparagina na raiz e nos nódulos como mecanismo que regula o suprimento de P em condições de deficiência desse elemento. Rizóbios em simbiose com leguminosas podem fornecer P para a planta através da exsudação de ácido orgânico que solubiliza fosfatos, favorecendo o crescimento da planta e a fixação do N₂ (ALIKHANI et al., 2006; CHAGAS JUNIOR et al., 2010).

De acordo com Moreira e Siqueira (2008), com relação à espécie hospedeira, há uma ampla variação do potencial de FBN, a qual se justifica principalmente pelo genótipo e idade da planta.

Franco et al (2002) e Venkateswarlu et al. (1991) verificaram que genótipos de crescimento indeterminado, trepadores e de ciclo longo fixavam mais nitrogênio que os de hábito determinado, de porte arbustivo e de ciclo curto.

Associações simbióticas estudadas entre leguminosas e rizóbios nativos na região semi-árida do Nordeste do Brasil têm mostrado a elevada capacidade

destes rizóbios de fixar N₂ em condições edafoclimáticas nas quais plantas e estirpes exóticas não suportariam (FERNANDES et al., 2003; MARTINS et al., 2003; SANTOS et al., 2005).

Segundo Chalk et al. (2010), os rizóbios são mais vulneráveis ao estresse quando em vida livre que em simbiose, isso porque em simbiose com a leguminosa, a planta produz um nicho específico (nódulo), no qual a bactéria fica protegida das condições ambientais. Nesse contexto, fica evidente a necessidade do melhoramento de plantas para adaptação às condições adversas do ambiente e a exploração de populações rizobianas nativas, adaptadas às condições ambientais e com capacidade de formar simbiose com essas plantas adaptadas. No momento em que se identifica a existência de genótipos de plantas e de bactérias que variam de sensíveis a tolerantes é possível encontrar diferentes combinações rizóbio-leguminosa, de modo a selecionar as simbioses mais eficientes.

Em condições de estresse ambiental, a associação simbiótica com rizóbios é uma desvantagem para as leguminosas quando comparadas as demais, uma vez que a simbiose representa um direcionamento de fotoassimilados para o rizóbio, que poderiam ser utilizados para o desenvolvimento da planta. Dessa maneira, fica evidente que a simbiose rizóbio-leguminosa é válida apenas em ambientes com deficiência de nitrogênio no solo. Sendo assim, a vantagem competitiva da leguminosa em simbiose com rizóbios pode aumentar ou diminuir dependendo das interações entre as mudanças de condições ambientais, a demanda de nitrogênio pela planta e a quantidade de nitrogênio suprida pela simbiose (HARTWIG, 1998).

Rizóbios: Nichos ecológicos, diversidade e competitividade de rizóbios nos solos tropicais

Os rizóbios têm como nichos ecológicos: o solo, a rizosfera de diversas plantas e nódulos em raízes de plantas leguminosas; existindo no solo e na rizosfera como bactérias saprofíticas e nas plantas leguminosas como endofíticas simbióticas.

Na fase saprofítica, vivendo em vida livre no solo e na rizosfera de diversas plantas, os rizóbios são heterotróficos obrigatórios, aeróbicos e podem

assimilar uma ampla faixa de compostos de carbono e de nitrogênio. Como membros da microbiota do solo estão sujeitos a competir com outros microorganismos por recursos limitados e com antagonistas, como fungos, bactérias e bacteriófagos, além de protozoários predadores de nódulos (BOTTOMLEY, 1992; KAHINDI et al., 1997; TEIXEIRA et al., 1996).

Alguns rizóbios são endofíticos associativos de plantas não leguminosas, geralmente, gramíneas e são encontrados nas raízes, caules e folhas, colonizando a planta via espaços intercelulares e sistema vascular.

Espécies de rizóbios, como *Azorhizobium caulinodans*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Rhizobium* NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, podem se associar benéficamente com plantas de sorgo, arroz, trigo, milho e batata doce. Atuam como bactérias promotoras de crescimento, através da liberação de auxinas, citocininas, ácido abscísico e giberelinas, atuam também como supressoras de patógenos e eleva a absorção de fósforo pela planta (CHI et al. 2005; DAKORA, 2003; MATIRU & DAKORA, 2004; REITER et. al., 2003; SHARMA et al , 2005).

Na fase endofítica simbiótica, o principal nicho dos rizóbios são os nódulos localizados no córtex das raízes. Entretanto, em algumas espécies de rizóbios, principalmente da tribo *Aeschynomeneae*, estes nódulos ocorrem também nos caules, considerado um nicho inespecífico. A nodulação no caule ocorre como estratégia de adaptação de leguminosas a ambientes inundados.

Algumas espécies do gênero *Aeschynomene* apresentam nódulos nos caules e nas raízes com a presença de *Bradyrhizobium* fotossintéticos e esses, quando nodulando no caule produzem bacterioclorofila e carotenóides (VAN BERKUM et al., 1995), tornando a simbiose mais eficiente devido a pouca demanda de carboidratos originados da planta (GIRAUD et al., 2000; MOLOUBA et al., 1999). Esses rizóbios fazem parte de um grupo de *Bradyrhizobium* que diverge dos grupos de *B. japonicum* e *B. elkanni*, denominados de *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomeneae*) (FLEISCHMAN & KREMER, 1998; MOLOUBA et al., 1999).

Rizóbios em solos compreendem uma parcela relativamente pequena da comunidade bacteriana, de aproximadamente 10^9 bactérias por grama de solo, variando entre 0 a 10^6 rizóbios por grama de solo, podendo ser maior na rizosfera de plantas (HIRSCH, 1996). A distribuição, densidade e diversidade de espécies de rizóbios nos solos variam com as condições ambientais,

características físicas e químicas do solo e principalmente com a presença de leguminosas hospedeiras.

Rizóbios são mais diversos nos centros de origem e diversificação das leguminosas, sugerindo que os rizóbios evoluíram com suas hospedeiras (MARTINEZ-ROMERO & CABALLERO-MELLADO, 1996) ou que ocorre constante seleção da planta hospedeira por rizóbios que possuem uma grande capacidade para mudanças genéticas ou aquisição de genes simbióticos (MARTINEZ-ROMERO, 2009). Assim, leguminosas exibem melhor habilidade de nodular em solos dos seus centros de diversidade do que em solos aos quais foram introduzidas (BALA et al., 2003).

Em solos brasileiros o gênero *Bradyrhizobium* é o predominante entre os rizóbios de nódulos coletados de espécies florestais, forrageiras e de adubação verde. Estirpes de *Bradyrhizobium* foram isoladas em 100% das espécies estudadas de *Caesalpinioideae* e em 80 e 84% das espécies estudadas de *Papilionoideae* florestais e *Mimosoideae*, respectivamente (MOREIRA 2008).

Entretanto quando se refere à diversidade de interações entre rizóbios e espécies leguminosas cultivadas a diversidade de rizóbios pode variar dependendo de diversos fatores. Wang et al. (2009) demonstraram que a biogeografia dos rizóbios é resultado das interações entre leguminosa hospedeira, genoma bacteriano e ambiente.

A diversidade e quantidade de estirpes rizobianas capazes de nodular com uma leguminosa hospedeira pode ser efetivamente reduzida através do uso de espécies ou cultivares de leguminosas (plantas-iscas) que exibam alta especificidade simbiótica (MCINNES et al., 2004). As espécies de siratro (*Macroptilium atropurpureum*), caupi (*Vigna unguiculata*), guandu (*Cajanus cajan*) e leucena (*Leucena leucocephala*) são capazes de nodular com diversos gêneros e espécies de rizóbios e têm sido amplamente usadas para avaliar a diversidade de rizóbios em solos (COUTINHO et al., 1999; FERNANDES et al., 2003; FLORENTINO et al., 2009; JESUS et al., 2005).

Santos et al. (2007) encontraram maior diversidade de rizóbios em solos com pH neutro da região Semiárida quando comparados a solos ácidos da Zona da Mata de Pernambuco. Bala et al. (2003) relatam que solos ácidos exercem pressão seletiva com estirpes tolerantes, dominando a população rizobiana e que o pH do solo foi o indicador ecológico determinante da

diversidade genética de rizóbios em solos tropicais quando associados a leguminosas arbóreas.

Coutinho et al.(1999) avaliando a diversidade de rizóbios em solos do Cerrado observaram redução da diversidade de rizóbios na conversão de pasto (*Brachiaria decumbens*) para cultivo de soja, sugerindo que a introdução de leguminosa reduz o número de taxa de rizóbios, embora favoreça o aumento de indivíduos de um taxa específico.

Estudos da variabilidade genética de rizóbios nativos envolvendo a procura e manipulação de genótipos com elevada capacidade de fixar N e tolerantes aos diferentes estresses ambientais presentes em ecossistemas do Brasil tem revelado um elevado grau de diversidade e de adaptabilidade ecológica da população rizobiana nos solos (BARCELLOS et al., 2007; GRANGE & HUNGRIA, 2004; HUNGRIA et al., 2006; LEITE et al., 2009; LIMA et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

Bala et al. (2003) determinando os indicadores ecológicos da população rizobiana nativa em solos tropicais encontraram correlações entre a densidade de rizóbios com o pH, tamanho das partículas e com a capacidade de troca de cátions dos solos. Venkateswarlu et al. (1997) avaliando os fatores do solo e de cultivo que afetam a variabilidade na distribuição da população rizobiana nativa em 88 amostras de solos da Índia, correlacionaram a densidade da população rizobiana nativa com o carbono orgânico e com a ocorrência da leguminosa hospedeira.

Diversos autores relatam o aumento significativo na densidade de determinada população rizobiana no solo em resposta ao cultivo da leguminosa hospedeira específica, sugerindo que a presença de leguminosas favorece o estabelecimento de grupos de rizóbios específicos os quais adquirem características competitivas garantindo seu estabelecimento nestes locais (KIMITI & ODEE, 2010; MUSIYIWA et al., 2005; ZILLI et al., 2004). Segundo Rumjanek et al. (2005) a nodulação de diferentes espécies de leguminosas em solos tropicais é mais influenciada pelo hospedeiro do que pelos rizóbios existentes nesses solos.

A necessidade de inoculação de uma determinada leguminosa está inversamente relacionada com a densidade e competitividade da população rizobiana estabelecida em um determinado solo. Brockwell et al. (1995) consideram que a melhor maneira de se estabelecer uma estirpe de rizóbio na

presença de população rizobiana estabelecida é através da aplicação de uma taxa elevada de inóculo eficaz, colocando-o perto dos sítios nodulares.

Neste contexto, Krasova-Wade et al. (2006) demonstraram que a densidade e competitividade de uma população rizobiana nativa pode ser modificada por estirpes introduzidas através da aplicação de taxas de inóculo superiores à densidade da população rizobiana nativa.

Yates et al. (2008) sugerem que leguminosas apresentam um mecanismo de seletividade a favor de rizóbios eficazes na presença de uma população heterogênea e relatam que em trevos (*Trifolium* spp.), esse mecanismo de seletividade é dependente de uma alta densidade de estirpes eficazes, entretanto, este mecanismo é predominante, desde que, a quantidade de estirpes ineficazes seja inferiores a 10^5 células g^{-1} de solo.

Outro fator que interfere na habilidade competitiva de uma população rizobiana é a produção de toxinas por determinadas espécies de rizóbios. Yuhashi et al. (2000) estudando a habilidade competitiva para nodulação entre *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* em siratro (*Macroptilium atropurpureum*), concluíram que produção de toxinas por *B. elkanii* possibilita a esses ocuparem a maioria dos nódulos nesta leguminosa.

A alta competitividade das estirpes de rizóbios inoculadas é tão importante quanto a sua eficiência simbiótica (BALA & GILLER, 2006; TRIPLETT, 1990). Quando estirpes eficientes em fixar N_2 são competitivas para ocupação dos nódulos na presença de rizóbios nativos, a inoculação pode aumentar significativamente a produção da leguminosa (RAPOSEIRA et al., 2006). Contudo, quando rizóbios usados são mais competitivos e persistentes, a limitada mobilidade destes para os sítios de nodulação pode requerer que a inoculação seja mais perto possível destes sítios, para ocupar a maioria dos nódulos (ALTHABEGOITI et al., 2008; LOPEZ-GARCIA et al., 2002).

De maneira geral, um bom inoculante requer o uso de estirpes de rizóbios altamente eficientes na fixação do N_2 , com alta habilidade competitiva para formação dos nódulos (infectivas) e elevada competência saprofítica. Estirpes eficientes na fixação do N_2 e utilizadas como inoculantes nem sempre são melhores competidoras em relação à população nativa, ocasionando falha na inoculação (HAFEEZ et al., 2001). Como também, a competência saprofítica de rizóbios não está correlacionada com sua habilidade competitiva ou com sua eficiência na fixação do N_2 (DUODU et al., 2005).

Contudo, a dinâmica da população rizobiana nativa, em termos de número, competência saprofítica, diversidade, efetividade e habilidade competitiva, devem ser cuidadosamente avaliadas para que a introdução de estirpes dos inoculantes traga benefícios aos sistemas agrícolas de uma região (THIES et al., 1995).

Fixação Biológica de Nitrogênio em feijão-caupi

A cultura do feijão-caupi pode obter quantidades significativas de N através da FBN, quando em associação simbiótica com rizóbios. O feijão-caupi é geralmente nodulado eficientemente por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (MELLONI et al., 2006; PULE-MEULENBERG et al., 2010; ZILLI et al., 2004). No entanto, a presença de bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* nodulando a cultura em solos brasileiros tem sido relatada (FERNANDES et al., 2003; FLORENTINO et al., 2009; ; LEITE et al., 2009; SOARES et al., 2006).

Estimativas da contribuição da FBN em condições de campo são bastantes variáveis e quantidades de N fixado biologicamente em feijão-caupi encontra-se em torno de 25 Mg ha⁻¹ ano⁻¹ (HERRIDGE et al., 2008). Essa variabilidade pode ser atribuída aos níveis de N no solo e pela diferença de genótipos da planta e de rizóbios.

De maneira geral não se recomenda a aplicação de fertilizante nitrogenado na maioria dos sistemas de cultivo do feijão-caupi. Entretanto, Melo et al. (2005) recomendam a aplicação de 20 kg ha⁻¹ de N em área em que esta cultura for plantada pela primeira vez.

No Brasil, a prática da inoculação na cultura do feijão-caupi não é muito utilizada, devido os solos conterem uma elevada população de rizóbios nativos capazes de nodular a cultura, gerando respostas inconsistentes com relação a esta prática de manejo. Como também, por ser cultivada em condições de subsistência com baixo aporte tecnológico e pela falta de resultados satisfatórios dos inoculantes disponíveis no mercado até alguns anos atrás (ZILLI et al., 2007).

Vários autores relatam aumento de produtividade de grãos em mais de 30% devido à aplicação de inoculantes na cultura, sendo essas inoculações

capazes de substituir a adubação nitrogenada de 50-80 kg ha⁻¹ (ALMEIDA et al., 2010; MARTINS et al. 2003; ZILLI et al. 2009a).

Considerando a área cultivada no Brasil com feijão-caupi, a média de produtividade, teor de N nos grãos e os custos com fertilizantes nitrogenados, estima-se uma economia de US\$ 70 milhões em fertilizantes nitrogenados em decorrência da FBN (ZILLI et al., 2009b), evidenciando a importância da utilização de inoculantes como prática de manejo sustentável para a cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da habilidade competitiva e eficiência simbiótica da estirpe BR 3267 foi avaliada em dois experimentos.

O primeiro experimento visou avaliar o desenvolvimento do feijão caupi inoculado com diferentes concentrações de células da estirpe BR 3267, cultivado em um solo com elevada população rizobiana.

O segundo experimento verificou a diversidade e a eficiência na fixação do nitrogênio da população rizobiana presente no solo utilizado.

Experimento 1: Efeito da taxa de inóculo e eficiência na fixação do nitrogênio da estirpe BR 3267

Coleta e caracterização do solo

O solo utilizado no experimento foi proveniente da Estação Experimental de Itapirema (EEI), do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizada em Goiana, Zona da Mata de Pernambuco. De acordo com Ribeiro (1999), o solo está classificado como Espodossolo Ferrocárbico Órtico (textura arenosa).

A área de coleta possui histórico de cultivo de leguminosas, feijão-caupi e amendoim com utilização de inoculantes, mas no momento apresentava-se com um período de um ano de pousio. A mesma foi dividida em três subáreas, nas quais foram coletadas dez amostras simples para compor uma amostra composta, totalizando 3 amostras compostas. As amostras foram coletadas na profundidade de 0-20 cm.

A avaliação dos atributos químicos e físicos foi realizada segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1997). A população rizobiana nativa foi determinada através do método do número mais provável (NMP) conforme Andrade & Hamakawa (1994), utilizando-se como planta hospedeira a cultivar de feijão-caupi BRS Pujante. Os resultados das análises químicas, físicas e de NMP estão expressos na tabela 1.

Tabela 1. Características químicas, físicas e microbiológicas do Espodosolo Ferrocárbico Órtico

pH	H ⁺ +Al ³⁺	Al ³⁺	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	P	C. O.	N
água (1:2,5)	cmol _c dm ⁻³						mg dm ⁻³	g kg ⁻¹	
5,15	0,41	0,20	0,22	0,08	1,20	2,25	7,90	6,72	0,65
Camada	Classe textural	Granulometria			Densidades				
		Areia	Silte	Argila	Solo		Partícula		
		g kg ⁻¹			g cm ⁻³				
0-20 cm	Areia franca	852	25	123	1,38		2,59		
População rizobiana						2,21 x 10 ³ ufc.g de solo ⁻¹			

Cultivar de feijão-caupi

Foi utilizada a cultivar BRS Pujante lançada pela EMBRAPA-CPATSA em 2007 e indicada para o cultivo na região Nordeste, principalmente para o Estado de Pernambuco, pertencente ao grupo comercial marrom-claro (FREIRE-FILHO et al., 2007).

Estirpe inoculante

Foi utilizada a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. BR3267 (SEMIA 6462) proveniente da EMBRAPA-CNPAB, Rio de Janeiro, isolada da região semiárida do Estado de Pernambuco e recomendada pela Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) para produção de inoculante comercial para a cultura do feijão-caupi no Brasil (RUMJANEK et al., 2006).

Experimento em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agronomia, Área de Solos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no período de setembro a outubro de 2010.

O solo foi seco ao ar, destorroado e passado em peneira com malha de 4 mm de abertura, em seguida foram acondicionados 2 Kg em vasos plásticos. Três dias antes da semeadura foi realizada a adubação conforme a recomendação para a cultura (MELO et al., 2005) baseada em peso de solo. Todos os vasos receberam adubação fosfatada e potássica (40 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e de K₂O) utilizando como fontes superfosfato simples e cloreto de potássio,

respectivamente. Para os vasos que receberam o tratamento nitrogenado foram aplicados 20 kg ha⁻¹ de N, na forma de uréia.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com sete tratamentos e quatro repetições. Os sete tratamentos foram compostos por cinco concentrações de células da estirpe BR 3267 por grama de inoculante, mais um sem inoculação e com adição de fertilizante nitrogenado, e outro sem inoculação e sem adição de fertilizante nitrogenado.

Inoculação

A estirpe BR3267 foi cultivada em meio líquido à base de extrato de levedura e manitol (YEM) de acordo Vincent (1970), composto, em g L⁻¹, por: Manitol, 10; K₂HPO₄, 0,05; MgSO₄, 0,02; NaCl, 0,01; extrato de levedura, 0,5; com pH ajustado para 6,8 em erlenmeyers de 125mL com 25 mL de meio YME colocados em agitador rotatório a 150 rpm, a uma temperatura de 30°C por 144 horas.

Os inoculantes foram produzidos usando como veículo turfa esterilizada na proporção de 1:1 (turfa: cultura). A utilização da cultura correspondeu à fase de crescimento log da bactéria, obtendo-se uma concentração em torno de 10¹¹ células viáveis mL⁻¹, determinada por transmitância em comprimento de onda de 540 nm (URENHA et al., 1994). Foram feitas quatro diluições sucessivas desta concentração de células para a obtenção das demais concentrações do inóculo.

As sementes de feijão foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, seguidas de 9 lavagens sucessivas com água deionizada estéril e inoculadas na proporção de 1 g do inoculante para 250 g de sementes, utilizando-se uma solução estéril de goma arábica a 40% para o preparo das pastas de inoculantes.

Semeadura

A semeadura da cultivar BRS Pujante foi realizada utilizando-se quatro sementes por vaso, com posterior desbaste no quarto dia após a emergência, mantendo-se duas plantas por vaso. As regas foram realizadas diariamente e a umidade foi mantida a 80 % da capacidade de pote.

No momento da semeadura foi determinada a concentração de células de rizóbios por grama de Inoculante, segundo a técnica de diluição em placas (MAPA, 2010), obtendo-se concentrações de $8,87 \times 10^{10}$ a $8,87 \times 10^7$ células g de inoculante⁻¹, correspondendo a concentrações de $6,65 \times 10^7$ a $6,65 \times 10^3$ células de rizóbios semente⁻¹ (MAPA, 2009).

Coletas das plantas para avaliação da FBN

As plantas foram coletadas aos 35 dias após a semeadura para avaliações do número (NN) e biomassa seca de nódulos (MSN), da biomassa seca da raiz (MSR) e parte aérea (MSPA), da eficiência relativa (efrC) e do acúmulo de nitrogênio (ANPA) e de fósforo na parte aérea (APPA).

As raízes coletadas de cada tratamento foram separadas da parte aérea, lavadas em água corrente, os nódulos foram destacados, contados e armazenados em recipiente de plástico contendo sílica gel e após 7 dias foram pesados para obtenção da biomassa seca de nódulos .

As biomassas secas da raiz e da parte aérea foram determinadas após secagem em estufa a 65°C por 72 horas, em seguida foi moída para a determinação do teor de P e do N-total. O teor de P na parte aérea foi determinado pelo método colorimétrico com amarelo de vanadato (EMBRAPA, 1999) e o N-total da parte aérea foi determinado pelo método semi-micro Kjeldhal, de acordo com Bezerra Neto & Barreto (2004).

O P e N acumulados na parte aérea foram calculados através da multiplicação da biomassa seca na parte aérea (g) pelo teor de P e de N-total, respectivamente.

Calculou-se a eficiência de cada taxa de inóculo em relação à produção de matéria seca do controle sem N seguindo a fórmula:

$$efrC (\%) = \frac{MSPA \text{ inoculada}}{MSPA \text{ controle sem N}} \times 100$$

Onde: EfrC é a eficiência relativa; MSPA inoculada é a biomassa seca da parte área da planta inoculada; MSPA controle é a biomassa seca da parte área da planta sem inoculação.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos aos testes para verificação de atendimento aos pré-requisitos da análise de variância, e verificação da ocorrência e eliminação de possíveis outliers. Foi realizada análise de regressão para as variáveis dependentes, número (NN) e biomassa seca de nódulos (MSN), biomassa seca da parte aérea (MSPA), acúmulo de nitrogênio (ANPA) e fósforo na parte aérea (APPA), tendo as concentrações de células da estirpe BR 3267 como variável independente. A seleção dos modelos foi baseada no maior coeficiente de determinação (R^2) e no menor quadrado médio do resíduo. Para a variável eficiência relativa (efrC) não foi possível ajustar um modelo, e foi conduzida análise descritiva dos intervalos de confiança. Foi realizada análise de correlação entre todas as variáveis dependentes. Todas as análises foram conduzidas ao nível de 5% de probabilidade. A seleção dos modelos de regressão foi realizada através do programa Sigmaplot. 10.0 (SYSTAT SOFTWARE INC., 2006). A análise de correlação e dos intervalos de confiança foi realizada através do programa estatístico SAS Learning Edition 2.0 (SAS INSTITUTE, 2006).

Experimento 2: Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de rizóbios nativos

Isolamento de rizóbios nativos

Os rizóbios nativos foram obtidos das plantas do tratamento sem inoculação e sem nitrogênio do experimento em que foi avaliado o efeito das diferentes taxas de inóculo. Dezesseis nódulos foram usados para o isolamento dos rizóbios nativos, sendo coletados quatro nódulos em cada uma das quatro repetições.

Os nódulos foram primeiramente imersos em álcool etílico 95 %, por 30 segundos, posteriormente, imersos em solução de hipoclorito de sódio a 3%, por 1 minuto, e depois lavados seis vezes em água destilada e esterilizada, para retirar o excesso de hipoclorito.

Em seguida, os nódulos foram levemente pressionados com uma pinça sobre uma placa de Petri, contendo o meio sólido YEM (extrato de levedura, manitol e ágar), com vermelho do Congo, conforme descrito por Vincent (1970). Após o isolamento, as placas foram incubadas a 28° C, por uma a duas

semanas, até o aparecimento e desenvolvimento das colônias. As colônias isoladas características de rizóbio foram purificadas e armazenadas em tubos contendo meio sólido YEM sem corante, para posterior caracterização morfofisiológica e avaliação de eficiência. Os mesmos isolados foram repicados em meio TY (SOMASEGARAN & HOBEN; 1994) contendo 15% de glicerol, para conservação em freezer, a -4 °C.

Avaliação da diversidade fenotípica dos rizóbios nativos

Foram avaliadas as características fenotípicas de 23 isolados obtidos, da estirpe BR 3267 (*Bradyrhizobium* sp.) usada como inoculante no experimento anterior e das estirpes de referência BR 3262 (*Bradyrhizobium elkanii*), BR 3460 (*Rhizobium* sp.), BR 3461 (*Burkholderia nodosa*) e SEMIA 4080 (*Rhizobium tropici*), todas recomendadas para produção de inoculantes pela Embrapa Agrobiologia e pela MIRCEN/FEPAGRO.

As características observadas foram taxa de crescimento, medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (crescimento muito rápido – 12 horas; rápido – 24h; intermediário – 36h; lento – acima de 48h); modificação do pH do meio de cultura (acidificação, alcalinização e neutro), diâmetro médio das colônias (< 1 mm ou de 1 a 2 mm), coloração das colônias (amarela ou branca), transparência das colônias (translúcidas ou opacas), produção de muco e quantidade de muco (baixa, média ou alta).

A resistência intrínseca dos isolados e das estirpes de referência aos antibióticos foi determinada através do crescimento em meio líquido YM contendo antibióticos. A avaliação foi feita pela medição da absorbância (densidade ótica) das culturas a 600 nm após quatro dias de incubação em uma temperatura de 28°C (ARAÚJO, 1994). Foram utilizados os seguintes antibióticos: chloranfenicol (40 µg mL⁻¹), eritromicina (100 µg mL⁻¹), espectinomomicina (100 µg mL⁻¹), estreptomicina (100 µg mL⁻¹), gentamicina (40 µg mL⁻¹), neomicina (100 µg mL⁻¹) e tetraciclina (40 µg mL⁻¹).

Uma matriz binária dos dados de caracterização fenotípica foi construída e utilizada para agrupamento pelo método UPGMA ("Average Linkage Clustering"), utilizando a matriz de similaridade de Jaccard, e representados por um dendrograma de similaridade realizado através do programa NTSYS, versão 2.01 (ROHLF, 2000).

Avaliação da eficiência simbiótica de rizóbios nativos

Dos grupos similares formados no dendograma, foram selecionados aleatoriamente 15 isolados, de forma a contemplar pelo menos um isolado de cada grupo, para avaliação de seus efeitos sobre o crescimento, nodulação e acúmulo de N em feijão-caupi.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agronomia, Área de Solos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no período de dezembro de 2010 a janeiro de 2011.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com 17 tratamentos e três repetições. Os 17 tratamentos foram compostos pela inoculação dos 15 isolados, mais um tratamento sem inoculação e outro com a inoculação da estirpe BR 3267.

Utilizaram-se vasos de Leonard modificados (VINCENT, 1970), preenchidos com 500 cm³ de uma mistura 1:1 (v:v) de areia e vermiculita, contendo no compartimento inferior solução nutritiva isenta de N (NORRIS & DATE, 1976), sendo o conjunto autoclavado por 1h, à pressão de 1 ATM a 120°C.

Inoculação e plantio

As estirpes foram cultivadas em meio líquido à base de extrato de levedura e manitol (YEM) de acordo Vincent (1970), com pH ajustado para 6,8 em erlenmeyers de 125mL com 25 mL do meio de cultura colocados em agitador rotatório a 150 rpm, submetidos a uma temperatura de 30°C por 96 horas.

A utilização do caldo bacteriano correspondeu à fase de crescimento log da bactéria, obtendo-se uma concentração em torno de 10⁵ células viáveis mL⁻¹, determinada por transmitância em comprimento de onda de 540 nm (Urenha et al., 1994).

As sementes da cultivar BRS Pujante foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, seguidas de 9 lavagens sucessivas com água deionizada estéril.

O plantio foi realizado utilizando-se quatro sementes por vaso, inoculadas na proporção de 1 mL de caldo bacteriano por semente, com

posterior desbaste no quarto dia após a emergência, mantendo-se uma planta por vaso.

O nível da solução nutritiva nos vasos foi mantido repondo-se periodicamente com a mesma solução autoclavada.

Coletas das plantas para avaliação da FBN

As plantas foram coletadas aos 30 dias após a semeadura para avaliação do número (NN) e biomassa seca de nódulos (MSN), da biomassa seca da parte aérea (MSPA) e do acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA).

As raízes coletadas de cada tratamento foram separadas da parte aérea, lavadas em água corrente, os nódulos foram destacados, contados e armazenados em recipiente de plástico contendo sílica gel e após 7 dias foram pesados para obtenção da biomassa seca de nódulos .

A biomassa seca da parte aérea foi determinada após secagem em estufa a 65°C por 72 horas, em seguida foi moída para a determinação do teor de N-total. O N-total da parte aérea foi determinado pelo método semi-micro Kjeldhal, de acordo com Bezerra Neto & Barreto (2004).

O N acumulado na parte aérea foi calculado através da multiplicação da biomassa seca na parte aérea (g) pelo teor de N-total.

Análises estatísticas

Só foram utilizados para avaliação de eficiência simbiótica, os isolados que apresentaram acima de três nódulos em cada repetição.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes para verificação de atendimento aos pré-requisitos da análise de variância e as médias comparadas pelo teste LSD. Os dados de ANPA, NN e MSN foram transformados por $\text{Log}_{10}(x)$, $\text{Log}_{10}(x+2)$ e \sqrt{x} , respectivamente. Também foi realizada análise de correlação entre todas as variáveis. As análises foram realizadas ao nível de a 5% de probabilidade utilizando o SAS Learning Edition 2.0 (SAS INSTITUTE, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Efeito da taxa de inóculo e eficiência na fixação do nitrogênio da estirpe BR 3267

Houve efeito das diferentes concentrações do inóculo da estirpe BR 3267 na cultivar de feijão-caupi BRS Pujante (Apêndice A).

A avaliação do número de nódulos por planta (NN) demonstrou diferenças com o aumento do número de células de rizóbios na semente ($P < 0,0001$), atingindo o máximo de 72 nódulos por planta com a aplicação de $6,65 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹ de acordo com o modelo hiperbólico (Figura 1).

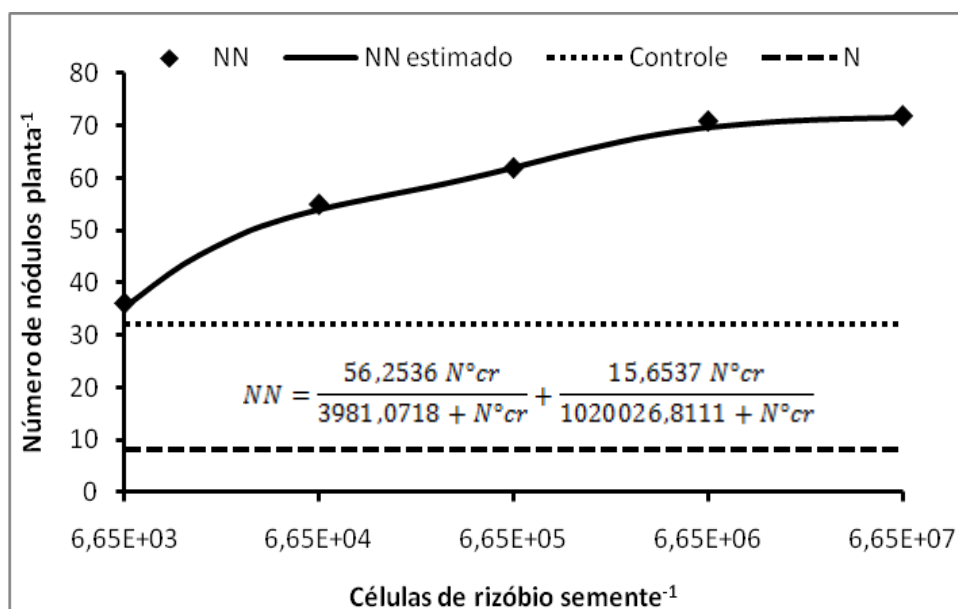


Figura 1: Número de nódulos (NN) por planta de feijão caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR 3267 presentes na semente inoculada. Controle = plantas não inoculadas e sem aplicação de fertilizante nitrogenado; N = plantas não inoculadas com aplicação de fertilizante nitrogenado; $N^{\circ} cr$ = número de células de rizóbio semente⁻¹.

Correlação significativa foi encontrada entre o NN e a biomassa seca de nódulos, biomassa seca parte aérea, eficiência relativa e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Tabela 2). Com relação ao acúmulo de fósforo na parte aérea a correlação demonstrou uma forte tendência, apesar de não ser significativa ($P=0,0628$).

Tabela 2. Coeficientes de correlação e probabilidades entre as variáveis número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (MSN), biomassa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa ao controle (efrC), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA) e biomassa seca da raiz (MSR)

Variável	NN	MSN	MSPA	efrC	ANPA	APPA
MSN	0,7549					
	0,0000					
MSPA	0,4592	0,4840				
	0,0240	0,0166				
efrC	0,4738	0,5318	0,1965			
	0,0194	0,0075	0,3575			
ANPA	0,5276	0,4523	0,6933	0,1868		
	0,0081	0,0265	0,0002	0,3822		
APPA	0,3855	0,5744	0,6924	0,2584	0,6646	
	0,0628	0,0033	0,0002	0,2228	0,0004	
MSR	-0,0813	-0,2689	0,3047	-0,1663	0,1078	-0,0272
	0,7058	0,2038	0,1477	0,4373	0,6160	0,8996

A dosagem mínima recomendada de 8×10^5 células de rizóbio semente⁻¹ (MAPA, 2010) correspondeu a um aumento de 75% na quantidade de nódulos por planta em relação à menor dosagem aplicada, que foi de $6,65 \times 10^3$ células de rizóbio semente⁻¹.

Nas duas últimas taxas de aplicação do inóculo ($6,65 \times 10^6$ e $6,65 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹) observou-se o aumento de apenas 1 nódulo por planta quando houve um aumento de 10 vezes na taxa de inóculo aplicado na semente, sugerindo a saturação dos sítios de nodulação das raízes a partir de $6,65 \times 10^6$ células de rizóbio semente⁻¹. O que pode ter sido ocasionado, provavelmente, pelos mecanismos reguladores da planta que controlam o processo de nodulação (PARKER, 2001).

Em relação ao tratamento controle sem N, que contém uma população rizobiana estabelecida de $2,21 \times 10^3$ ufc g de solo⁻¹, a aplicação de $6,65 \times 10^5$ células de rizóbio semente⁻¹, apresentou um aumento de 94% da quantidade de nódulos, já a dosagem máxima utilizada promoveu uma maximização na quantidade de nódulos por planta correspondente a 2,25 vezes o valor do tratamento controle.

Vieira Neto et al. (2008) avaliando a aplicação de inoculantes na cultura do soja (*Glycine max* (L) Merrill) não encontraram aumento na quantidade de nódulos com o aumento da dose de inoculante em duas áreas, independente do tamanho da população rizobiana estabelecida. Resultado semelhante foi encontrado por Araújo et al. (2007) que comentam que o aumento da dosagem do inoculante não proporcionou ganhos de nodulação e produtividade para o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) em um solo com baixa população rizobiana estabelecida.

Entretanto, Osunde et al. (2003) relatam aumento significativo na taxa de N fixado para a soja quando plantas inoculadas apresentaram 2 vezes mais nódulos que a população rizobiana nativa do solo e atribuem essa resposta a alta concentração das estirpes no inoculante.

Papakosta (1992) estudando o efeito de diferentes taxas de inóculo observaram aumentos significativos na nodulação, fixação de nitrogênio e produção de grãos para a soja com a aplicação de uma taxa de inóculo de $6,75 \times 10^5$ células de rizóbio semente⁻¹.

De acordo com Fettel et al. (1997), Houngnandam et al. (2000), Sanginga et al. (1996) e Sanginga et al. (2000), respostas positivas à inoculação é dependente do local e inversamente relacionada com o tamanho, a eficiência e a competitividade da população rizobiana estabelecida. Nazih e Weaver (1994) relatam aumento no número de nódulos em trevos (*Trifolium* spp.) e aumento no número de rizóbios em dois solos com o aumento das taxas de inóculo devido os dois solos avaliados possuírem populações inferiores a 100 rizóbios grama de solo¹.

Fato que não foi observado nesse experimento, no qual a população rizobiana estabelecida foi de $2,21 \times 10^3$ rizóbios grama de solo⁻¹ e ocorreram respostas positivas aos parâmetros de nodulação à medida que se elevaram a taxa de inóculo.

Hafeez et al. (2007) avaliando especificidade, eficiência e competitividade entre estirpes de rizóbios introduzidas e nativas em diferentes tipos de solo, observaram respostas positivas da inoculação com a aplicação de uma taxa de 10^4 células de rizóbio semente⁻¹ que foi 10 vezes maior que a população rizobiana nativa.

Com relação à elevada população rizobiana estabelecida no solo em estudo, poderia ser explicada devido a cultivos anteriores com o feijão-caupi,

uma vez que, diversos autores (FENING & DANSO, 2002; KIMITI & ODEE, 2010; MUSIYIWA et al., 2005 e ZILLI et al., 2004); relatam que aumento significativo na densidade da população rizobiana no solo foi observado somente em resposta ao cultivo do feijão-caupi, sugerindo que a presença dessa leguminosa favorece o estabelecimento de grupos de rizóbios específicos e que adquirem características competitivas, garantindo seu estabelecimento nestes locais (ZILLI et al., 2004).

Neste sentido, embora tenham encontrado resultados favoráveis no primeiro ano de cultivo em solo de área de Cerrado e mata alterada, Zilli et al. (2009a) observaram que a população de rizóbio do solo foi determinante para nodulação das plantas de feijão-caupi cultivar Mazagão, não sendo verificada resposta positiva à inoculação e produtividade de grãos no segundo cultivo devido ao aumento da população rizobiana. Resultados semelhantes foram obtidos por Osunde et al. (2003) e Kimiti & Odee (2010).

A biomassa seca de nódulos (MSN) obteve o valor máximo de 770 mg planta⁻¹ referente a uma taxa de 5,34x10⁶ células de rizóbio semente⁻¹, segundo o modelo exponencial (Figura 2). A MSN aumentou significativamente (P=0,0009) a partir de 1,9x10⁵ células de rizóbio semente⁻¹ correspondente a 600 mg planta⁻¹, mostrando-se a partir desta concentração superior aos tratamentos controle e ao nitrogenado segundo a estimativa do modelo. Esse resultado aliado ao obtido para NN indica a superior habilidade competitiva da estirpe BR 3267 para nodulação em relação à população rizobiana desse solo, a partir da concentração de 1,9x10⁵ células de rizóbio semente⁻¹.

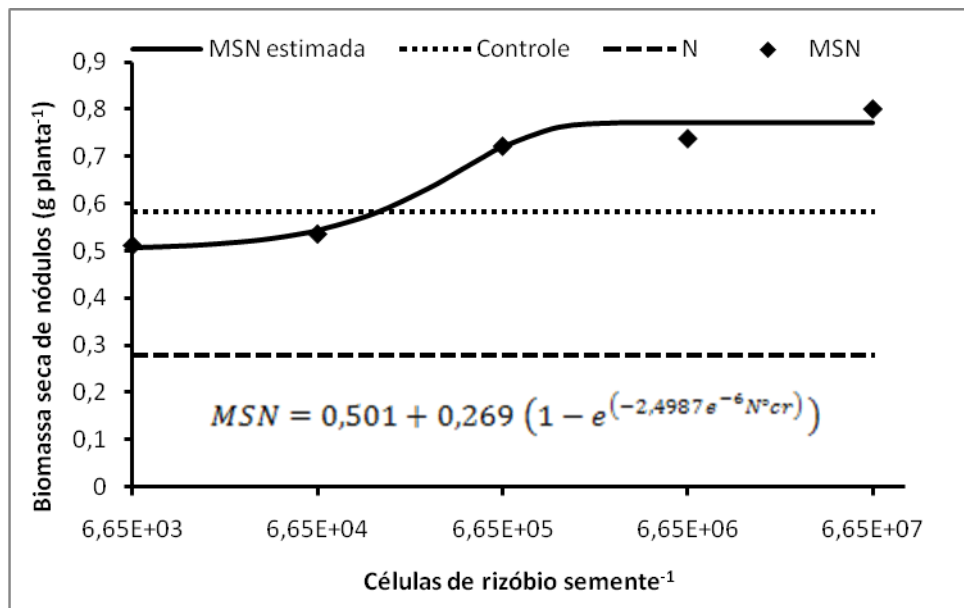


Figura 2: Biomassa seca de nódulos (MSN) por planta de feijão caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR 3267 presentes na semente inoculada. Controle = plantas não inoculadas e sem aplicação de fertilizante nitrogenado; N = plantas não inoculadas com aplicação de fertilizante nitrogenado; $N^{\circ} cr$ = número de células de rizóbio semente⁻¹.

O desempenho da estirpe do inóculo foi afetado pela competição com a população rizobiana do solo, uma vez que, a mesma apresentou MSN inferior quando foram aplicadas taxas entre $6,65 \times 10^3$ e $6,65 \times 10^4$ células de rizóbio semente⁻¹.

Além disso, foi observado que a partir da taxa de inóculo de $5,34 \times 10^6$ células de rizóbio semente⁻¹ a MSN foi constante, sendo 34% maior em relação à MSN formada pela população rizobiana estabelecida.

Xavier et al. (2006) em estudo da avaliação da taxa de ocupação nodular de estirpes de rizóbios em diferentes genótipos de feijão-caupi e sua relação com a especificidade simbiótica, relata que a estirpe BR 3267 foi a única que diferiu significativamente em relação a MSN quando comparada ao controle sem inoculação em solo com uma população rizobiana nativa de 10^3 rizóbios mL⁻¹.

Resposta diferente foi encontrada por Melo e Zilli (2009a) avaliando em campo o potencial simbiótico de cultivares de feijão-caupi, em que a estirpe BR 3267 apresentou o menor NN e MSN em solo com $1,9 \times 10^3$ rizóbios grama de solo seco⁻¹.

Chagas Júnior et al.(2010) avaliando o efeito da inoculação com estirpes de rizóbios em cultivares de feijão-caupi, relatam que a estirpe BR3267 apresentou em condições de campo baixa eficiência para nodulação em relação as demais, para as cultivares Nova Era e Vinagre. No entanto, esses autores comentam que para a cultivar BRS Pujante essa estirpe apresentou alta eficiência em relação as demais estirpes testadas.

Essa variabilidade na resposta da estirpe BR 3267 pode estar relacionada com a especificidade simbiótica entre estirpes de rizóbios e cultivares de feijão-caupi (LEITE et al., 2009; XAVIER et al., 2006), como também a diferentes densidades de células do inoculante aplicado nas sementes de feijão-caupi.

O tratamento nitrogenado apresentou menores NN e MSN em valores absolutos quando comparado ao tratamento controle e as diferentes concentrações da estirpe BR 3267 no inoculante (Figuras 1 e 2). Isso demonstra que a aplicação de nitrogênio equivalente a 20 Kg ha⁻¹ inibiu a nodulação espontânea em plantas de feijão-caupi em condições controladas.

Brito et al. (2009) avaliando as contribuições das fontes de N proveniente da FBN, do solo e da uréia no desenvolvimento do feijão-caupi em casa de vegetação, comentam que adição de 27 Kg ha⁻¹ de N estimulou a nodulação e que a FBN favoreceu a maior parte do N acumulado nas plantas, seguida, em ordem decrescente pelo solo e fertilizante.

Houve efeito significativo (P=0,0034) para a variável biomassa seca da parte aérea (MSPA) de feijão-caupi, de acordo com o modelo hiperbólico (Figura 3). À medida que houve o aumento da taxa de concentração de células na semente, aumentou também a MSPA. Como também, foi observada correlação entre MSPA e a biomassa seca e número de nódulos, acúmulo de nitrogênio e de fósforo na parte aérea (Tabela 3).

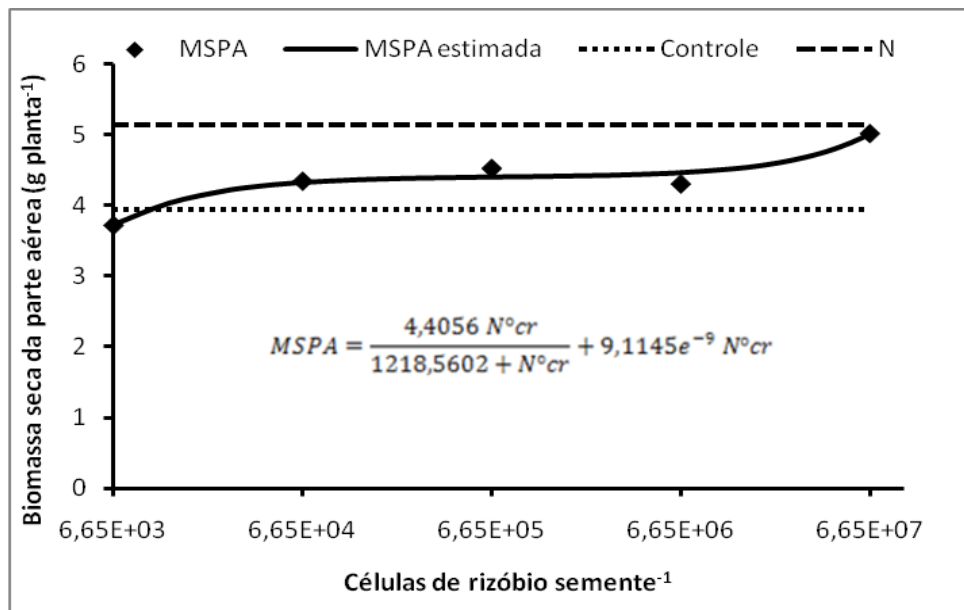


Figura 3: Biomassa seca da parte aérea (MSPA) por planta de feijão caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR 3267 presentes na semente inoculada. Controle = plantas não inoculadas e sem aplicação de fertilizante nitrogenado; N = plantas não inoculadas com aplicação de fertilizante nitrogenado; $N^{\circ} cr$ = número de células de rizóbio semente⁻¹.

O acúmulo de MSPA foi maior a partir de $1,2 \times 10^4$ células de rizóbio semente⁻¹ em relação tratamento sem inoculação, segundo a estimativa do modelo. No intervalo entre 1×10^5 a 5×10^6 células de rizóbio semente⁻¹ a MSPA apresentou valores semelhantes. A melhor resposta da planta a inoculação em termo de MSPA foi a partir da dosagem 5×10^6 células de rizóbio semente⁻¹.

A aplicação da dosagem mínima recomendada de 8×10^5 células de rizóbio semente⁻¹, apresentou um acúmulo de MSPA de 4,41 g planta⁻¹, já as plantas sob população rizobiana estabelecida apresentaram um acúmulo de MSPA de 3,95 g planta⁻¹.

Nessa pesquisa foi observado que a aplicação da maior taxa de inóculo promoveu uma maximização na MSPA por planta correspondente a 1,27 vezes o valor do tratamento controle. Como também a aplicação da mesma taxa proporcionou MSPA de 5,03 g plantas⁻¹ resultado semelhante ao tratamento nitrogenado de 5,15 g plantas⁻¹ (Figura 3).

A diferença de MSPA entre o tratamento controle e aplicação de $6,65 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹ demonstra a capacidade da estirpe BR3267 de estabelecer simbiose eficiente com a cultivar BRS Pujante, em um

solo com elevada população rizobiana, sendo essa eficiência proporcional ao aumento da taxa de inóculo.

Papakosta (1992) também observou incremento significativo da MSPA após a adição de 10^5 células de rizóbio semente⁻¹ em soja. Enquanto Bloem & Law (2001) não observaram diferenças para MSPA de três cultivares de soja em relação à aplicação de 10^3 células de rizóbio semente⁻¹ em solo com população rizobiana nativa de 300 rizóbios grama de solo⁻¹.

Melo & Zilli (2009) avaliando o potencial simbiótico da cultivar BRS Guariba em campo, relatam que a estirpe BR 3267 apresentou a maior MSPA em relação ao tratamento controle de $1,9 \times 10^3$ rizóbios grama de solo seco⁻¹ e semelhante à aplicação de 50 kg ha⁻¹ de N.

Em ensaio de campo, Zilli et al. (2009a) encontrou que a estirpe BR3267 juntamente com BR 3262, proporcionaram maior efetividade à produção da MSPA. O mesmo resultado favorável foi encontrado por Zilli et al. (2006), observando que o acúmulo de MSPA pela estirpe foi estatisticamente superior a quatro diferentes tratamentos com inoculação, além do tratamento nitrogenado.

De acordo com os resultados para a efrC (Figura 4) foi verificado um aumento da eficiência da estirpe BR 3267 para o acúmulo de MSPA das plantas, à medida que foram elevando-se as taxas do inóculo. No entanto, somente as aplicações de $6,65 \times 10^5$ e $6,65 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹ foram superiores ao tratamento controle, apresentando respectivamente 15 e 27% a mais de eficiência. As demais taxas de aplicação do inóculo não diferiram do controle. A biomassa seca de nódulos e o número de nódulos se correlacionaram com a efrC (Tabela 3).

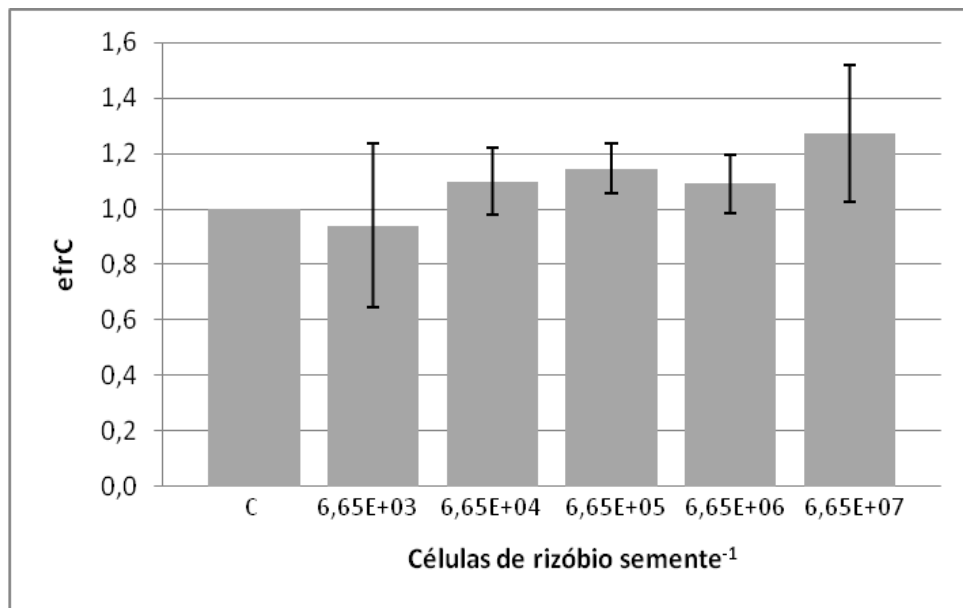


Figura 4. Eficiência relativa (efrC) por planta de feijão caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR 3267 presentes na semente inoculada. Controle = plantas não inoculadas e sem aplicação de fertilizante nitrogenado. Valores das barras são médias de quatro repetições e seus respectivos intervalos de confiança.

O acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) de plantas de feijão-caupi sob diferentes taxas de aplicação do inóculo foi maior quando comparado ao tratamento nitrogenado segundo a estimativa do modelo hiperbólico (Figura 5). Além disso, o ANPA foi superior ao tratamento controle a partir da taxa de aplicação de 4×10^5 células de rizóbio semente⁻¹.

Correlações significativas foram obtidas entre ANPA e o número e a biomassa seca de nódulos, biomassa seca da parte aérea (MSPA) e o acúmulo de fósforo na parte aérea (Tabela 3).

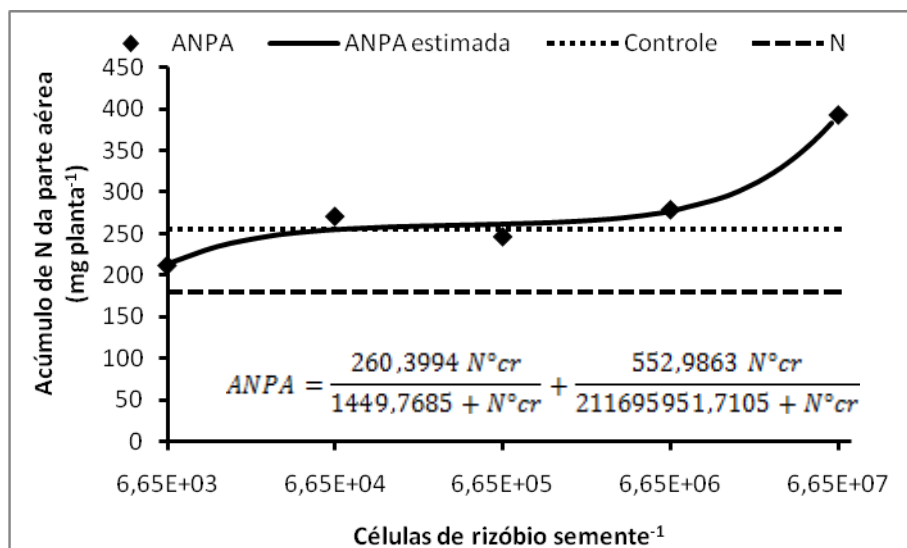


Figura 5. Acúmulo de N da parte aérea (ANPA) por planta de feijão caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR 3267 presentes na semente inoculada. Controle = plantas não inoculadas e sem aplicação de fertilizante nitrogenado; N = plantas não inoculadas com aplicação de fertilizante nitrogenado; $N^{\circ} cr$ = número de células de rizóbio semente⁻¹.

A aplicação de 8×10^5 células de rizóbio semente⁻¹ correspondeu a 262 mg de N planta⁻¹ e mostrou-se maior que a população rizobiana estabelecida que acumulou 256 mg de N planta⁻¹. Quando aplicado uma dose de $6,65 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹ as plantas acumularam 392 mg de N na parte aérea.

A baixa nodulação ocorrida no tratamento nitrogenado restringiu o acúmulo de N na parte aérea desse tratamento, sugerindo que grande parte do N acumulado na parte aérea foi proveniente da FBN. Uma vez que, Brito et al. (2009) relatam que 93% do N acumulado em planta de feijão-caupi foi derivado da FBN com estirpe BR 2001 quando foi aplicado 27 Kg ha^{-1} de N.

Neste ensaio, a inoculação com a estirpe BR3267 a partir da aplicação de 8×10^5 células de rizóbio semente⁻¹ forneceu a maior quantidade de N para as plantas (Figura 5). Danso & Owiredu (1988) trabalhando com solos com população rizobiana elevada verificaram que a elevação da taxa de inóculo favoreceu o ANPA em plantas de feijão-caupi.

A aplicação de 20 Kg ha^{-1} de N e a população rizobiana estabelecida no solo foram insuficientes para suprir a demanda de N em plantas de feijão-caupi.

Singleton & Tavares (1986), caracterizando a população rizobiana nativa em termos de número e eficiência para seis leguminosas (soja, amendoim,

feijão-caupi, *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus* e *Leucaena leucocephala*) em solos do Havaí, relatam que plantas inoculadas sempre apresentaram ANPA inferior em relação a plantas não inoculadas quando a população rizobiana nativa foi acima de 20 rizóbios g de solo⁻¹ e apresentavam alguns isolados eficientes. Resultados semelhantes foram encontrados por Sanginga et al. (1996) para a soja e feijão-caupi em solos da Nigéria.

O presente trabalho nos fornece um indicativo de uma relação simbiótica ineficiente entre a população rizobiana do solo em estudo e plantas de feijão-caupi, resultante da baixa eficiência dos rizóbios do solo ou que a cultivar BRS Pujante se beneficia mais da FBN quando inoculada com a estirpe BR 3267 e esse benefício é proporcional ao aumento da taxa de inóculo.

Embora o solo apresente uma elevada densidade de rizóbios efetivos na formação dos nódulos em plantas de feijão-caupi, esses apresentam média ou baixa eficiência na fixação do N₂, como também, a cultura do feijão-caupi apresenta baixa especificidade para nodulação, mas alta especificidade para fixação do N₂ com rizóbios (FAL et al., 2003; FENING & DANSO, 2002; MUSIYIWA et al 2005; NDIAYE et al., 2000; XAVIER et al., 2006).

Com relação ao acúmulo de P na parte aérea (APPA), houve efeito significativo (P=0,0009) para a aplicação de diferentes taxas de inóculo na semente, de acordo com o modelo linear (Figura 6). À medida que houve o aumento da concentração de células na semente, aumentou o acúmulo de P na parte aérea de plantas de feijão-caupi.

Da mesma forma, quanto maior o APPA, maiores foram os valores da biomassa seca de nódulos, da biomassa seca da parte aérea e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Tabela 3).

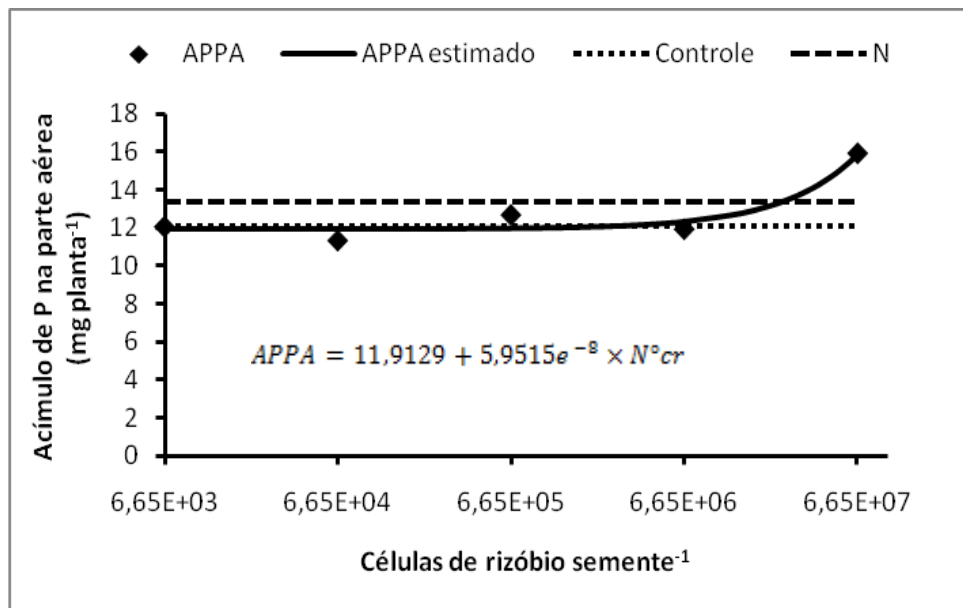


Figura 6. Acúmulo de P na parte aérea (APPA) de plantas de feijão-caupi cultivar BRS Pujante em função de diferentes concentrações de células da estirpe BR 3267 presentes na semente inoculada. Controle = plantas não inoculadas e sem aplicação de fertilizante nitrogenado; N = plantas não inoculadas com aplicação de fertilizante nitrogenado; $N^{\circ} cr$ = número de células de rizóbio semente⁻¹.

A absorção de P por plantas noduladas foi maior quando aplicado altas taxas de inóculo ($6,65 \times 10^6$ e $6,65 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹) e foi correlacionado com o aumento da MSPA e ANPA (Tabela 3). Sugerindo que a demanda de P da planta para o crescimento e nodulação provavelmente influenciou a absorção do P disponível no solo.

Plantas que são dependentes da FBN requerem mais P do que plantas supridas pelo fertilizante nitrogenado, devido ao crescimento da planta e ao processo de nodulação ser dependente de P (GENTILI & HUSS-DANEL, 2003; ISRAEL, 1987; SULIEMAN et al., 2008).

O APPA foi superior aos tratamentos controle e nitrogenado a partir da aplicação de 4×10^6 e $2,7 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹, respectivamente, de acordo com estimativa do modelo. O máximo de acúmulo de P na parte aérea foi de $15,87 \text{ mg planta}^{-1}$ na dose de $6,65 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹.

Silva et al. (2010) avaliando o efeito de diferentes doses e fontes de fósforo solúvel na FBN em feijão-caupi após aplicação de 40 kg ha^{-1} de P_2O_5 na forma de superfosfato simples, apresentou valores para o NN, MSN e MSPA inferiores aos encontrados neste estudo. Vale ressaltar que o ANPA encontrado por Silva et al. (2010) foi 6 vezes inferior ao encontrado neste

trabalho, com a aplicação da dosagem recomendada de 8×10^5 células de rizóbio semente⁻¹.

Respostas positivas a inoculação foram observadas com a aplicação de $6,65 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹ a qual apresentou os maiores valores para NN, MSN, MSPA, ANPA E APPA.

Diante do exposto, o estudo sobre o efeito das diferentes taxas de inóculo na cultura do feijão-caupi sugere benefícios com aplicações de taxas de inóculo de $6,65 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹, otimizada pelo uso de estirpes competitivas e eficientes, o que aumenta o acúmulo de MSPA e N fixado em plantas de feijão-caupi em solos com população rizobiana elevada.

Experimento 2: Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de rizóbios nativos

Foram formados 16 grupos de isolados nativos do solo em estudo. Estes resultados indicam que, além do solo utilizado no experimento possuir uma elevada população rizobiana estabelecida, já verificada anteriormente quantificada em $2,21 \times 10^3$ ufc.g de solo⁻¹, esta população também possui elevada diversidade fenotípica (figura 7).

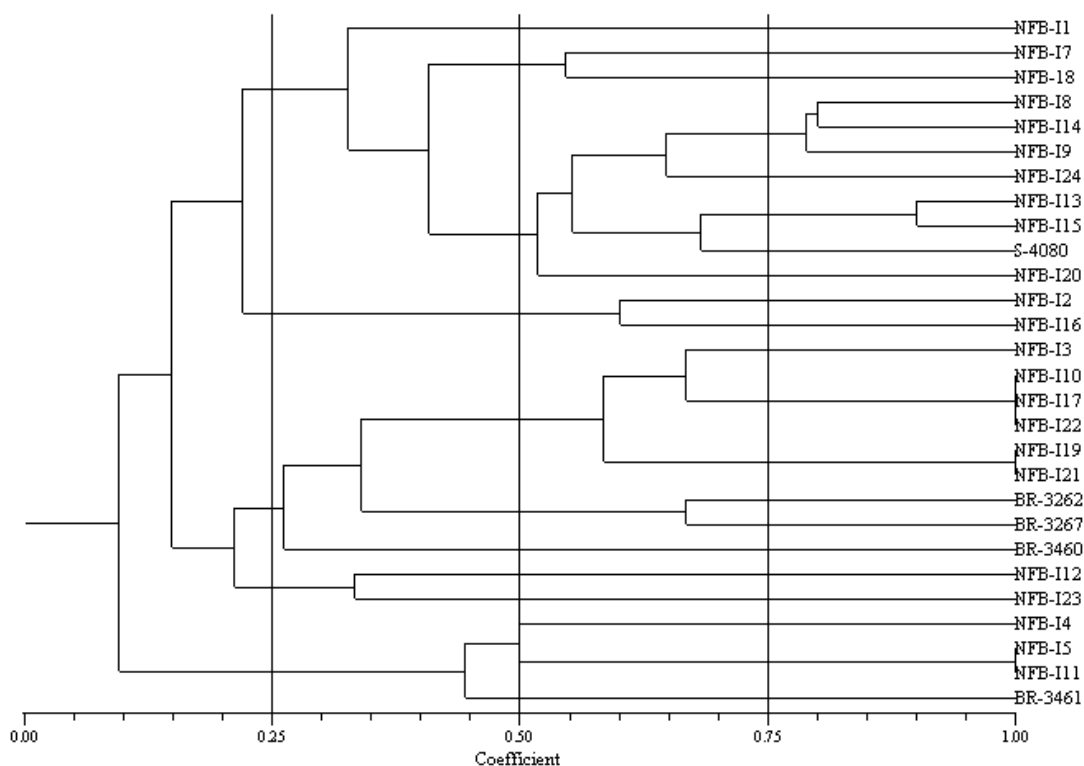


Figura 7. Dendrograma de similaridade, construído com base nas características fenotípicas dos 23 isolados de rizóbios nativos e das estirpes inoculantes BR 3267 (*Bradyrhizobium* sp.), BR 3262 (*Bradyrhizobium elkanii*), BR 3460 (*Rhizobium* sp.), BR 3461 (*Burkholderia nodosa*) e SEMIA 4080 (*Rhizobium tropici*).

Os diversos grupos fenotípicos formados não se agruparam a 75% de similaridade com as estirpes usadas como inoculante. Somente a uma similaridade inferior (50%), a estirpe de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4080) se agrupou com os grupos de isolados 6, 7, 8 e 9. Nenhum dos grupos de isolados apresentou similaridade de 75% com as duas estirpes de *Bradyrhizobium* (BR 3262 e BR 3267) recomendadas para a cultura do feijão-caupi (Figura 7).

Resultados semelhantes foram obtidos por Soares et al. 2006, avaliando a diversidade de uma população rizobiana nativa nodulando o feijão-caupi. Esses autores não encontraram nenhuma relação a 80% de similaridade, entre os isolados obtidos e as estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas como inoculante, a maioria dos isolados da população foi classificada como *Sinorhizobium meliloti*.

Entretanto, Melloni et al. (2006) avaliando a eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam feijão-caupi em áreas de mineração de bauxita, encontraram 74% dos isolados pertencentes ao grupo

formado com as estirpes de *Bradyrhizobium* e que 22% dos isolados foram pertencentes ao grupo de *Sinorhizobium*.

Houve diferenças significativas entre os isolados de rizóbios quanto à nodulação das raízes (NN e MSN) e o fornecimento de N (ANPA) às plantas de feijão-caupi (Apêndice B).

Em relação ao NN o isolado NFB-I14 apresentou o melhor desempenho entre todos, mas não chegou a apresentar valor semelhante à estirpe BR 3267. As demais estirpes apresentaram em média 11 nódulos por planta (Figura 8). Fernandes et al. (2003) não encontraram diferenças em NN entre os rizóbios nativos e a estirpe utilizada no inoculante para o feijão-caupi em solos de Tabuleiro.

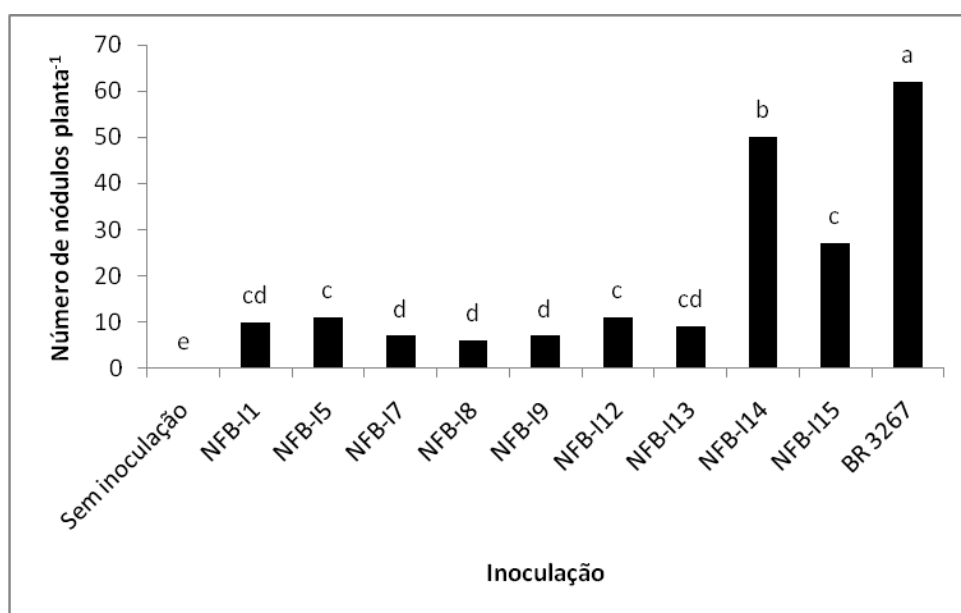


Figura 8: Número de nódulos em plantas de feijão caupi cv. BRS Pujante cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 9 isolados de rizóbios de solo da Zona da Mata de Pernambuco, uma estirpe recomendada e ausência de inoculação. Dados transformados por $\log_{10}(x+2)$.

Quanto à variável MSN, o isolado NFB-I14 apresentou maior MSN quando comparada à estirpe BR 3267 e aos demais isolados do solo. Os isolados NFB-I19 e NFB-I15 não diferiram da estirpe BR 3267 (inoculante). Seis isolados do solo apresentaram MSN inferior à estirpe do inoculante (Figura 9).

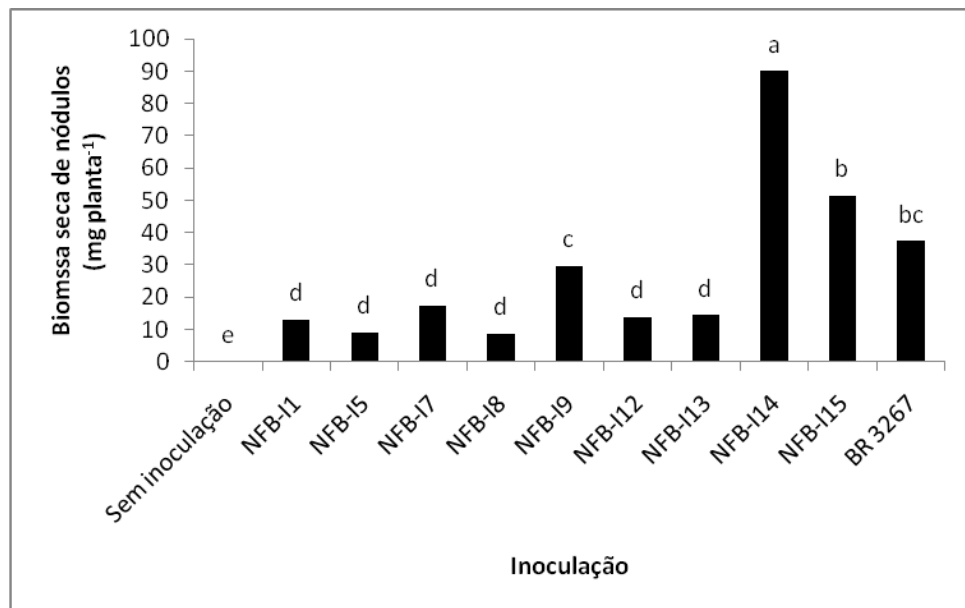


Figura 9: Biomassa seca de nódulos em plantas de feijão caupi cv. BRS Pujante cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 9 isolados de rizóbios de solo da Zona da Mata de Pernambuco, uma estirpe recomendada e ausência de inoculação. Dados transformados por raiz (x).

Zilli et al. (2006) avaliando o desempenho simbiótico de treze estirpes isoladas do solo de Cerrado encontraram três estirpes inferiores à estirpe BR 3267. Fernandes et al. (2003) avaliando a eficiência de 17 estirpes nativas relatam que uma estirpe nativa foi inferior a estirpe do inoculante.

Avaliando a nodulação em função das diferentes estirpes observou-se que os isolados NFB-I14 e NFB-I15 foram as que apresentaram desempenho semelhante à estirpe 3267.

Para a variável MSPA os isolados NFB-I5, NFB-I8 e NFB-I12 apresentaram valores inferiores à estirpe BR 3267. Os demais apresentaram valores semelhantes à estirpe do inoculante, como também, ao tratamento sem inoculação (Figura 10).

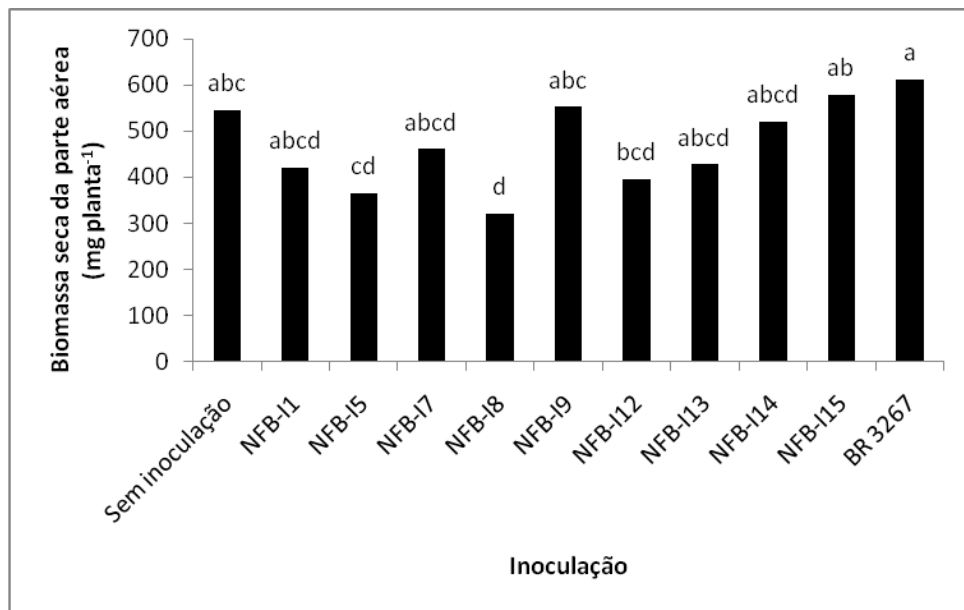


Figura 10: Biomassa seca da parte aérea em plantas de feijão caupi cv. BRS Pujante cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 9 isolados de rizóbios de solo da Zona da Mata de Pernambuco, uma estirpe recomendada e ausência de inoculação.

Zilli et al. (2006) encontraram 46% das estirpes nativas do Cerrado com desempenho semelhante à estirpe BR 3267. Nascimento et al. (2010) avaliando a eficiência de 13 isolados de rizóbios oriundo de solos do Agreste da Paraíba relatam que não houve diferença de MSPA entre os isolados e a estirpe BR 3267.

Observou-se que MSPA não se correlacionou com o NN e MSN (Tabela 3), sugerindo que não houve influência dos parâmetros da nodulação na produção de MSPA em plantas de feijão-caupi. O que pode ser verificado pela não diferença em MSPA de plantas inoculadas e de plantas sem inoculação.

Tabela 3. Coeficientes de correlação e probabilidades entre as variáveis número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (MSN), biomassa seca da parte aérea (MSPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA)

Variável	NN	MSN	MSPA
MSN	0,8787		
	0,0000		
MSPA	0,1921	0,2577	
	0,2841	0,1477	
ANPA	0,4485	0,4957	0,5908
	0,0089	0,0034	0,0003

Possivelmente o tamanho do vaso de Leonard utilizado, como também, outro fator não identificado nesse ensaio possa ter limitado o crescimento das plantas.

Em relação ao ANPA, os isolados NFB-I9, NFB-I13, NFB-I14 e NFB-I15 proporcionaram ANPA semelhante à estirpe BR 3267. Cinco isolados apresentaram ANPA inferior à estirpe BR 3267 (Figura 11). O ANPA apresentou correlação altamente significativa com NN, MSN e MSPA (Tabela 3).

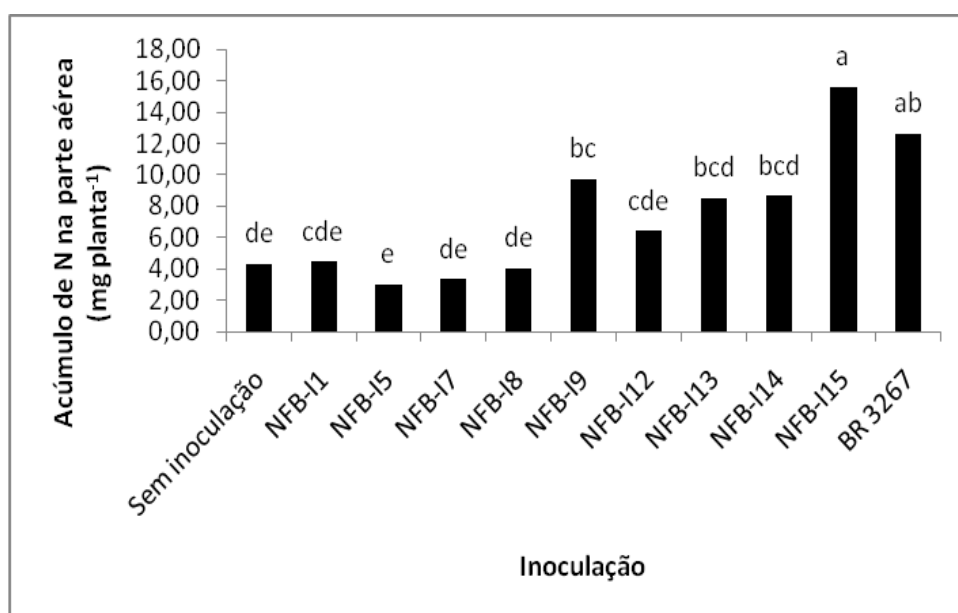


Figura 11: Acúmulo de N na parte aérea em plantas de feijão caupi cv. BRS Pujante cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 9 isolados de rizóbios de solo da Zona da Mata de Pernambuco, uma estirpe recomendada e ausência de inoculação. Dados transformados por $\log_{10}(x)$.

Correlações altamente significativas entre os parâmetros da nodulação (MSN e NN) com ANPA demonstram que o acúmulo de nitrogênio foi influenciado pela eficiência dos isolados de rizóbios em fixar o nutriente. Quanto maior a eficiência dos isolados em fixar N, maior a quantidade de nitrogênio acumulado na planta. Correlações positivas e significativas entre as variáveis NN e ANPA, assim como, MSN e ANPA foram encontrados por Fernandes & Fernandes (2000), Fernandes et al. (2003) e Fening & Danso (2002).

Os resultados obtidos nesse ensaio sugerem que não existe diferença na fixação de N quando isolados de igual eficiência e capacidade competitiva são usadas na mesma concentração no inoculante ($\pm 10^5$ células mL⁻¹).

De acordo Krasova-Wade et al. (2006) a densidade e competitividade de uma população rizobiana nativa pode ser alterada por estirpes introduzidas através da aplicação de taxas de inóculo superiores à densidade da população rizobiana nativa. Yates et al. (2008) sugerem que leguminosas apresentam um mecanismo de seletividade a favor de rizóbios eficazes na presença de uma população heterogênea e que esse mecanismo de seletividade é dependente de uma alta densidade de estirpes eficazes no inóculo.

Em concentrações iguais, a população rizobiana estabelecida não apresentou superioridade em eficiência na fixação do N quando comparada a estirpe BR 3267.

Aliado aos resultados obtidos no experimento anterior, a estirpe BR 3267 apresenta alta habilidade competitiva e eficiência simbiótica em relação à população rizobiana estabelecida no solo em estudo ou que a cultivar BRS Pujante se beneficia mais da FBN quando inoculada com a estirpe BR 3267 e esse benefício é proporcional ao aumento da taxa de inóculo.

A população rizobiana nativa apresentou alta diversidade fenotípica com eficiência simbiótica variável. Havendo correlação entre os isolados dos grupos fenotípicos 4 (NFB-I9 e NFB-I14) e 6 (NFB-I3 e NFB-I15) com a eficiência simbiótica.

CONCLUSÕES

A fixação biológica do nitrogênio eficiente em feijão-caupi requer taxa de inóculo adequada na semente.

Em solo com população rizobiana de 10^3 ufc g de solo⁻¹ é necessária a aplicação de $6,65 \times 10^7$ células de rizóbio semente⁻¹.

A estirpe BR 3267 apresentou maior habilidade competitiva e eficiência simbiótica em relação à população rizobiana estabelecida em um Espodossolo.

A população rizobiana apresentou alta diversidade fenotípica com eficiência simbiótica variável.

A cultivar de feijão-caupi BRS Pujante se beneficiou mais da FBN quando inoculada com a estirpe BR 3267 e esse benefício foi proporcional ao aumento da taxa de inóculo.

REFERÊNCIAS

ALIKHANI, H. A.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. **Plant and Soil**, v. 287, p. 35-41, 2006.

ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA, R.M.C.M.; NÓBREGA, NÓBREGA, J. C. A.; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L. Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, p. 364-369, 2010.

ALMEIDA, J. P. F.; HARTWIG, U. A.; FREHNER, M.; NÖSBERGER, J.; LÜSCHER, A. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal Experimental Botany**, v. 51, p. 1289-1297, 2000.

ALTHABEGOITI, M. J.; LOPEZ-GARCIA, S.; PICCINETTI, C.; MONGIARDINI, E. J.; PEREZ-GIMENEZ, J.; QUELAS, J. I.; PERTICARI, A.; LODEIRO, A. R. Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean. **FMES Microbiology Letters**, v.282, p.115-123, 2008.

ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e no inoculante por infecção em planta. In: HUNGRIA M.; ARAÚJO, R. S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola**. Brasília, DF: Embrapa,1994, p. 63-94.

ARAÚJO, F. F.; CARMONA, F. G.; TIRITAN, C. S.; CRESTE, J. E. Fixação biológica de N₂ no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum agronomy**, v. 29, p. 535-540, 2007.

BALA, A.; GILLER, K.E. Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.76, p.319-330, 2006.

BALA, A.; MURPHY, P. J.; OSUNDE, A. O.; GILLER, K. E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, v. 22, p. 211-223, 2003.

BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2635-2643, 2007.

BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. **Métodos de análises químicas em plantas**. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 2004. 165p.

BLOEM, J. F.; LAW, I. J. Determination of competitive abilities of *Bradyrhizobium japonicum* strains in soils from soybean production regions in South Africa. **Biology and Fertility of Soils**, v.33, p. 181–189, 2001.

BOTTOMLEY, P. J. Ecology of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 293-348.

BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de ¹⁵N. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1215-1226, 2009.

BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J.; THIES, J.E. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. **Plant and Soil**, v.174, p.143-180, 1995.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, p. 359-366, 2010.

CHALK, P. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Integrated effects of abiotic stresses on inoculants performance, legume growth and symbiotic dependence estimated by ^{15}N dilution. **Plant and Soil**, v. 328, p. 1-16, 2010.

CHEN, H.; GARTNER, E.; ROLFE, B. G. Involvement of genes on a megaplasmid in the acid-tolerant phenotype of *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1058-1064, 1993a.

CHEN, H.; RICHARDSON, A. E.; ROLFE, B.G. Studies on the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1798-1804, 1993b.

CHI, F.; SHEN, S.; CHENG, H.; JING, Y.; YANNI, Y.G.; DAZZO, F. B. Ascending Migration of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7271-7278, 2005.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, terceiro levantamento, dezembro 2010. Brasília, DF, 2010. 47p. Disponível em:<<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 06 fev 2011.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; LOVATO, A.; MAIA, A. H. N.; MANFIO, G.P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated soybeans. **Applied Soil Ecology**, v. 13, p. 159-167, 1999.

CSONKA, L. N.; HANSON, A. D. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 569-606, 1991.

DAKORA, F. D. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. **New Phytologist**, v. 158, p. 39-49, 2003.

DANSO, S. K. A.; OWIREDU, J. D. Competitiveness of introduced and indigenous cowpea *Bradyrhizobium* strains for nodule formation on cowpeas [*Vigna unguiculata* (L.) walp.] in three soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 305-310, 1988.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg: legume diversity in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, v. 131, p. 900-910, 2003.

DUODU, S.; BHUVANESWARI, T. V.; GUDMUNDSSON, J.; SVENNING, M. M. Symbiotic and saprophytic survival of three unmarked *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* strains introduced into the field. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1049-1058, 2005.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Embrapa, Brasília, 1999. 370p.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa do Solo. 1997. 212p.

FALL, L.; DIOUF, D.; FALL-NDIAYE, M. A.; BADIANE, F.A.; GUEYE, M. Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] varieties determined by ARA and RAPD techniques. **African Journal of Biotechnology**, v.2, p. 48-50, 2003.

FENING, J. O.; DANSO, S. K. A. Variation in symbiotic effectiveness of cowpea bradyrhizobia indigenous to Ghanaian soils. **Applied Soil Ecology**, v.21, p. 23–29, 2002.

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

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 835-842, 2003.

FETTELL, N. A.; O'CONNOR, G. E.; CARPENTER, D. J.; EVANS, J.; BAMFORTH, I.; OTI-BOATENG, C.; HEBB, D. M.; BROCKWELL, J. Nodulation studies on legumes exotic to Australia: the influence of soil populations and inocula of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* on nodulation and nitrogen fixation by field peas. **Applied Soil Ecology**, v.5, p. 197-210, 1997.

FILGUEIRAS, G. C.; SANTOS, M. A. S.; HOMMA, A. K. O.; REBELLO, F. K.; CRAVO, M. S. Aspectos socioeconômicos. In: ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. (Ed.). **A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira**. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2009. p. 23-58.

FLEISCHMAN, D.; KRAMER, D. Photosynthetic rhizobia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1364, p. 17-36, 1998.

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M.; SILVA, K.; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agrícola**, v.66, p.667-676, 2009.

FLOWERS, T. J.; GAUR, P. M.; GOWDA, C. L. L.; KRISHNAMURTHY, L.; SAMINENI, S.;SIDDIQUE, K. H. M.; TURNER, N. C.; VADEZ, V.; VARSHNEY, R. K.; COLMER, T. D. Salt sensitivity in chickpea. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 490-509, 2010.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C. Manejo nutricional integrado na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade dos sistemas produtivos utilizando a fixação biológica de nitrogênio como fonte de nitrogênio. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramenta para uma agricultura sustentável**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. p. 202-220.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 897-983, 1997.

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; VIEIRA, C.; TSAI, S. M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1145-1150, 2002.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa, 2005, 519 p.

FREIRE FILHO, F. R.; VILARINHO, A. A.; CRAVO, M. S.; CAVALCANTE, E. S. Panorama da cultura do feijão-caupi no Brasil. In: workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima, 2007. **Anais**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. p. 02-12 (Embrapa Roraima. Documentos, 4).

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, p. 470-476, 2008.

FUJIHARA, S. Biogenic amines in rhizobia and legume root nodules. **Microbes Environments**, v. 24, p. 1-13, 2009.

FUJIHARA, S.; YONEYAMA, T. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* p220 and *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1104-1109, 1993.

GENTILI, F.; HUSS-DANEL, K. Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana*. **Journal of Experimental Botany**, V. 54, p. 2757-2767, 2003.

GIRAUD, E.; HANNIBAL, L.; FARDOUX, J.; VERMÉGLIO, A.; DREYFUS, B. Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene*

sensitive. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 14795-14800, 2000.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, Rockville, v.131, p.872-877, 2003.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1389-1398, 2004.

HAFEEZ, F.; HAMEED, S.; AHMAD, T.; MALIK, K. Competition between effective and less effective strains of *Bradyrhizobium* spp. for nodulation in *Vigna radiata*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 382-386, 2001.

HAFEEZ, F.Y.; NAEEM, F.; SHAHEEN, N.; MALIK, K.A. Nodulation of *Sesbania* spp., by introduced rhizobia in competition with naturalized strains in different soil types. **Pakistan Journal of Botany**, v.39, p. 919-929, 2007.

HARTWIG, U. A. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 1, p. 92-120, 1998.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1–18, 2008.

HIRSCH, P. R. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia In: The Field. **New Phytologist**, v. 133, p. 159-171, 1996.

HOUNGNANDAN, P.; SANGINGA, N.; WOOMER, P.; VANLAUWE, B.; VAN CLEEMPUT, O. Response of *Mucuna pruriens* to symbiotic nitrogen fixation by rhizobia following inoculation in farmers' fields in the derived savanna of Benin. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 558-565, 2000.

HOWIESON, J.; BALLARD, R. Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia - some contemporary thoughts. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1261-1273, 2004.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO: SOLOS, SUSTENTABILIDADE E QUALIDADE AMBIENTAL, 2005, Recife, PE. **Anais...** Recife: Palestra, organizadores: UFRPE e Embrapa Solos UEP/Recife, 17 a 22 de julho de 2005.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MEGÍAS, M.; LAMRABET, Y.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F. J.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, v. 288, p. 343-356, 2006.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

ISRAEL, D. W. Investigation of the Role of Phosphorus in Symbiotic Dinitrogen Fixation. **Plant Physiology**. v. 84, p. 835-840, 1987.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. SILVA. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.769-776, 2005.

KAHINDI, J. H. P.; WOOMER, P.; GEORGE, T.; MOREIRA, F. M. S.; N. K. KARANJA, N. K.; GILLER, K. E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 6, p. 55-76, 1997.

KIMITI, J. M.; ODEE, D. W. Integrated soil fertility management enhances population and effectiveness of indigenous cowpea rhizobia in semi-arid eastern Kenya. **Applied Soil Ecology**, v. 45, p. 304-309; 2010.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 459–93, 2004.

KRASOVA-WADE, T.; DIOUF, O.; NDOYE, I.; SALL, C. E.; BRACONNIER, S.; NEYRA, M. Water-condition effects on rhizobia competition for cowpea nodule occupancy. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.1457-1463, 2006.

LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R., RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco river valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1215-1226, 2009.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1095-1104, 2005.

LOPEZ-GARCIA, S.; VASQUEZ, T. E. E.; FAVELUKES, G.; LODEIRO, A. R. Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean. **Environmental Microbiology**, v.4, P.216–224, 2002.

LOVATO, T.; MIELNICZUK, J.; BAYER, C.; VEZZANI, F. Adição de carbono e nitrogênio e sua relação com os estoques no solo e com o rendimento do milho em sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 175-187, 2004

MANCHANDA, G.; GARG, N. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 595-618, 2008.

MARTINEZ-ROMERO, E. Coevolution in rhizobium-legume symbiosis? **DNA and Cell Biology**, v. 28, p. 361-370, 2009.

MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Rhizobium phylogenies* and bacterial genetic diversity. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 15, p. 113-140. 1996.

MARTINS, L. M.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p. 333–339, 2003.

MATIRU, V. N.; DAKORA, F. D. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p.1-7, 2004.

MCINNES, A.; THIES, J. E.; ABBOTT, L.K.; HOWIESON, J.G. Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1295-1308, 2004.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S; NÓBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.235-246, 2006.

MELO, F. B; CARDOSO, M. J.; SALVIANO, A. A. C. Fertilidade do solo e adubação. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa, 2005, p. 229-242.

MELO, S. R.; ZILLI, J. E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1177-1183, 2009.

MENOSSO, O. G.; COSTA, J. A.; ANGHINONI, I.; BOHNEN H. Crescimento radicular e produção de ácidos orgânicos em cultivares de soja com diferentes tolerâncias ao alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1339-1345, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 30, DE, 17 DE NOVEMBRO DE 2010.** Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 17 de novembro de 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **PORTARIA Nº 325, DE 14 DE SETEMBRO DE 2009.** Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 17 de setembro de 2009.

MOLOUBA, F.; LORQUIN, J.; WILLEMS, A.; HOSTE, B.; GIRAUD, E.; DREYFUS, B.; GILLIS, M.; LAJUDIE, P.; BOIVIN-MASSON, C. Photosynthetic *Bradyrhizobia* from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3084-3094, 1999.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam *Leguminosae*. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras, MG: UFLA, 2008, p. 621-678.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2008. 729p.

MUSIYIWA, K.; MPEPEREKI, S.; GILLER, K. E. Symbiotic effectiveness and host ranges of indigenous rhizobia nodulating promiscuous soyabean varieties in Zimbabwean soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p. 1169-1176, 2005.

NASCIMENTO, L. R. S.; SOUSA, C. A.; SANTOS, C. E. R. S. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SAMPAIO, E. V. S. B. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, p.36-42, 2010.

NAZIH, N.; WEAVER, R. W. Numbers of clover rhizobia needed for crown nodulation and early growth of clover in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.17, p. 121–124, 1994.

NDIAYE, M. A. F.; SPENCER, M. M.; GUEYE, M. Genetic variability in dinitrogen fixation between cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] cultivars determined using the nitrogen-15 isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.32, p. 318–320, 2000.

NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume bacteriology. In: SHAM, N.H.; BRYAN, W.W. (Ed.). **Tropical pasture research: principles and methods**. Hurley: Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, 1976. p.134-174. (Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops. Bulletin, 51).

OLIVEIRA, I. P.; CARVALHO, A. M. A cultura do caupi nas condições de clima e de solo dos trópicos úmido e semi-árido do Brasil. In: ARAUJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Ed). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p. 63-96.

OSUNDE, A. O; GWAM, S.; BALA, A.; SANGINGA, N.; OKOGUN, J. A. Responses to rhizobial inoculation by two promiscuous soybean cultivars in soils of the Southern Guinea savanna zone of Nigeria. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p. 274-279, 2003.

PAPAKOSTA, D. K. Effect of Inoculant Rate on Nodulation and Various Agronomic Traits of Soybean. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.168, p. 238–242, 1992.

PARKER, M. A. Mutualism as a constraint on invasion success for legumes and rhizobia. **Diversity and distributions**. V. 7, p. 125-136, 2001.

PULE-MEULENBERG, F.; BELANE, A. K.; KRASOVA-WADE, T.; DAKORA, F. Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. **BMC Microbiology**. v. 10, p. 89-100, 2010.

RAPOSEIRAS, R.; MARRIEL, I. E.; MUZZI, M. R. S.; PAIVA, E.; PEREIRA FILHO, I. A.; CARVALHAIS, L. C.; PASSOS, R. V. M.; PINTO, P. P.; SÁ, N. M. H. *Rhizobium* strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.439-447, 2006.

REITER, B.; BÜRGMANN, H.; BURG, K.; SESSITSCH, A. Endophytic nifH gene diversity in African sweet potato. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 549-555, 2003.

RESH, S. C.; BINKLEY, D.; PARROTTA, J. A. Greater soil carbon sequestration under nitrogen-fixing trees compared with *Eucalyptus* species. **Ecosystems**, v. 5, p. 217-231, 2002.

RIBEIRO, M. R. Caracterização e classificação dos solos de referência do estado de Pernambuco; Universidade Federal Rural de Pernambuco. Impresso: Recife, Pernambuco, Brasil. 1999

ROHLF, F. J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate data analysis system, version 2.01. New York: Exeter, 2000. Software.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa, 2005, p. 279-335.

RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; MORGADO, L.B.; NEVES, M.C.P. Feijão-caupi tem uma nova estirpe de rizóbio, BR3267, recomendada como inoculante. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 16p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15).

SANGINGA, N.; ABAIDOO, R. C.; DASHIELL, K.; CARSKY, R. J.; OKOGUN, J. A. Persistence and effectiveness of rhizobia nodulating promiscuous soyabean in moist savanna zones of Nigeria. **Applied Soil Ecology**, v.3, p. 215–224, 1996.

SANGINGA, N.; THOTTAPPILLY, G; DASHIELL, K. Effectiveness of rhizobia nodulating recent promiscuous soyabean selections in the moist savanna of Nigeria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 127-133, 2000.

SANTOS, C. E. R. E. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; WARDSON, L. B.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciência Agrária**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SOUTO, S. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efetividade de rizóbios isolados da região nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea*). **Acta Scientia Agronômica**, Maringá, v. 27, p. 301-307, 2005.

SAS INSTITUTE INC. SAS Learning Edition 2.0. Cary: SAS Institute Inc, 2006.

SHARMA, P. K.; SARITA, S.; PRELL, J. Isolation and characterization of an endophytic bacterium related to Rhizobium/Agrobacterium from wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Current Science**, v. 89, p. 608-610, 2005.

SILVA, E. F. L.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; NUNES, L. P. L.; CARNEIRO, R. F. V. Fixação biológica do N₂ em feijão-caupi sob diferentes doses e fontes de fósforo solúvel. **Bioscience Journal**, v.26, p. 394-402, 2010.

SINGLETON, P. W.; TAVARES, J. W. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous rhizobium populations. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 1013-1018, 1986.

SOARES, A. L. L.; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, J. P. A. R.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG): II - feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p. 803-811, 2006.

SPRENT, J. I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**, v. 161, p. 1-10. 1994.

SPRENT, J. I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. **New Phytologist**. v. 174, p. 11-25, 2007.

SULIEMAN, S.; FISCHINGER, S.; SCHULZE, J. N-feedback regulation of N₂ fixation in *Medicago truncatula* under P-deficiency. **General and Applied Plant Physiology**, v. 34, p.33-54, 2008.

SYSTAT SOFTWARE INC. Sigmaplot. 10.0, Systat Software Inc., 2006.

TEIXEIRA, M. L. F.; COUTINHO, H. C. L.; FRANCO, A. A. Effects of *Cerotoma arcuata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on predation of nodules and on N₂ of *Phaseolus vulgaris* Row crops, forage and small grains. **Entomological Society of America**, v. 89, p. 165-169, 1996.

THIES, J. E.; WOOMER, P. L.; SINGLETON, P. W. Enrichment of *Bradyrhizobium* spp. populations in soil due to cropping of the homologous host legume. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 633-636, 1995.

TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Molecular Plant-Microbe Interact.** v.3, p.199-206, 1990.

URENHA, L. C.; PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; BONOMI, A. Produção de massa celular de rizóbio. In: HUNGRIA M.; ARAÚJO, R. S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola**. Brasília, DF: Embrapa,1994, p. 95-137.

VAN BERKUM, P.; TULLY, R. E.; KEISTER, D. L. Nonpigmented and bacteriochlorophyll-containing bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene indica*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 623–629, 1995.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, v. 157, p. 423-447, 2003.

VENKATESWARLU, B.; HARI, K.; KATYAL, J. C. Influence of soil and crop factors on the native rhizobial populations in soils under dryland farming. **Applied Soil Ecology**, v. 7, p. 1-10, 1997.

VENKATESWARLU, B.; MAHESWARII, M.; REDDY, G. S. Relationship between nodulation, nitrogen fixation rate, n-harvest index and kernel yield in different groundnut varieties under dryland conditions. **Oléagineux**, v. 46, p. 239-243. 1991.

VIEIRA NETO, S. A.; PIRES, F. R.; MENEZES, C. C. E.; MENEZES, J. F. S.; SILVA, A. G.; SILVA, G. P.; ASSIS, R. L. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 861-870, 2008.

VILARINHO, A. A.; FREIRE, F. R. Programa de melhoramento do feijão-caupi na Embrapa. In: workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima, 2007. **Anais**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. p. 32-36 (Embrapa Roraima. Documentos, 4).

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).

WANG, H.; MAN, C. X.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diversity of rhizobia and interactions among the host legumes and rhizobial genotypes in an agricultural-forestry ecosystem. **Plant and Soil**, v. 314, p. 169-182, 2009.

WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G.; GLENN, A. R. Physiological responses to acid stress of an acid-soil tolerant and an acid-soil sensitive strain of *Rhizobium*

leguminosarum biovar *trifolii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 621-624, 2003.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. A.; RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, v.19, p. 25-33, 2006.

YATES, R.J.; HOWIESON, J.G.; REEVE, W.G; BRAU, L.; SPEIJERS, J.; NANDASENA, K.; REAL, D.; SEZMIS, E.; O'HARA, G.W. Host–strain mediated selection for an effective nitrogen-fixing symbiosis between *Trifolium* spp. and *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p.822–833, 2008.

YUHASHI, K.; ICHIKAWA, N.; EZURA, H.; AKAO, S.; MINAKAWA, Y.; NUKUI, Y.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K. Rhizobitoxine production and competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.2658–2663, 2000.

ZAHRAN, H. H. DNA-DNA hybridization of some root-nodule bacteria indigenous in the salt-affected soils of Egypt. **Folia Microbiologica**, v. 37, p.295-298, 1992.

ZAHRAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 143-153, 2001.

ZAHRAN, H. H. Rhizobium–legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 968-989, 1999.

ZAHRAN, H. H.; RASANEN, L. A.; KARSISTO, M.; LINDSTROM, K. Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. **World Journal Microbiol. Biotechnology**, v. 10, p. 100-105, 1994.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**. v.39, p. 749-758, 2009a.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão-caupi em Roraima. In: Workshop sobre a Cultura do Feijão-Caupi em Roraima. Embrapa Roraima, 2007. **Anais**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. p. 50-55 (Embrapa Roraima. Documentos, 4).

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE-FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 811-818, 2006.

ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE-FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 281-287, 2004.

ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; MOREIRA, F.M.S.; FREITAS, A.C.R. OLIVEIRA, L.A. Fixação biológica de nitrogênio. In: ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. (Ed.). **A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira**. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2009b. p. 185-22.

APÊNDICE

Apêndice A. Resumo da análise de variância para as variáveis utilizadas na construção dos modelos de regressão: número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (MSN), biomassa seca da parte aérea (MSPA), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), acúmulo de fósforo na parte aérea (APPA) e biomassa seca da raiz (MSR)

Fonte de variação	NN	MSN	MSPA	ANPA	APPA	MSR
	Pr > F					
Nº cr	<0,0001	0,0009	0,0020	0,0020	0,0009	0,4635
R ²	0,78	0,56	0,59	0,59	0,47	-
r	0,88	0,75	0,77	0,77	0,68	-
C V (%)	11	14	22	22	15	41

Nº cr = número de células de rizóbio semente⁻¹

Apêndice B. Resumo da análise de variância das variáveis analisadas no experimento em substrato estéril: biomassa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (MSN) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA)

Fonte de variação	NN	MSN	MSPA	ANPA
	Pr > F			
Inoculação	<0,0000	<0,0000	0,0996	0,0055
R ²	0,95	0,95	0,50	0,66
CV (%)	10	15	25	31

Dados de ANPA transformados por Log₁₀ (x); dados de NN transformados por Log₁₀ (x+2); dados de MSN transformados por \sqrt{x}