

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola**

**FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDO À INOCULAÇÃO COM  
RIZÓBIO E CULTIVADO EM LATOSSOLO DO CERRADO  
MATOGROSSENSE**

**GISLANE RENATA FRIGO**

**RONDONÓPOLIS - MT**  
**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola**

**FEIJÃO CAUPI SUBMETIDO À INOCULAÇÃO COM  
RIZÓBIO E CULTIVADO EM LATOSSOLO DO CERRADO  
MATROGROSSENSE**

**GISLANE RENATA FRIGO**

Bióloga

Orientador: PROF. DR. SALOMÃO LIMA GUIMARÃES

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Federal de Mato Grosso, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

RONDONÓPOLIS - MT  
2013

### Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

F912f Frigo, Gislane Renata.  
Feijão-caupi submetido à inoculação com rizóbio e cultivado em Latossolo do Cerrado Matogrossense / Gislane Renata Frigo. -- 2013  
69 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Salomão Lima Guimarães.  
Co-orientadora: Edna Maria Bonfim da Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Rondonópolis, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Vigna unguiculata. 2. Bactérias nodulíferas. 3. Sustentabilidade. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**

**Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

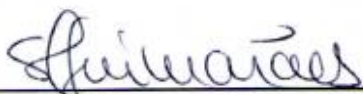
**Título:** FEIJÃO CAUPI SUBMETIDO À INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO E CULTIVADO EM LATOSSOLO DO CERRADO MATOGROSSENSE.

**Autora:** Gislane Renata Frigo.

**Orientador:** Dr. Salomão Lima Guimarães

Aprovada em 03 de dezembro de 2013.

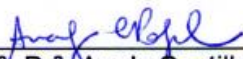
Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Salomão Lima Guimarães  
UFMT (orientador)



Prof. Dr. Jollson Silva Ferreira  
UESB (membro externo)



Prof. Dr. Anely Castilho Polizel  
UFMT (membro interno)

*"Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça. Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir."*

Cora Coralina.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que sempre me iluminou, me deu forças e guiou meus passos

Ao meu marido Douglas, que nunca me deixou desistir e sempre me incentivou.

À minha família, minha mãe, pai, irmão e irmã, pessoas que eu amo que me mostram quem sou e de onde posso tirar forças.

A meu professor orientador, Salomão Lima Guimarães, aquele que me mostra o caminho, tem muitos ensinamentos e muita paciência para me ensinar.

À minha professora co-orientadora, Edna Maria Bonfim da Silva, que sempre esteve disposta a me ajudar e aconselhar.

Ao coordenador do curso de pós-graduação em Engenharia Agrícola, Tonny José Araújo da Silva, que sempre lutou por todos nós.

Aos meus colegas de curso, que me incentivaram e sempre estiveram dispostos a me ajudar e compreender minhas dificuldades.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
FIGURA 1. Crescimento das estirpes de rizóbio em meio LMA. ....	30
FIGURA 2. Crescimento dos rizóbios C08 (a), BR3267 (b), C15 (c) em meio LMA, pH 8,0.....	31
FIGURA 3. Temperatura, umidade relativa e pluviosidade do campo experimental durante o desenvolvimento do experimento. ....	33
FIGURA 4. Preparo do solo (a); adubação fosfatada, potássica e semeadura (b); adubação nitrogenada do feijão-caupi em LATOSSOLO Vermelho do Cerrado (c). ....	35
FIGURA 5. Vista parcial do experimento aos 15 (a) e aos 21 (b) dias após a semeadura do feijão-caupi em LATOSSOLO Vermelho do Cerrado.....	36
FIGURA 6. Inoculação realizada em laboratório para a semeadura do feijão caupi, (a) sementes nuas; (b) sementes inoculadas via veículo turfoso.....	37
FIGURA 7. Leitura SPAD (a), altura (b) e determinação de massa seca de parte aérea (c) de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do Cerrado. ....	38
FIGURA 8. Eficiência relativa das estirpes de rizóbio inoculadas em feijão caupi cultivado em Latossolo do Cerrado. ....	53

## LISTA DE TABELAS

### Página

TABELA 1. Análise química do solo na profundidade 0-20 cm. ....	34
TABELA 2. Crescimento, diâmetro e alteração do pH das colônias dos rizóbios utilizados como inoculantes em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado. ....	44
TABELA 3. Crescimento em diferentes pH das colônias dos rizóbios utilizados como inoculantes em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado. ....	44
TABELA 4. Crescimento em diferentes temperaturas das colônias dos rizóbios utilizados como inoculantes em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado. ....	45
TABELA 5. Crescimento em diferentes concentrações de NaCl das colônias dos rizóbios utilizados como inoculantes em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado. ....	46
TABELA 6. Leitura SPAD, altura de plantas, massa seca da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR), massa seca total (MST), número de nódulos (NN), e massa seca de nódulos (MSN) em plantas de feijão-caupi inoculadas com rizóbio e cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado. ....	47
TABELA 7. Leitura SPAD aos 60 DAS; Massa de cem grãos (M 100 grãos), em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado. ....	51
TABELA 8. Nitrogênio total da parte aérea, (N total P. aérea) raízes (N total Raízes) e grãos (N total Grãos); proteína bruta de grãos (PB Grãos) em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado. ....	54
TABELA 9. Coeficientes de correlações entre as variáveis analisadas no experimento. ....	57



## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1 Descrição botânica e origem do feijão-caupi .....	17
2.2 Aspectos culturais e socioeconômicos do feijão-caupi .....	18
2.3 O Nitrogênio no sistema solo-planta .....	19
2.4 Fixação biológica de nitrogênio - FBN.....	21
2.5 Rizóbios .....	24
2.6 Inoculação de rizóbios em feijão-caupi .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 Caracterização fenotípica das estirpes de rizóbio .....	29
3.1.1 Crescimento das colônias .....	29
3.1.2 Diâmetro das colônias .....	30
3.1.3 Alteração do pH do meio .....	30
3.1.4 Crescimento em diferentes pH .....	30
3.1.5 Crescimento em diferentes temperaturas .....	31
3.1.6 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl. ....	31
3.2 Experimento de campo .....	32
3.3 Instalação do experimento .....	34
3.4 Cultivar utilizada.....	35
3.5 Delineamento experimental.....	35
3.6 Inoculação de sementes .....	36
3.7 Variáveis analisadas .....	37
3.8 Determinação de nitrogênio em tecido vegetal e proteína bruta em grãos.	39

3.8	Análises estatísticas .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
4.1	Caracterização fenotípica das estirpes de rizóbio .....	43
4.2	Experimento em campo .....	47
4.3	Correlações entre as variáveis .....	55
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

## **FEIJÃO CAUPI SUBMETIDO À INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO E CULTIVADO EM LATOSSOLO DO CERRADO MATOGROSSENSE**

**RESUMO** - Objetivou-se avaliar as características produtivas do feijão caupi inoculado com estirpes de rizóbio e cultivado em Latossolo Vermelho do Cerrado Matogrossense. Foram realizados dois experimentos um em laboratório e outro em campo. O experimento de laboratório consistiu de análise fenotípica dos rizóbios que foram utilizados como inoculantes. O experimento foi realizado no campo experimental da Universidade Federal de Mato Grosso, campus de Rondonópolis- MT, em delineamento de blocos casualizados, com sete tratamentos, sendo cinco estirpes de rizóbio (quatro pertencentes à coleção de cultura da UFMT, e uma estirpe comercial, a BR 3267), uma testemunha com adubação nitrogenada ( $75 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$ ) e um controle (sem inoculante ou adubação mineral), com seis repetições, totalizando quarenta e duas unidades experimentais. Aos 40 dias após a semeadura (DAS) foram coletadas seis plantas da área útil de cada parcela para determinação das variáveis altura de plantas, massa seca da parte aérea e raízes, massa seca total, número de nódulos, massa seca de nódulos e leitura SPAD, e N total das raízes e parte aérea. No período correspondente à formação dos grãos, aos 60 DAS, foi realizada novamente a leitura SPAD. Ao final do ciclo foram avaliadas eficiência relativa das estirpes de rizóbios, massa de cem grãos, N-total da parte aérea e raízes e proteína bruta dos grãos. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, empregando-se o programa de análises estatísticas SISVAR. Os resultados obtidos do experimento em laboratório foram aceitáveis para as cinco estirpes testadas, todas se desenvolveram bem em relação aos parâmetros analisados. Em relação às estirpes utilizadas no experimento de campo, a que demonstrou melhores resultados para número de nódulo foi a estirpe C15; para a determinação de nitrogênio do tecido vegetal e grãos, a estirpe que obteve os resultados mais satisfatórios foi a estirpe RZ23. A estirpe comercial BR3267 apresentou maior massa seca de parte aérea e raízes. Já

a testemunha nitrogenada apresentou maiores médias para leitura SPAD aos 40 DAS, altura de plantas massa seca de parte aérea e total. A inoculação com estirpes de rizóbio contribuiu para o desenvolvimento do feijão-caupi cultivado no Cerrado Matogrossense.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Vigna unguiculata*, bactérias nodulíferas, sustentabilidade.

## **COWPEA SUBJECTED TO RHIZOBIUM INOCULATION AND GROWN IN THE CERRADO OXISOL**

**ABSTRACT** - This study aimed to evaluate the productive characteristics of cowpea inoculated with rhizobia strains and grown in Oxisol of the Cerrado of Mato Grosso. Two experiments in laboratory and the other in the field were performed. The laboratory experiment consisted of phenotypic analysis of rhizobia which were used as inocula. The experiment was conducted in the experimental farm of the Federal University of Mato Grosso, campus Rondonópolis - MT, in a randomized complete block design with seven treatments, five strains of Rhizobium (four belonging to the culture collection of UFMT, and a commercial strain BR 3267), a witness to nitrogen fertilization ( $75 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) and a control (without inoculation or mineral fertilization), with six replicates, totaling forty two experimental units . At 40 days after sowing (DAS ) were collected from six plants of the floor area of each plot to determine the variables plant height, dry weight of shoots and roots, total dry weight, number of nodules, nodule dry mass and SPAD reading and total N of roots and shoots. In corresponding to the seed formation, at 60 DAS, period SPAD reading was performed again. At the end of the cycle relative efficiency of strains of rhizobia, weight of hundred grains, total N of shoots and roots of grain and crude protein were evaluated . Data were subjected to analysis of variance and the means were compared by Tukey test at 5 % probability, using the statistical analysis program SISVAR. The results of the laboratory experiment were acceptable for all five strains tested, all developed well in relation to the parameters analyzed. Regarding the strains used in the field experiment showed that the best results for number of nodules was the C15 strain, for the determination of nitrogen in plant tissue and grain, the strain that obtained the most satisfactory results was the strain RZ23. The commercial strain BR3267 showed greater dry mass of shoots and roots. Already nitrogen control presented higher means for SPAD readings at 40 DAS, plant height of dry mass of shoot and total.

Inoculation with rhizobia strains contributed to the development of cowpea grown in the Cerrado of Mato Grosso.**KEYWORDS:** *Vigna unguiculata*, nodulation bacteria, sustainability.

.

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é nativo da África, sendo bastante cultivado nas regiões tropicais dos continentes africano, asiático e americano, e constitui a principal fonte de proteína, principalmente para populações de baixa renda (Silva, 2006). É uma excelente fonte de proteínas (23-25%) e de carboidratos (62%), vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura, com teor de óleo de 2% (EMBRAPA, 2003).

O feijão caupi também conhecido como feijão de corda, se destaca no Nordeste brasileiro, como uma cultura de grande importância socioeconômica por ser a principal fonte de proteína vegetal para as populações, principalmente a rural (Almeida et al, 2010).

É uma cultura rústica, tolerante a altas temperaturas e à seca, desenvolvendo-se bem em áreas já exploradas. Contudo, apresenta baixa produtividade, com cerca de 300 a 400 Kg ha<sup>-1</sup> (Almeida et. al, 2010). Um dos fatores responsáveis pela baixa produtividade é a baixa fertilidade natural e dos teores de matéria orgânica dos solos, especialmente em áreas de Cerrado (Rahmeier, 2009).

Apesar de sua produtividade ser considerada baixa em função de utilizar poucos recursos tecnológicos para o cultivo, existem regiões como nos estados do Amazonas, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso onde a produtividade tem superado 1.000 kg ha<sup>-1</sup>. O avanço da cultura na região

central do Brasil poderá contribuir para o incremento da produtividade média brasileira, em função, principalmente, do uso de tecnologias que propiciam à cultura expressar seu potencial produtivo e também econômico (FAO, 2009).

De acordo com Barbosa et al. (2010), a cultura do feijão-caupi deixou de ser uma atividade exclusiva de subsistência para se tornar um potencial agrícola. Além disso, tem-se verificado uma expansão dessa cultura em sistema empresarial em pelo menos 22 municípios do estado de Mato Grosso, com uma estimativa de 120 mil hectares de área plantada.

Como forma de elevar a produtividade do feijão-caupi, baixar os custos de produção e elevar a renda do produtor rural, a fixação biológica de nitrogênio (FBN), através da adoção da prática de inoculação das sementes com estirpes eficientes de bactérias do grupo rizóbio tem sido uma prática bastante explorada (Zilli et al., 2009). Ainda, de acordo com os mesmos autores, o Brasil é o terceiro produtor de feijão-caupi, porém, tem sido observado déficit de oferta do produto da ordem de 60 mil toneladas apenas na região Norte, mostrando haver possibilidade para aumento da produção.

Dessa forma, a pesquisa deve ser pautada na ampliação da produtividade do feijão-caupi sem aumentar os custos de produção, principalmente no que se refere à adubação nitrogenada, uma vez que é uma cultura com alto potencial a ser explorado e que responde bem à inoculação com estirpes de rizóbio previamente selecionadas (Silva et al., 2006 a; Zilli et al., 2011).

Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da inoculação com estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado em Latossolo vermelho de Cerrado.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Descrição botânica e origem do feijão-caupi

O feijão-caupi é uma dicotiledônea, pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolina gênero *Vigna* e a espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Embora nas primeiras classificações tenha sido posto em outros gêneros, como *Phaseolus* e *Dolichos*, hoje sua colocação em *Vigna* é mundialmente aceita (Sellschop, 1962).

O gênero *Vigna* é amplamente difundido nas regiões tropicais. A maioria das espécies se encontra na África, e dessas, 66 são endêmicas. Entre as espécies que ocorrem neste continente está a *V. unguiculata* (L.) Walp (Freire Filho, 1988).

Sua inclusão na América Latina ocorreu pelos imigrantes espanhóis e portugueses, durante o século XVI, chegando ao Brasil provavelmente pelo estado da Bahia, e a partir daí foi levado a outros estados da região Nordeste e outras regiões do país (Freire Filho et al., 2005 a).

O feijão-caupi é uma cultura anual, apresentando germinação epígea, com seus cotilédones inseridos no primeiro nó do ramo principal. Seu sistema radicular é axial, com raízes superficiais, porém, podem atingir 2,0 m de profundidade, característica que confere a espécie tolerância a períodos extensos sem irrigação. Em suas raízes é comum encontrar nódulos que auxiliam na absorção de nitrogênio através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada por micro-organismos genericamente conhecidos como rizóbios (Chagas Junior et al., 2009).

Suas flores são do tipo cimeira, localizadas na axila da folha, com pedúnculos variando de acordo com as cultivares. Apresentam vagens com forma e tamanhos variáveis, suas sementes estão dispostas em fileiras, cuja forma, tamanho e cor de tegumento também variáveis com a cultivar (Mafra, 1979).

## **2.2 Aspectos culturais e socioeconômicos do feijão-caupi**

A cultura do feijão-caupi se desenvolve bem em temperaturas entre 18 e 30°C. Pode ser cultivado em qualquer tipo de solo, obtendo bons resultados em solos que apresentam regular teor de matéria orgânica. Solos com baixo índice de fertilidade pode ser cultivados, desde que as necessidades nutricionais forem subsidiadas por fertilizantes (EMBRAPA, 2004).

Em relação à pluviosidade, o mesmo autor descreve que a cultura possui bom desenvolvimento em regiões de precipitação média de 250 a 500 mm anuais. Variedades de ciclo médio como a analisada no estudo devem ser plantadas na metade do período chuvoso da região.

Em relação à densidade, para cultivares de ciclo médio a tardio, é indicada de 70 a 90 mil plantas por hectare, aproximadamente oito sementes por metro linear. O espaçamento entre linhas deve ser de 0,40 a 0,60 m para variedades de porte ereto (EMBRAPA, 2004).

No Brasil, a maior produção de feijão-caupi encontra-se na região Nordeste, onde constitui um dos principais componentes da dieta alimentar, além de ser um importante gerador de emprego e renda (Santos et al., 2008).

Essa cultura vem se difundindo para a região Norte e Centro-Oeste do Brasil, onde encontra condições edafoclimáticas favoráveis ao seu desenvolvimento. Na região Norte é cultivado como fonte de alimento e renda para a agricultura familiar. No Centro-Oeste, desde 2006 vem sendo cultivado em larga escala por grandes produtores, que utilizam técnicas e máquinas modernas (Freire Filho, 2011).

Segundo Freire Filho et al. (2005b), a área colhida, a produção e a produtividade de grãos do feijão-caupi variam muito de ano para ano em virtude, principalmente, das condições climáticas. Entre 1993 e 2001, a média anual da área colhida foi de 1.355,18 ha<sup>1</sup>, a produção foi de 429.375 t e a produtividade de 317 kg ha<sup>-1</sup>.

Ainda de acordo com Freire Filho (2011), a produtividade desta cultura vem aumentando a cada safra, médias de 2005 a 2009, mostram uma área de cultivo de 1.381.951 ha<sup>1</sup>, com produção de 505.233 t, atingindo produtividade em grãos de 365,5 Kg ha<sup>-1</sup>.

As baixas produtividades dessa cultura estão relacionadas, em grande parte, ao baixo nível tecnológico empregado na maioria dos cultivos. No entanto, nos últimos anos a cultura vem adquirindo maior expressão econômica, e seu cultivo têm sido realizados em áreas irrigadas, onde se empregam tecnologias mais adequadas na produção.

É importante mencionar que essa produtividade não reflete o potencial genético das cultivares melhoradas, sendo decorrente principalmente, dos sistemas de produção utilizados, onde, na maioria não são adotadas práticas visando o manejo de solo, de pragas e de doenças (Freire Filho et al., 2005a).

Na região Centro-Oeste, o cultivo do feijão-caupi foi intensificado a partir de 2006, representando ainda uma pequena fração da produção de grãos do país. Porém, sua produtividade tem superado as médias nacionais, tornando-se uma importante alternativa para a safrinha, fato este relacionado à aplicação de modernas técnicas de cultivo e sistema de irrigação artificial (Freire Filho, 2011).

### **2.3 O Nitrogênio no sistema solo-planta**

De acordo com Newton (2000), existem formas orgânicas do nitrogênio (N) em grande quantidade no solo, porém, indisponíveis às plantas. Na maioria dos solos agrícolas existe uma conversão contínua de nitrogênio orgânico a nitrato, durante a decomposição da matéria orgânica. Como as plantas podem incorporar o nitrogênio a partir da absorção de

nitratos, os fertilizantes nitrogenados viabilizam a nutrição vegetal, disponibilizando este nutriente no solo (Rahmeier, 2009).

De maneira geral, todos os compostos nitrogenados encontrados na natureza estão interligados de alguma forma e encontram-se em equilíbrio dinâmico entre formas livres e fixadas, fluindo dentro e fora do sistema solo-planta-atmosfera (Rahmeier, 2009).

Parte do nitrogênio do solo é oriundo da fixação do  $N_2$  atmosférico, quer seja por processos biológicos, industrial ou eletroquímico. O balanço de entrada (fixação) e saída (colheita, erosão e desnitrificação) desse nutriente no solo, que constitui o ciclo biogeoquímico do nitrogênio, deve se manter equilibrado para não afetar a sobrevivência dos demais organismos vivos existentes (Aduan et al., 2004).

O que ocorre muitas vezes é que a maior parte desse nitrogênio aplicado por meio da adubação mineral é perdida por meio de três processos:

- a) Lixiviação que ocorre com a infiltração deste nutriente na forma de nitrato para as camadas mais profundas do solo antes de ser absorvido pelas raízes das plantas, aumenta a concentração de  $H^+$  no solo, diminuindo o pH causando acidez;
- b) Volatilização, quando aplicado na forma de ureia ou sulfato de amônio, essas substâncias são voláteis o nutriente se perde para a atmosfera na forma gasosa (Duarte et al., 2007);
- c) Desnitrificação realizada em anaerobiose que consiste na transformação do nitrato em óxido nitroso ( $NO_2$ ) e nitrogênio molecular ( $N_2$ ), formas não assimiláveis pelas plantas que são rapidamente perdidos por volatilização (Mansell e Schroeder, 1998).

Entretanto, a assimilação dos compostos nitrogenados disponíveis deve ser rápida, para que não ocorra poluição ambiental, em decorrência da lixiviação dos nitratos para o lençol freático, atingindo os rios e lagos e trazendo consequência aos animais e ao homem, já que o nitrato é tóxico em concentrações relativamente baixas (Lopes et al., 2007).

Dos nutrientes minerais, o nitrogênio é o mais caro, o que consome mais energia para o processo de fabricação e potencialmente o mais poluente, sendo geralmente o mais limitante à produção vegetal (Franco e Baliero, 1999).

O Brasil é exceção desse cenário, é onde se usa menos nitrogênio mineral. Parte da nutrição nitrogenada da planta, principalmente leguminosas é realizada pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) assumindo uma postura importante, na busca de novas alternativas de produção, mais adequadas às condições tropicais (Franco e Baliero, 1999; Lopes et al., 2007).

No entanto, a incorporação do N atmosférico por alguns micro-organismos ao sistema solo-planta-atmosfera, já era conhecido desde o início do século XX e muitos investimentos já foram efetuados visando entender e maximizar a contribuição da FBN para a produção de alimentos.

#### **2.4 Fixação biológica de nitrogênio - FBN**

As plantas da família das leguminosas conseguem a maior parte deste nutriente diretamente da atmosfera, devido às associações com bactérias do gênero *Rhizobium*. Isso ocorre devido uma relação simbiótica onde a planta oferece ao micro-organismo metabólitos, enquanto a bactéria se instala na raiz formando nódulos, realizando a conversão do nitrogênio atmosférico para a forma de amônia. (Figueiredo et al., 2008; Taiz e Zeiger, 2004).

Esse processo é importante para os solos tropicais que naturalmente são deficientes em nitrogênio, e pode representar uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos nitrogenados, com as vantagens de ser economicamente viável e não causar poluição ao meio ambiente (Figueiredo et al., 2008).

A FBN é um processo natural no qual, bactérias conhecidas como rizóbios, além de outros micro-organismos procariotos, são capazes de captar nitrogênio do ar, transformando-o em amônia, uma forma prontamente assimilável quando associados a plantas da família

Leguminosa, e capaz de contribuir para o desenvolvimento de espécies cultivadas desta família (Rumjanek et al., 2006; Taiz e Zeiger, 2004).

O processo de fixação em leguminosas ocorre com a infestação do rizóbio na raiz provocando a formação de nódulos que originarão colônias de bactérias, as quais por meio de processo bioquímicos fixam nitrogênio (N) na planta. Os nódulos possuem uma heme proteína, a leg-hemoglobina, que se liga ao oxigênio, impedindo que este reaja com a nitrogenase (Taiz e Zeiger, 2004).

A formação de nódulos é um processo complexo, que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas tanto na célula hospedeira, como na bactéria. As mudanças na bactéria visam, principalmente, o recebimento de fontes de C da planta hospedeira, para prover o ATP e o poder redutor necessários para o processo de FBN. As mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (Hungria et al., 1994). Para que ocorra o processo de nodulação, ambos, bactérias simbióticas e planta hospedeira, desenvolveram um complexo sistema de integração mantendo, assim, uma comunicação molecular. Esse sistema faz com que bactérias simbióticas vivendo saprofiticamente no solo, percebam sinais químicos sintetizados pela planta hospedeira. A planta hospedeira libera compostos que fazem com que as bactérias simbiotes sejam atraídas em direção às raízes, por quimiotactismo (Drozdowicz, 1991).

As bactérias aderem aos pelos radiculares das plantas, em um processo relativamente estável e irreversível, que ocorre em duas etapas: inicialmente, as células isoladas aderem à superfície radicular, provavelmente a sítios específicos e, em seguida, outras bactérias aderem às que já estão presas aos pêlos radiculares (Hungria et al., 1997). Neste momento, alguns compostos, em geral, atuam como sinais moleculares e induzem a transcrição de genes de nodulação (nod, noe, nol) nas bactérias, conduzindo à síntese dos fatores Nod.

Os benefícios da FBN na cultura do feijão-caupi incluem, além do suprimento de nitrogênio para o desenvolvimento das plantas, o

fornecimento de nitrogênio na forma de proteína à alimentação humana através do consumo de grãos que podem ser verdes ou secos e o aporte de quantidade significativa de N (nitrogênio) ao solo, por meio dos restos culturais, que podem contribuir para a elevação da matéria orgânica e fertilidade do solo para acultura em sucessão (Urquiaga e Zapata, 2000).

A FBN envolve processos metabólicos bioquímicos que ocorrem de forma simbiótica entre a planta e o micro-organismo. Este processo envolve gasto de energia, fornecida pela planta na forma de ATP (adenosina trifosfato), molécula resultante do processo de fotossíntese realizada nos cloroplastos dos organismos fotossintetizantes.

O nitrogênio elementar ( $N_2$ ) não é absorvido pelo vegetal, cabem às bactérias fixadoras realizarem uma reação de redução desta molécula, resultando em duas moléculas de amônia ( $NH_3$ ), molécula que apresenta o nitrogênio de forma assimilável. De acordo com Simpson e Burris (1984), a reação de fixação pode ser representada pela seguinte equação:



Para que essa reação aconteça, há necessidade de uma enzima para catalisar o processo, a enzima nitrogenase. Esta enzima além de catalisar a redução de  $N_2$  a amônia, reduz prótons a hidrogênio (Kim e Rees, 1994).

Até meados da década de 1980, estudos mostravam que a nitrogenase era ativa somente com a presença de Mo (molibdênio). Essa enzima é denominada de nitrogenase clássica (Dean e Jacobson, 1992).

De acordo com Bishop et al. (1980) e Robson et al. (1986), o complexo nitrogenase pode atuar de forma independente, de acordo com o metal que está presente para o processo de catálise.

Nesse caso, a nitrogenase 1 (clássica), dependente de Mo codificada por genes *nif*; a nitrogenase 2, dependente do V (vanádio), codificada por genes *vnf*; a nitrogenase 3 dependente de Ferro (Fe) – codificada por genes *anf* (Evans e Burris, 1992, Teixeira, 1997).

A nitrogenase 1, descrita anteriormente, só é expressa em meio contendo Mo e se encontra presente em todos os micro-organismos diazotróficos estudados até o momento.

A reação de conversão de nitrogênio elementar em amônia segue três processos de transferência de elétrons:

- a) redução da Fe-proteína por carreadores de elétrons;
- b) transferência de um único elétron a partir da Fe-proteína para a MoFe-proteína através de um processo dependente de Mg-ATP (no mínimo 2 Mg-ATP/elétron transferido);
- c) transferência de elétron para o substrato ligado ao sítio ativo da MoFe-proteína (Teixeira et al, 1998).

## 2.5 Rizóbios

Os rizóbios são micro-organismos presentes no solo, capazes de realizar simbiose com leguminosas com o objetivo de fixar nitrogênio em suas raízes por meio da nodulação (Fernandes et al. 2003).

Com base nos dados de sequenciamento do gene ribossomal 16S, existem atualmente cinco gêneros de rizóbios escritos, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* e mais de 40 espécies na subclasse alfa das proteobactérias ( Garrity e holt, 2001).

A maioria desses microorganismos é capaz de nodular mais que uma espécie e algumas espécies são denominadas promíscuas, pois nodulam com diversas estirpes desse gênero (Zilli et al., 2013, Fernandes et al., 2003).

Um exemplo comum é a simbiose mutualística realizada com bactérias do gênero *Rizhobium* que nodulam raízes de leguminosas e fixam nitrogênio a partir de reações na presença de enzimas específicas. O processo depende de fatores fisiológicos da planta, que fornece ao micro-organismo subsídios de sobrevivência e nutrição como os flavonoides (Chagas Junior, 2009).

A proliferação de colônias e formação dos nódulos em leguminosas segue processos bioquímicos e fisiológicos. A planta lança no solo



metabólitos de atração às bactérias. Ao receber o sinal, as mesmas realizam o reconhecimento das células do córtex radicular e aderem aos pelos, promovendo um encurvamento (Santos e Reis, 2008).

A partir do encurvamento do pelo radicular, há a formação de um cordão de infecção que adentra pelo córtex das raízes sem causar dano anatômico ou fisiológico, ocorre a proliferação dos rizóbios que assumem a forma de bacteroides (alteração morfofisiológica) para fixação de nitrogênio. A bactéria assume essa forma até o completo ciclo da leguminosa (Stralotto e Teixeira, 2000).

Após o término do ciclo reprodutivo, ocorre a senescência dos nódulos, e o rizóbio volta a sua morfologia e fisiologia normal, permanecendo no solo (Hungria et. al, 1994).

De acordo com Xavier et. al, (2007) para que um nódulo desempenhe sua função é necessário que haja uma constante troca de substâncias entre o bacteroide e a planta. Por isso é necessário que seja mantida a nutrição mineral essencial para o desenvolvimento da cultura de acordo com suas necessidades. Além disso, há fatores externos que afetam o desenvolvimento das infestações, comprometendo a simbiose entre o rizóbio e a planta. Dentre eles:

*Acidez do solo:* rizóbios são sensíveis à acidez e toxicidade por alumínio (Al) e manganês (Mn). Neste caso há a necessidade de se realizar um levantamento de estirpes adaptadas a estas condições.

*Temperatura:* o desenvolvimento das colônias nodulíferas é desfavorável em temperaturas abaixo de 10°C e acima de 37°C. Temperaturas abaixo deste mínimo interferem na reprodução das bactérias, enquanto que temperaturas muito altas desnaturam as proteínas formadoras do DNA, comprometendo a reprodução dos rizóbios (Xavier et al., 2007).

A pesquisa por estirpes de rizóbios capazes de nodular leguminosas e supri-las em nitrogênio vem sendo desenvolvida com grande ênfase nas regiões Norte e Centro-Oeste do país. De acordo com Medeiros et al. (2009), a diversidade de rizóbios nativos é muito importante, pois é a partir

dessa característica que se iniciam os processos laboratoriais de seleção das estirpes que possibilitem maior fixação de nitrogênio.

Esses estudos visam à obtenção de estirpes eficientes, adaptadas às condições edafoclimáticas locais e competitivas em relação à população nativa. Em ecossistemas naturais, vários autores têm encontrado alta diversidade genética dentro de populações de rizóbio (Hungria et al., 2001; Zilli et al., 2004).

Segundo Jesus et al. (2005), a avaliação das características culturais e morfológicas é o primeiro passo para a identificação de novos grupos taxonômicos de microrganismos e é muito útil em laboratórios que não têm acesso a tecnologias mais caras, pois essas avaliações são de baixo custo.

De acordo com o mesmo autor, esse processo é facilitado com o uso de plantas-isca e isolamento das bactérias a partir dos nódulos formados. As características morfofisiológicas dos rizóbios, tais como o tempo de crescimento, alteração do pH, consistência do muco produzido, além de outras, fornecem informações importantes para a identificação e agrupamento de estirpes.

Segundo Santos et al. (2007), esses métodos fenotípicos de análise de características culturais de microrganismos possuem a vantagem de serem rápidos, permitindo uma análise prévia da diversidade e oferecendo vantagens em relação aos métodos genotípicos, na obtenção de microrganismos isolados que poderão ser armazenados e usados posteriormente.

O sistema de taxonomia microbiana atual aborda uma análise conjunta de dados de morfologia, fisiologia, sorologia e diferentes ferramentas baseadas nos ácidos nucléicos, utilizando métodos estatísticos de avaliação das diferenças e similaridades entre os micro-organismos, e fornece, assim, medidas quantitativas de similaridade entre microrganismos (Medeiros et al., 2009).

## 2.6 Inoculação de rizóbios em feijão-caupi

A cultura do feijão-caupi é bastante exigente em relação ao suprimento de nitrogênio, isso porque a maior parte deste nutriente, índices que atingem 50% do total absorvido pela planta, é exportado para os grãos (Santos e Silva, 2002).

De acordo com os autores citados, visando o suprimento das necessidades da cultura esse nutrientes é viabilizado pela matéria orgânica, por fontes minerais por meio de adubos e também por fixação biológica realizada por estirpes de rizóbios. A adição desses micro-organismos às sementes se dá por meio da inoculação.

Segundo Zilli et al. (2009), o feijão-caupi apresenta capacidade de nodular com várias espécies de bactérias do grupo rizóbios inoculadas ou nativas dos solos brasileiros. De acordo com os autores citados, existem importantes diferenças entre as estirpes bacterianas na eficiência da fixação biológica de  $N_2$  quando em simbiose com essa cultura como, por exemplo, tolerância a diferentes pH, salinidade e temperatura do solo.

Os inoculantes podem ser adicionados de diferentes formas:

- a) Inoculação de sementes: que pode ser por *veículo turfoso*, onde adiciona-se às sementes selecionadas solução açucarada e a quantidade de turfa já inoculada com o respectivo rizóbio, realizar este processo com materiais esterilizados impedindo a contaminação. Retirar as sementes expô-las sob a sombra para que ocorra a secagem das mesmas, realizar a semeadura em seguida (Hungria et al, 2001). *Inoculante líquido*: aplicar nas sementes a quantidade indicada, deixar secar a sombra e proceder com a semeadura (Embrapa, 2009).
- b) Inoculação no sulco de semeadura: consiste na aplicação via aspersão do inoculante líquido no sulco da semeadura, que deve ser composto de solução mínima de  $50 \text{ L ha}^{-1}$ . A utilização desse método se torna eficaz e segura, desde que seja utilizada uma dose seis

vezes maior do que a recomendada pela inoculação de sementes (Embrapa, 2004).

Esse método apresenta como vantagens a redução da toxidade das sementes pelo tratamento realizado com fungicidas.

Em relação às vantagens pautadas aos métodos, a inoculação das sementes é a forma mais barata, muito utilizada por pequenos produtores e agricultores familiares. A inoculação no sulco de semeadura tem maior custo econômico, pois a dosagem a ser diluída para a pulverização é muito maior como já relatado.

A utilização de inoculantes é uma forma ambientalmente correta de fornecimento de nitrogênio para leguminosas e outras culturas que se associam com micro-organismos diazotróficos. É também a forma mais econômica de suprimento deste nutriente, a qual pode ser desenvolvida tanto por pequenos agricultores que cultivam para sua subsistência, como por grandes produtores.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Caracterização fenotípica das estirpes de rizóbio**

Foi realizada a caracterização fenotípica das estirpes de rizóbio, pertencentes à coleção de culturas da UFMT, utilizadas no experimento de campo, com o intuito de agrupá-las de acordo com as características expostas.

As estirpes foram isoladas a partir de plantas iscas por meio de experimentos desenvolvidos em ambiente controlado.

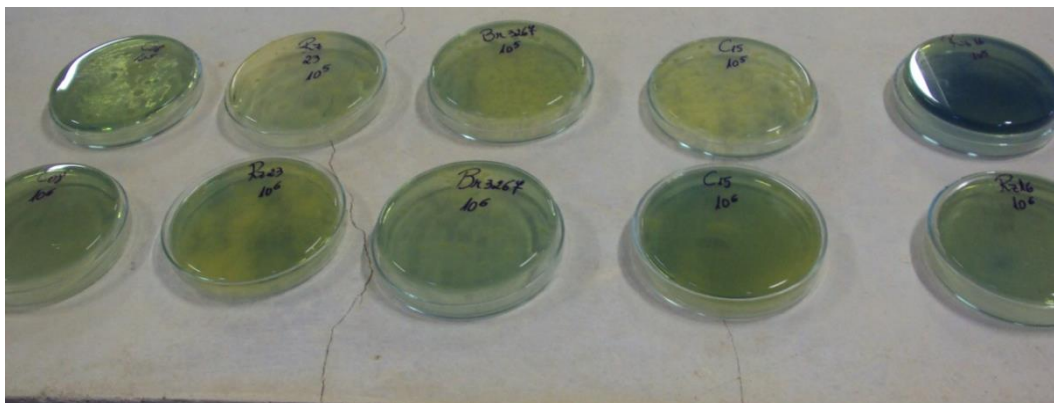
As estirpes do acervo da UFMT selecionadas e analisadas para o experimento em campo foram C08, C15, RZ16 e RZ23. O inoculante comercial BR3267 desenvolvido pela EMBRAPA Agrobiologia também foi utilizado para a caracterização fenotípica.

A caracterização foi realizada no laboratório de ciências básicas da UFMT- Campus de Rondonópolis.

##### **3.1.1 Crescimento das colônias**

Os isolados foram crescidos (Figura 1) em placas de Petri contendo meio LMA (anexo A). Foi considerado crescimento muito rápido, para aquelas colônias que podiam ser visualizadas após um dia de incubação; rápido, para aquelas que foram visualizadas de dois a três dias de incubação, intermediárias com quatro a cinco dias; lentas, com seis a dez

dias e muito lentas, visualizadas após dez dias de incubação (Vincent, 1970; Melloni et al., 2006).



**FIGURA 1.** Crescimento das estirpes de rizóbio em meio LMA.

### 3.1.2 Diâmetro das colônias

Após sete dias de incubação, o diâmetro foi medido com auxílio de um paquímetro, sendo determinado em centímetros. Em cada uma das placas, foram medidas cinco e obtida a média aritmética.

### 3.1.3 Alteração do pH do meio

O pH foi determinado de acordo com a coloração. A coloração azul do meio de cultura foi considerada alcalina, coloração amarela para meio ácido e a não alteração da cor original do meio neutro. Os isolados foram comparados com placas sem inoculação correspondente ao controle (Martins et al., 1997).

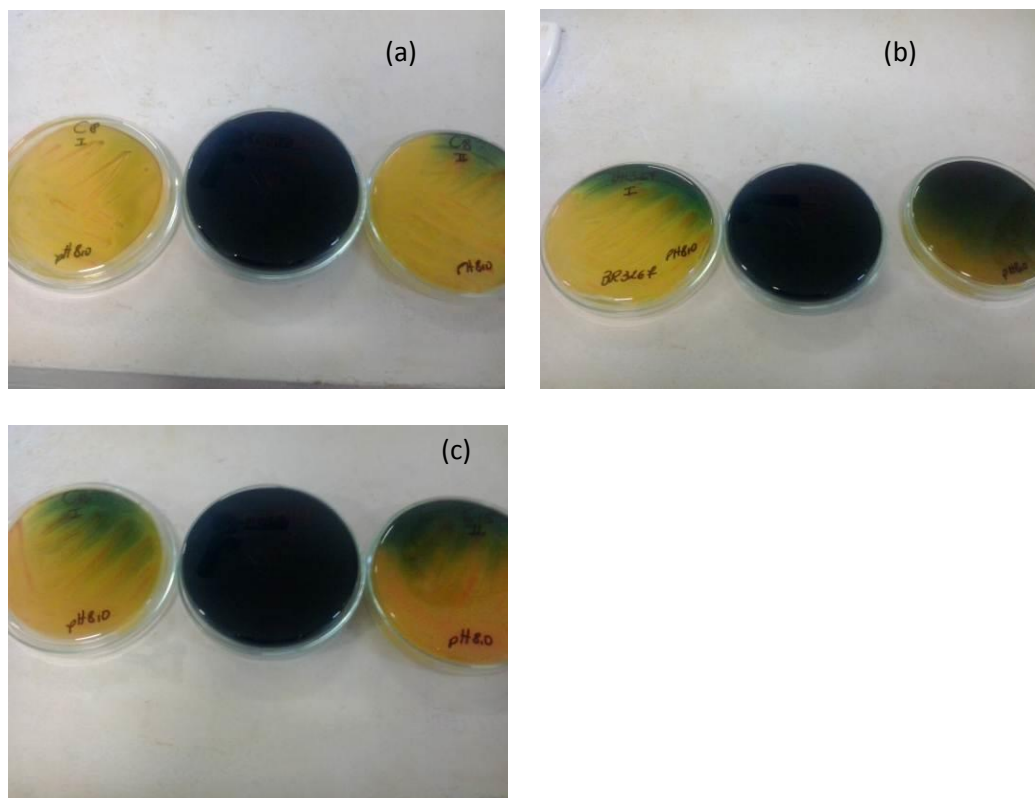
### 3.1.4 Crescimento em diferentes pH

O crescimento das estirpes em diferentes pH (Figura 2), deu-se pela replicação em placas com duas repetições de cada estirpe em meio LMA sólido (Vincent, 1970).

Os valores de pH testados variaram de 4 a 10, ajustados com NaOH e HCl 1M. As placas foram incubadas a uma temperatura de 28°C.

Como testemunhas foram incubadas duas placas com o mesmo meio de cultura com mesmo pH, porém, sem o rizóbio. Os valores de pH (Figura

2) foram testados separadamente e avaliados após sete dias de incubação (Martins et al., 1997).



**FIGURA 2.** Crescimento dos rizóbios C08 (a), BR3267 (b), C15 (c) em meio LMA, pH 8,0.

### 3.1.5 Crescimento em diferentes temperaturas

A capacidade de crescimento em diferentes temperaturas foi determinada pela inoculação em tubos de ensaio contendo meio LMA (Vincent, 1970), onde os isolados foram incubados a temperatura de 28; 32; 37 e 40°C. Placas que apresentavam desenvolvimento de colônia foram consideradas como resultado positivo e a falta de desenvolvimento de colônias foram considerados negativos. A análise foi realizada após sete dias de incubação. Foi utilizado na comparação um tratamento sem inoculação para confirmar a ausência de crescimento (Xavier et al., 2007).

### 3.1.6 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl.

Para o teste de salinidade, as bactérias foram testadas nas concentrações de 1, 2 e 3% de NaCl (p/v) e ainda um controle com a concentração original do meio (0,01% NaCl). As bactérias foram repicadas

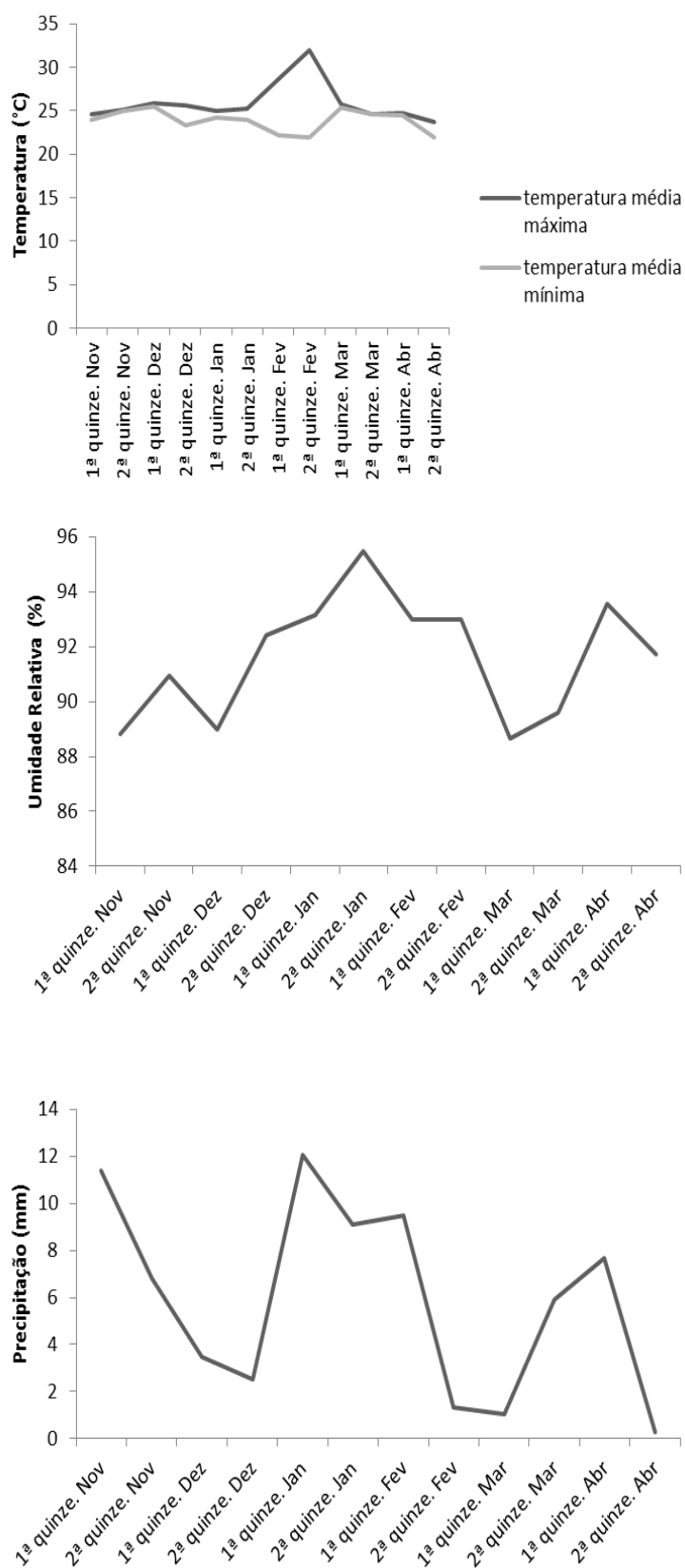
em placa de Petri, com auxílio de alça de platina, em meio LMA (Vincent,1970) com duas repetições, e incubadas à 28°C, durante o aparecimento das colônias ou até o 20º dia de incubação (Xavier e.t al, 2007).

### **3.2 Experimento de campo**

O experimento foi realizado no campo experimental da Universidade Federal de Mato Grosso, campus de Rondonópolis- MT, município localizado geograficamente na região sul do estado, o qual está situado na latitude 16°28'15" sul e longitude 54°38'08" oeste.

As condições climáticas foram determinadas em campo por meio da estação meteorológica. As médias da temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pluviosidade (mm) foram apresentadas na Figura 3.





**FIGURA 3.** Temperatura, umidade relativa e pluviosidade do campo experimental durante o desenvolvimento do experimento.

### 3.3 Instalação do experimento

Para o preparo do solo foram feitas duas gradagens, sendo uma pesada para remoção de plantas invasoras e outra leve para o nivelamento da área.

O solo utilizado foi caracterizado como LATOSSOLO Vermelho (EMBRAPA, 2009). Para a análise química, as amostras do solo foram coletadas e enviadas para o laboratório, cujos valores encontram-se na Tabela 1:

**TABELA 1.** Análise química do solo na profundidade 0-20 cm.

pH	P	K	Ca	Mg	Al	H	CTC	MO	V	m
CaCl <sub>2</sub>	mg dm <sup>-3</sup>		.....	.....	.....	.....	.....	g dm <sup>-3</sup>	...%....	
5,0	3,7	60	1,9	0,7	0,0	3,4	6,2	24,8	44,8	55,2

Utilizando os resultados da análise química do solo, foi realizada calagem com objetivo de elevar a saturação de bases a 60%, de acordo com as necessidades da cultura. Foram aplicados 1,17 t ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico, cuja composição apresentou 28% CaO e 20% de MgO e PRNT de 80,3%.

A adubação (Figura 4) foi realizada de acordo com Raij (1985), aplicando 444 kg ha<sup>-1</sup> de superfosfato simples; 86 kg ha<sup>-1</sup> de cloreto de potássio e adubação com micronutrientes, utilizando o fertilizante composto FTE para suprir necessidades de boro e zinco. O tratamento utilizando adubação nitrogenada foi de 75 kg ha<sup>-1</sup> de ureia, próxima ao sulco de semeadura, em duas etapas:

Na primeira etapa, aos 20 DAS, foram aplicados 50% da dose. Aos 40 DAS, foi aplicado a segunda dose.



**FIGURA 4.** Preparo do solo (a); adubação fosfatada, potássica e semeadura (b); adubação nitrogenada do feijão-caupi em LATOSSOLO Vermelho do Cerrado (c).

### 3.4 Cultivar utilizada

A cultivar de feijão-caupi utilizada foi a BRS Nova Era, que corresponde à linhagem MNC00-553D-8-1-2-2, obtida do cruzamento entre as linhagens TE97-404-1F e TE97-404-3F. Apresenta porte semiereto, ramos laterais curtos e inserção das vagens um pouco acima do nível da folhagem, folíolo central semilanceolado.

A cor das vagens na maturidade fisiológica e de colheita é amarelo-clara, podendo apresentar pigmentação roxa nos lados das vagens. Tem grãos de cor branca, grandes, reniformes e com tegumento levemente enrugado e anel do hilo marrom, com ciclo de vida em torno de 70 dias (Freire-Filho et al., 2008).

### 3.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, constituídos de sete tratamentos: controle (sem adubação nitrogenada e sem

inoculação), testemunha nitrogenada ( $75 \text{ kg ha}^{-1}$  de nitrogênio, na forma de ureia) e cinco rizóbios: uma estirpe comercial (BR3267) e quatro estirpes isoladas de plantas-íscas de feijão-caupi, pertencentes à coleção de cultura da UFMT.

Cada tratamento apresentou seis repetições, totalizando 42 parcelas. A parcela foi constituída por uma área  $12,5 \text{ m}^2$  divididas em cinco linhas de semeadura, cada linha de cinco metros de comprimento, distanciando  $0,5 \text{ m}$  entre linha e  $1 \text{ m}$  entre parcela.

Para a área útil foram utilizadas as três linhas centrais, excluindo  $0,5 \text{ m}$  de cada extremidade, totalizando uma área de  $6 \text{ m}^2$  (Figura 5).



**FIGURA 5.** Vista parcial do experimento aos 15 (a) e aos 21 (b) dias após a semeadura do feijão-caupi em LATOSSOLO Vermelho do Cerrado.

### 3.6 Inoculação de sementes

O inoculante foi preparado utilizando o veículo turfoso, na proporção de  $10 \text{ mL}$  do caldo bacteriano para cada  $35 \text{ g}$  de turfa (Guimarães et al., 2007). Após a homogeneização, foi incubado a  $32^\circ\text{C}$  por 24 horas (período correspondente à maturação).

Após este período, as sementes foram peletizadas (Figura 6) e colocadas para secar a sombra. Posteriormente foi realizada a semeadura utilizando 8 sementes por metro linear.



**FIGURA 6.** Inoculação realizada em laboratório para a semeadura do feijão caupi, (a) sementes nuas; (b) sementes inoculadas via veículo turfoso.

### 3.7 Variáveis analisadas

Aos 40 dias após a semeadura (DAS), foi feita a coleta de amostras de plantas de feijão-caupi para análises iniciais, sendo coletadas seis plantas da área útil de cada parcela, onde foram avaliada altura de plantas (AP), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MST), número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) leitura SPAD e N-total da parte aérea e raiz (Figura 7).

No final do ciclo da cultura, todas as vagens da área útil de cada parcela foram colhidas. Nesta etapa foi determinada a eficiência relativa das estirpes, massa seca de 100 grãos e proteína bruta dos grãos.



**FIGURA 7.** Leitura SPAD (a), altura (b) e determinação de massa seca de parte aérea (c) de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do Cerrado.

A altura das plantas foi definida com o auxílio de uma trena; a massa seca da parte aérea e da raiz e massa seca de 100 grãos foram determinadas em balança semi-analítica, após terem sido mantidas em estufa a 65° até atingir a massa constante; a massa seca de nódulos passou pelo mesmo processo e foi determinada em balança analítica.

As plantas juntamente com o solo coletado no momento da colheita foram levados ao laboratório, as raízes foram separadas da parte aérea e o solo foi peneirado em peneira de 2mm. O número de nódulos foi determinado em laboratório extraindo os nódulos das raízes com o auxílio de pinças.

A leitura SPAD foi determinada em campo com o emprego do ClorofiLOG® modelo CFL 1030, sendo que as amostras foram determinadas em cada parcela pela média da leitura de 5 folhas escolhidas

aleatoriamente. A leitura foi realizada aos 40 DAS e no período de enchimento dos grãos, aos 60 DAS.

Após a pesagem, amostras da massa seca da parte aérea, raiz e dos grãos foram moídas para a quantificação de nitrogênio total, e do teor de proteína dos grãos. Foi determinada também a eficiência relativa das estirpes de rizóbios, realizada pela comparação da massa seca da parte aérea dos tratamentos inoculados com a produção de massa seca da parte aérea do tratamento adubado e posterior conversão dos dados em porcentagem.

### **3.8 Determinação de nitrogênio em tecido vegetal e proteína bruta em grãos**

A determinação do N total no tecido vegetal é uma forma de avaliar o estado nutricional da cultura (Malavolta e Vitti, 1997). Este processo também pode ser realizado em grãos principalmente em leguminosas como o feijão, pois a partir da quantidade de nitrogênio, pode-se determinar a quantidade de proteína bruta presente na amostra.

Segundo Vogel (1992), a metodologia descrita por Kjeldahl em 1883, é ainda muito utilizada por ser confiável e não ter praticamente alterações ao longo dos anos. Yasuhara e Nokihara, (2001), Nogueira e Souza, (2005) descrevem que por meio dessa técnica é possível determinar de forma indireta a porcentagem de nitrogênio e proteína bruta de amostras.

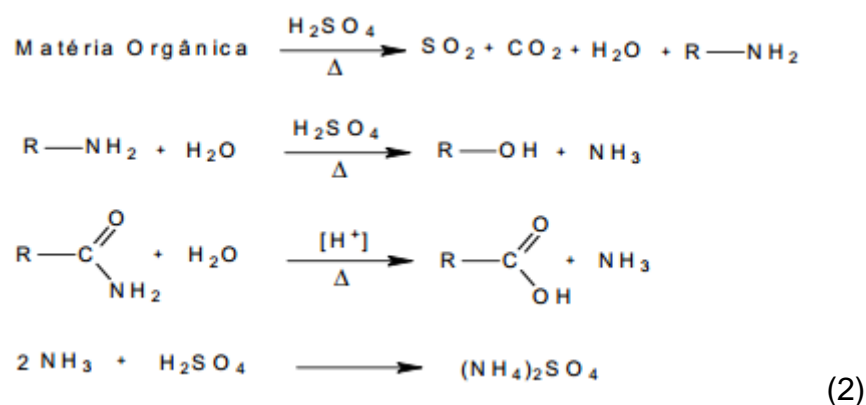
Para determinar o N total do tecido vegetal e a proteína bruta dos grãos de feijão-caupi neste experimento foi adotado o método micro-Kjeldahl (Malavolta e Vitti, 1997).

O método consistiu no aquecimento de uma mistura com uma pequena amostra de tecido vegetal dissolvida em solução concentrada de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), em presença de sulfato de cobre que atua como catalisador acelerando o processo. A mistura foi aquecida a  $370^\circ$  depois o nitrogênio presente foi determinado por destilação seguido de titulação na presença de ácido sulfúrico ou ácido clorídrico.



As análises laboratoriais de determinação de nitrogênio total foram realizadas seguindo a metodologia de micro-Kjeldahl, Malavolta e Vitti, (1997) pelo processo de digestão sulfúrica, segue as etapas:

*Digestão:* consiste no processo de transformação do nitrogênio orgânico em nitrogênio amoniacal pela reação da matéria orgânica e presença de solução de ácido sulfúrico concentrado e sulfato de cobre o qual atua como catalisador. O carbono contido na matéria orgânica é oxidado e o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) se desprende. O processo da conversão do nitrogênio gasoso em amoniacal está representado pela eq. (2):



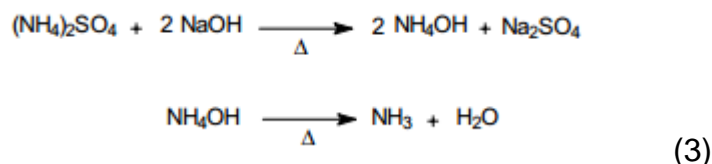
Durante o processo da digestão a solução altera sua coloração escura (preto) para um verde claro.

Além dos agrupamentos proteicos, existe o nitrogênio sob a forma de amina, amida e nitrila, que é transformado em amônia (NH<sub>3</sub>) a qual reage com o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, formando o sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) conforme mostrado nas reações durante a digestão, e esse ao esfriar forma cristais.

*Destilação:* A destilação foi realizada por arraste de vapor utilizando o equipamento Destilador de Nitrogênio. Na amostra fria resultante da digestão foram adicionados 10 ml de água destilada.

Essa solução foi colocada no destilador e tratada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 40%, que foi adicionada até ocorrer a reação de liberação de vapor eq. (3). A reação está representada a seguir:





O vapor liberado e condensado que contém  $\text{NH}_3$  foi recolhido em um erlenmeyer contendo 10 ml solução de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 42 g/L com algumas gotas da solução indicadora (mistura de vermelho de metila com verde de bromocressol). O processo de destilação foi cessado quando no erlenmeyer foram atingidos 50 ml de solução.

O Nitrogênio na forma amoniacal é volátil e se perde facilmente. Para que isso não acontecesse, no momento em que o vapor entra em contato com a solução do erlenmeyer eq. (4), ocorre a formação do borato de amônio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ ), de acordo com a reação:



*Titulação:* foi a última etapa, consistiu na adição de solução padrão de ácido sulfúrico 0,1N até o ponto de viragem do pH eq. (5). O volume gasto na titulação foi utilizado para a determinação do nitrogênio total da amostra seguindo a equação:

$$N = \frac{\text{ml de ácido sulfúrico} \times 1,4 \times N \text{ ácido}}{\text{massa da amostra}}
 \tag{5}$$

Onde: ml de ácido sulfúrico= quantidade em ml de ácido utilizado para a titulação da amostra.

1,4= constante relacionada a massa molecular do elemento nitrogênio.

N= normalidade do ácido utilizado na titulação.

A partir da porcentagem de nitrogênio presente na amostra eq. (6), é possível determinar a proteína bruta de acordo com a equação:

$$PB = \%N \times 6,5
 \tag{6}$$

Onde: 6,5 correspondem à constante relacionada ao teor de proteína presente nos vegetais, considerando que o vegetal possua 16% de proteína.

A eficiência relativa eq. (7) foi calculada pela razão entre a massa de matéria seca da parte aérea dos tratamentos inoculados e a média da massa de matéria seca da parte aérea do tratamento com 75 kg ha<sup>-1</sup> de N, multiplicada por 100, segundo a equação (Bergersen et al., 1971).

$$Efr = \frac{MSPA \times 100}{MSPA \text{ da testemunha com } N \text{ mineral}} \quad (7)$$

### 3.8 Análises estatísticas

Os dados do experimento em campo foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análises estatísticas SISVAR (FERREIRA 2008) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para a análise de correlação foi utilizado o programa de análises estatísticas ASSISTAT 7.7 beta.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização fenotípica das estirpes de rizóbio**

Para análise do crescimento das colônias dos rizóbios (Tabela 2), todas as estirpes apresentaram crescimento rápido, ou seja, crescimento em até 48 horas (Jordan, 1984).

Em relação ao diâmetro das colônias dos rizóbios (Tabela 2), a estirpe que obteve o maior valor foi a estirpe RZ23, seguida pela estirpe C08, BR3267, RZ16 e C15.

Foi verificada a alteração do pH do meio de cultura. Para esta variável todas as estirpes testadas acidificaram o meio de cultura, tornando-o amarelo (Tabela 2).

**TABELA 2.** Crescimento, diâmetro e alteração do pH das colônias dos rizóbios utilizados como inoculantes em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado.

Estirpes	Crescimento			Diâmetro (cm)	Alteração do pH		
	rápido	médio	lento		Ácido	Neutro	Básico
C08	x	-	-	0.6	x	-	-
C15	x	-	-	0.47	x	-	-
RZ16	x	-	-	0.38	x	-	-
RZ23	x	-	-	0.70	x	-	-
BR3267	x	-	-	0.41	x	-	-

Foi observado o crescimento das estirpes em diferentes pH, o crescimento foi positivo para todos as estirpes de rizóbios analisadas (Tabela 3).

**TABELA 3.** Crescimento em diferentes pH das colônias dos rizóbios utilizados como inoculantes em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado.

	Crescimento em diferentes pH				
	pH 4,0	pH 5,0	pH 8,0	pH 9,0	pH 10,0
C08	+	+	+	+	+
C15	+	+	+	+	+
RZ16	+	+	+	+	+
RZ23	+	+	+	+	+
BR3267	+	+	+	+	+

Quanto à análise do crescimento das colônias em diferentes temperaturas (Tabela 4), as cinco estirpes analisadas neste estudo

obtiveram crescimento positivo para as quatro temperaturas testadas (28; 32; 37 e 42°C).

**TABELA 4.** Crescimento em diferentes temperaturas das colônias dos rizóbios utilizados como inoculantes em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado.

	Crescimento em diferentes temperaturas (°C)			
	28° C	32° C	37° C	42° C
C08	+	+	+	+
C15	+	+	+	+
RZ16	+	+	+	+
RZ23	+	+	+	+
BR3267	+	+	+	+

Xavier et al. (2007), testando crescimento de estirpes de rizóbio oriundas de três regiões Zona da Mata, Agreste e Sertão em feijão-caupi, também encontraram resultados positivos para crescimento em altas temperaturas, acima de 40°.

Segundo Eaglesham e Ayanaba, (1984) e Jones e Tisdale, (1921), as altas temperaturas podem prejudicar o desenvolvimento da FBN, imitando a nodulação.

Para Hungria et al. (2005), esses estudos são importantes para a melhoria dos inoculantes, tornando-os tolerante à altas temperaturas.

Para o teste de resistência à salinidade, as cinco estirpes apresentaram desenvolvimento positivo para os três níveis de salinidade 1%, 2% e 3% (Tabela 5).

**TABELA 5.** Crescimento em diferentes concentrações de NaCl das colônias dos rizóbios utilizados como inoculantes em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado.

	Crescimento em diferentes concentração de NaCl		
	1%	2%	3%
C08	+	+	+
C15	+	+	+
RZ16	+	+	+
RZ23	+	+	+
BR3267	+	+	+

Ao contrário do encontrado neste estudo, Xavier et al. (2007), analisando 76 estirpes oriundas de três regiões nordestinas, encontraram resistência ao desenvolvimento de algumas estirpes ao serem testadas em concentrações de 2 e 3% de NaCl.

Segundo os autores, cerca de 40% das estirpes foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 1% de NaCl. Na concentração de 2% de NaCl, foram capazes de crescer 17% do total de isolados, sendo que destes, 15% foram isolados de solos da região do Sertão e 24% da Zona da Mata. Já na concentração de 3% deste sal, somente 12% das estirpes testadas foram capazes de crescer nesta condição.

Eaglesham et al. (1987), estudando 79 estirpes de rizóbios capazes de nodular feijão-caupi, encontraram crescimento positivo para uma estirpe na concentração de 1% de NaCl. As demais estirpes se desenvolveram somente em concentrações abaixo deste valor.

De acordo com Graham e Parker (1964) muitas espécies de rizóbio podem tolerar acima de 2% de NaCl no meio de cultura.

Os altos valores de tolerância a temperatura máxima e níveis de tolerância a NaCl dessas estirpes pode indicar uma importância ecológica sob as condições de clima da região estudada.

## 4.2 Experimento em campo

Os resultados para a leitura SPAD aos 40DAS, altura de plantas, massa seca da parte aérea, raízes e massa seca total, número de nódulos e massa seca de nódulos, foram apresentados na Tabela 6.

**TABELA 6.** Leitura SPAD, altura de plantas, massa seca da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR), massa seca total (MST), número de nódulos (NN), e massa seca de nódulos (MSN) em plantas de feijão-caupi inoculadas com rizóbio e cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado.

Tratamentos	Variáveis Analisadas						
	SPAD (40DAS)	Altura (cm)	MSPA(g)	MSR (g)	MST (g)	NN*	MSN* (g)
C08	60,55 ab	48,21 b	45,76 <sup>ns</sup>	3,85 ab	49,62 <sup>ns</sup>	6,54 ab	1,07 <sup>ns</sup>
C15	59,18 ab	48,26 b	48,26	4,27 ab	52,53	9,22 a	1,043
RZ16	58,15 ab	48,60 b	53,1	4,16 ab	57,27	7,43 ab	1,062
RZ23	59,28 ab	48,60 b	52,85	3,97 ab	56,82	6,41 ab	1,084
BR3267	57,85 b	49,80 ab	57,47	5,17 a	62,64	7,18 ab	1,027
Aduado	63,21 a	54,58 a	63,82	5,02 ab	68,5	4,26 b	1,043
Controle	61,46 ab	49,30 b	47,74	3,50 b	51,24	3,58 b	1,032
CV (%)	4,44	5,36	19,21	20,45	18,92	39,05	4,6

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\* dados transformados por Y+1

(<sup>ns</sup>) não significativo

Nos resultados referentes à primeira leitura SPAD, para os tratamentos inoculados, o que mais se destacou foi a estirpe C08, com leitura de 60,55, equivalente a 95,80% da leitura observada tratamento adubado, o qual apresentou o maior valor (63,21), mostrando a efetividade na fixação de nitrogênio. Em seguida os resultados mais satisfatórios para os tratamentos inoculados foram proporcionados pelas estirpes RZ23, C15, RZ16 e BR3267 respectivamente. Entretanto, o tratamento controle apresentou leitura SPAD superior aos inoculados (61,46).

Sant'ana, et al., (2010) cultivando feijoeiro no Latossolo vermelho distrófico em Goiás, encontraram para a cultura, maiores índices de clorofila,

em torno de 47,0 nas parcelas adubadas com doses altas de nitrogênio, variando de 60 a 120 kg ha<sup>-1</sup>. Valores estes, que ficaram abaixo dos encontrados neste experimento.

De acordo com Nascimento (2009), o índice de clorofila é uma característica muito importante, pois por meio dela determina-se a eficiência da planta na absorção da radiação solar pelas folhas. Quanto maior a eficiência, maior a taxa fotossintética, resultando em maior produtividade de grãos.

Em relação à altura das plantas, o tratamento que obteve a maior altura foi o tratamento adubado com N, não diferindo estatisticamente do tratamento inoculado com a estirpe BR 3267, sendo que sua altura chegou a um valor de 90% da altura do tratamento adubado. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que este nutriente além de ter sido fornecido na forma mineral, está presente na matéria orgânica do solo, constituindo a principal fonte de N para as plantas, facilitando assim sua absorção (Weber e Mielniczuk, 2009).

Esses resultados diferem dos encontrados por Bastos et al., (2012), que encontraram para o feijão-caupi BRS Aracê, cultivado em LATOSSOLO Amarelo, uma altura média de 23,11cm aos 35 dias após a semeadura.

Em relação à massa seca da parte aérea, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. A maior produção foi encontrada para o tratamento adubado, com média de 63,82g e menor produção para o tratamento controle 47,74 g.

Quanto aos tratamentos inoculados, o que mais se destacou foi o inoculante comercial BR 3267 com percentual de 90% em relação à testemunha nitrogenada, seguido pela estirpe RZ16, que atingiu em 83,20%, RZ23, 82,81% e C15, que apresentou produção de 75,62% em relação à testemunha nitrogenada.

Resultados semelhantes foram encontrados por Junior et al. (2010) cultivando BRS Nova Era no Cerrado de Tocantins, onde não se obteve diferença significativa entre os tratamentos inoculados em relação ao tratamento adubado.



Almeida et al. (2010), não encontraram diferença estatística significativa para MSPA em feijão caupi cv. BR 17 inoculado ao comparar os tratamentos adubado, inoculado com rizóbios e controle. Desta forma, comprova-se que a população nativa de rizóbios presentes na área é capaz de realizar a simbiose e fornecer o nitrogênio necessário ao desenvolvimento da cultura.

Zilli et al. (2009) cultivando caupi em cerrado e área de mata, observaram maiores produções de massa seca de parte aérea em área de mata, sendo que o tratamento inoculado com a estirpe comercial BR3262 proporcionou as maiores médias. Ferreira et al. (2011), cultivando caupi encontraram para massa seca de parte aérea avaliada em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, maiores produções para as estirpes BR3270, BR 3289 e BR 200, quando comparadas ao tratamento que recebeu adubação com N mineral.

Zilli et al. (2011) ao cultivar feijão-caupi em casa de vegetação, encontraram maiores resultados para massa seca de parte aérea em tratamentos inoculados com estirpes recomendadas para o feijão-caupi.

A distribuição de massa seca na planta é uma variável que permite discutir um processo pouco estudado, que é a translocação de fotoassimilados, e que em muitos casos facilitam a compreensão da resposta das plantas em termos de produtividade (Benincasa, 2003). De acordo com Gualter et al. (2011), as bactérias fixadoras de nitrogênio podem contribuir de forma significativa com maior fornecimento de N para a planta e, conseqüentemente, com aumento de massa seca da planta.

Em relação à massa seca de raiz, o tratamento que apresentou maior resultado foi a estirpe comercial BR3267, com 5,17g, porém não diferiu significativamente do tratamento adubado com N, e daqueles inoculados com as estirpes C15, RZ16, RZ23 e C08 (Tabela 6).

A produção de massa seca das raízes no tratamento inoculado com a estirpe BR 3267 superou o adubado em aproximadamente 3%. Em relação às estirpes do acervo da UFMT, o tratamento de maior produção foi a estirpe

C15, a qual atingiu aproximadamente 83% da produção da estirpe comercial (Tabela 6).

Chagas Junior et al. (2010) trabalhando com feijão-caupi inoculado no Cerrado de Tocantins, encontraram maior produtividade da cultura no tratamento com a estirpe BR 3262. No entanto, Guedes et al. (2010) não encontraram diferença entre os tratamentos inoculados e adubação com N mineral, para essa variável.

Resultado similar também foi observado por Gualter et al. (2008) cultivando caupi em Teresina PI sob efeito de inoculação, adubação fosfatada, potássica e adição de molibdênio, que também não encontraram diferença estatística entre os tratamentos.

Araújo et al. (2009), avaliando feijão-caupi inoculado com *Bradyrhizobium*, estirpe BR3262 em LATOSSOLO Vermelho, encontraram maiores valores de massa seca de raízes nos tratamentos inoculados em relação à testemunha (sem inoculante ou adubação) e ao tratamento adubado com nitrogênio, fósforo e potássio.

Em relação à produção de massa seca total (MST), não houve diferença estatística entre os tratamentos, contudo, as plantas que apresentaram maior produção foram as que receberam a adubação nitrogenada (Tabela 6).

Esses resultados corroboram com Chagas Junior et al. (2010), que ao avaliar três cultivares de feijão-caupi (BRS Nova Era, BRS Pujante e Vinagre) aos 40 DAS, também encontraram maior produção de massa total para a testemunha nitrogenada.

Borges et al. (2012), cultivando feijão-caupi cv. Vinagre em Latossolo Vermelho Amarelo em Tocantins encontraram, ao avaliar a produção aos 45 dias após a emergência, maior produção de massa seca total para o tratamento adubado, não diferindo estatisticamente do tratamento inoculado com a estirpe BR3267.

Dentre os tratamentos de inoculação, a maior massa seca total foi proporcionada pela estirpe comercial BR3267, a qual produziu

aproximadamente 91% da massa seca total do tratamento adubado com N, seguida pela estirpe RZ16, com 83% da massa seca total do tratamento adubado. A estirpe C08 foi o tratamento que proporcionou a menor massa seca total neste experimento.

Observou-se para a variável número de nódulos, que a maior produção foi proporcionada pelo tratamento C15, com média de 9,22 nódulos, não diferindo estatisticamente dos tratamentos RZ16, BR3267, C08 e RZ23, com 7,44; 7,19; 6,55; e 6,41 respectivamente. Almeida et al. (2010), encontraram para o feijão-caupi cultivado no Piauí, maior produção de nódulos nos tratamentos com as estirpes BR326 utilizada nesse experimento e estirpe BR 3269.

Para a massa seca dos nódulos não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos (Tabela 6). O tratamento com a estirpe local RZ23 representou os maiores valores para essa variável, enquanto que, a estirpe comercial BR3267, obteve o menor valor (1,027g). Os resultados obtidos para as variáveis leitura SPAD aos 60 DAS, massa de 100 grãos, foram apresentados na Tabela 7.

**TABELA 7.** Leitura SPAD aos 60 DAS; Massa de cem grãos (M 100 grãos), em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado.

Tratamentos	SPAD (60 DAS)	M. 100 grãos* (g)
C08	64,01 <sup>ns</sup>	4,44 <sup>ns</sup>
C15	63,03	4,65
RZ16	64,26	4,08
RZ23	64,96	4,11
BR3267	61,93	4,18
Adubado	59,75	4,40
Controle	59,41	4,22
CV (%)	5,54	15,36

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(<sup>2</sup>) dados transformados

(<sup>ns</sup>) não significativo

Na fase de enchimento de grãos aos 60 DAS, foi realizada a segunda determinação da leitura SPAD (Tabela 9), não sendo observada diferença estatística significativa entre os tratamentos. As médias encontradas variaram de 64 a 59. O tratamento que obteve maior leitura foi aquele cujas plantas foram inoculadas com a estirpe RZ23, apresentando valor de 64,96, média essa que supera em aproximadamente 10% a leitura observada no tratamento adubado.

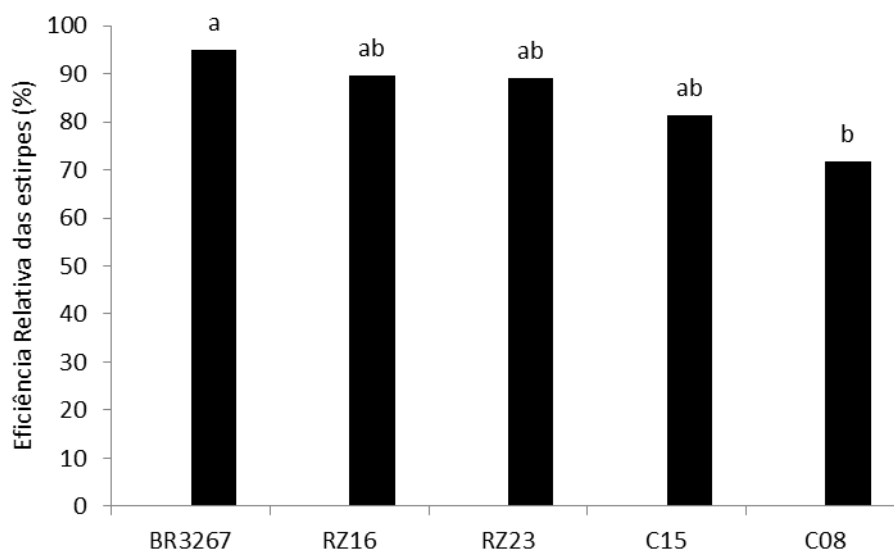
O nitrogênio necessário para o desenvolvimento da cultura do feijão-caupi pode ser absorvido pela mineralização da matéria orgânica do solo, fornecimento de adubos minerais e pela fixação biológica (Hungria et al., 1991; Franco et al., 2002; Silva et al., 2006 b).

De acordo com Rumjanek (2005) as estimativas da FBN em campo variam de 40 a 90%, e essa variação está relacionada com as cultivares e as estirpes utilizadas para a inoculação.

Para a variável massa de 100 grãos o tratamento inoculado C15 obteve a maior massa (4,65g), não diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 7). Esse resultado supera em 11% a massa de 100 da estirpe comercial BR3267 e em 10% comparado ao controle.

Resultados encontrados por Guedes et al. (2010) mostraram que não houve diferença entre os tratamentos com e sem inoculação, apresentando para a testemunha sem adubação e sem inoculação, melhor resultado.

Em relação à eficiência relativa das estirpes, a qual compara a produção média massa seca da parte aérea dos tratamentos inoculados com a mesma média da produção do tratamento com adubação mineral, a estirpe que apresentou maior eficiência foi a comercial BR 3267, mostrando a efetividade do inoculante comercial no solo da região. Os resultados seguem na ordem decrescente para as estirpes RZ16, RZ23, C15, C08 (Figura 8).



**FIGURA 8.** Eficiência relativa das estirpes de rizóbio inoculadas em feijão caupi cultivado em Latossolo do Cerrado.

As maiores médias para a massa seca da parte aérea do tratamento inoculado atingiram 94,97% da produção do tratamento adubado, tendo o inoculante comercial, estirpe BR3267 como destaque para essa variável, obtendo as maiores médias. Esses resultados mostram que a fixação biológica atendeu em aproximadamente 95% as necessidades de essa cultivar em relação ao suprimento de nitrogênio no primeiro ano de cultivo do feijão-caupi nessa região.

Chagas Júnior et al. (2010), cultivando feijão-caupi cv. Nova Era no Cerrado de Tocantins, verificaram que as estirpes BR 3302, BR 3301 e BR 3262 contribuíram para a eficiência relativa superior em relação aos demais tratamentos, porém similar ao tratamento adubado. Nesse mesmo, experimento, a estirpe BR 3267 apresentou eficiência abaixo do tratamento adubado.

Nascimento et al. (2008), encontraram para o feijão-caupi em condições controladas e cultivado em vasos Leonard, que a contribuição da estirpe BR 3267 foi similar à eficiência do tratamento adubado com N mineral.

As análises químicas referentes à porcentagem de nitrogênio na parte aérea, raízes e grãos e a determinação da proteína bruta dos grãos do feijão-caupi, foram representados na Tabela 8.

**TABELA 8.** Nitrogênio total da parte aérea, (N total P. aérea) raízes (N total Raízes) e grãos (N total Grãos); proteína bruta de grãos (PB Grãos) em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado.

Tratamentos	Variáveis Analisadas			
	N total Grãos (g kg <sup>-1</sup> )	N total P. aérea (g kg <sup>-1</sup> )	N total Raízes (g kg <sup>-1</sup> )	P.B Grãos (%)
C08	50,1b	37,1 <sup>ns</sup>	15,4 <sup>ns</sup>	31,35 b
C15	47,0b	33,3	15,9	29,89 b
RZ16	48,3b	32,7	15,9	30,18 b
RZ23	68,3 a	34,3	14,7	42,73 a
BR3267	57,8ab	35,4	16,1	36,16 ab
Test. N	50,8b	37,1	16,3	31,78 b
Controle	52,2b	32,4	14,0	32,66 b
CV (%)	11,55	9,59	22,41	11,55

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(<sup>2</sup>) dados transformados

(<sup>ns</sup>) não significativo

De acordo com Malavolta, (1997), em amostras de tecido vegetal, quase todo o nitrogênio (N) encontra-se na forma orgânica, representado por aminoácidos e proteínas. Desta forma, por se tratar de um elemento essencial na constituição do tecido vegetal, a determinação de N por meio de análise química é muito importante para avaliar a nutrição mineral das plantas.

Em relação à variável N total e proteína bruta dos grãos do feijão-caupi, as maiores médias foram obtidas pelo tratamento inoculado com a estirpe local RZ23, não diferindo estatisticamente do tratamento inoculado com a estirpe comercial BR3267.

Os valores obtidos pela estirpe local RZ23, superaram em mais de 25% do tratamento com adubação mineral. Os valores relativamente altos para o tratamento controle mostram a efetividade dos rizóbios nativos da

região em promover a FBN em feijão-caupi, pois os resultados deste tratamento superaram os resultados obtidos pelas estirpes C08, C15 e RZ16.

Esses resultados mostram que os inoculantes foram efetivos no processo de fixação biológica neste experimento, fixando maior quantidade de nitrogênio nos grãos, quando comparados ao tratamento que utilizou adubação mineral.

A porcentagem de nitrogênio da parte aérea do feijão-caupi não apresentou diferença estatística significativa para os tratamentos. As maiores médias foram obtidas pelo tratamento inoculado com a estirpe C08 e o tratamento adubado (Tabela 8).

Mello e Zilli, (2009), cultivando cinco cultivares de feijão-caupi em Roraima, não encontraram diferença estatística na quantidade de nitrogênio na massa seca da parte aérea em relação ao tratamento adubado e a estirpe BR3267 para as cultivares Pretinho precoce I, UFRR Grão Verde, Gurguéia e Guariba, obtendo diferença somente para a estirpe BR3262 em relação ao tratamento adubado.

Resultados semelhantes foram obtidos para a avaliação da porcentagem de nitrogênio nas raízes, não havendo diferença estatística significativa entre o tratamento inoculado com a estirpe comercial BR3267 e o tratamento adubado.

### **4.3 Correlações entre as variáveis**

A altura das plantas correlacionou-se positivamente com a massa seca da parte aérea, raízes e total e negativamente com a leitura SPAD aos 60 DAS e a massa de cem grãos (Tabela 9).

Observou-se para o número de nódulos, correlação positiva com a leitura SPAD aos 60 DAS. Em relação à massa seca de parte aérea, houve correlação positiva com massa seca de raízes e massa seca total.

A massa seca de raízes e a porcentagem de nitrogênio correlacionaram-se positivamente. A massa seca de nódulos obteve valores positivos de correlação com a variável leitura SPAD aos 60 DAS.

Em relação às análises químicas, obteve-se correlação positiva para porcentagem de nitrogênio das raízes e massa de cem grãos e para porcentagem de nitrogênio dos grãos e índice de proteína bruta.



TABELA 9. Coeficientes de correlações entre as variáveis analisadas no experimento

	SP40	ALT	NN	MSPA	MSR	MST	MSN	SP60	MGR	N PA	N RA	N GR	PB
SP40	1	-0.0764ns	-0.0819ns	0.1499 ns	-0.0454ns	0.1364 ns	0.0350 ns	0.0435 ns	0.2103 ns	0.2444 ns	-0.1759ns	-0.0834ns	-0.0834ns
ALT		1	-0.2684ns	0.4761**	0.3897*	0.4746**	0..060 ns	-0.3679*	-0.3043*	0.0080 ns	0.0641 ns	-0.0434ns	-0.0434ns
NN			1	0.1799 ns	0.2793 ns	0.196 ns	0.1698 ns	0.3235*	0.2940 ns	0.2253 ns	0.2079 ns	-0.0717ns	-0.0718ns
MSPA				1	0.7505**	0.9987**	0.0241 ns	0.0535 ns	-0.0005ns	-0.1800ns	0.1469 ns	0.0323 ns	0.0323 ns
MSR					1	0.7795**	0.0319 ns	0.0448 ns	0.0726 ns	-0.0703ns	0.3039*	-0.1424ns	-0.1424ns
MST						1	0.0291 ns	0.0473 ns	-0.0001ns	-0.1701ns	0.1593 ns	0.0203 ns	0.0204 ns
MSN							1	0.3144*	0.1273 ns	0.1689 ns	0.2832 ns	0.1654 ns	0.1654 ns
SP60								1	0.1252 ns	-0.0863ns	0.0288 ns	-0.0569ns	0.0570 ns
MGR									1	0.0446 ns	0.3520*	-0.1567ns	-0.1568ns
N PA										1	-0.0513ns	0.0585 ns	0.0584 ns
N RA											1	0.1219 ns	0.1218 ns
N GR												1	1.000**
PB													1

\*\* - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ns - não significativo .

SP40, SP60 Leitura SPAD aos 40 e 60 DAS respectivamente; ALT: altura de plantas; NN: número de nódulos; MSPA, MSR, MST: massa sea de parte aérea, raízes e total respectivamente; MSN: massa seca de nódulos; MGR: massa de 100 grãos; N PA, N RA, N GR: porcentagem de nitrogênio da parte aérea, raízes e grãos respectivamente; PB: proteína bruta dos grãos.

## 5 CONCLUSÕES

As estirpes de rizóbio C15, RZ23 e BR3267 inoculadas apresentaram potencial de FBN quando em simbiose com o feijão-caupi.

As estirpes caracterizadas morfológicamente em laboratório mostraram tolerância positiva para as variações de pH, temperatura e concentrações de NaCl.

A estirpe RZ23 proporcionou resultados satisfatórios para N total e proteína bruta dos grãos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADUAN, R. E.; VILELA, M. F.; JUNIOR, F. B. R. **Os grandes ciclos biogeoquímicos do planeta**. EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF. 2004. 25 p.

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

ARAÚJO, A. S. F; CARNEIRO, R. F.V; BEZERRA, A. A. C; ARAÚJO, F. F. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre anodulação, a fixação de  $N_2$  e o crescimento das plantas. **Ciência Rural Online**, Santa Maria - RS, setembro de 2009.

BARBOSA, M. S.; SANTOS, M. A. S.; SANTANA, A. C. Análise socioeconômica e tecnológica da produção de feijão-caupi no Município de Tracuateua, Nordeste Paraense. **Amazônia: ciência & desenvolvimento**, Belém, PA, v. 5, n. 10, p. 7-26, 2010.

BASTOS, V. J; MELO, D. A; ALVES, J. M. A; UCHÔA, S. C. P; SILVA, P. M. C; JUNIOR, D. L.T. Avaliação da fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupis submetido a diferentes manejos da vegetação natural nasavana de Roraima. **Revista Agro@ambiente** On-line, v. 6, n. 2, p. 133-139, maio-agosto, 2012.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas** - noções básicas. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41 p.

BERGERSEN, F.J.; BROCKWELL, J.; GIBSON, A.H.; SCHWINGHAMER, E.A. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. **Plant and Soil**, v.35, p.3-16, 1971. Supplement.

BISHOP, P.E.; JARLENSKI.D.M.L.; HETHERINGTON, D.R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.150, n.3, p.1244-1251, 1980.

BORGES, P. R. S; SABOYA, R. C. C; SABOYA, L. M. F; SANTOS, E. R; SOUZA, S. E. A. Distribuição de massa seca e rendimento de feijão-caupi inoculadas com rizóbio em Gurupi, TO. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 1, p. 37-44, janeiro-março, 2012.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central. **Acta Amazônica** vol. 39 p. 489 – 494. 2009.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; RAHMEIER, W; FIDELIS, R. R; SANTOS, G. R; CHAGAS, L. F. B. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbios inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Grupeto. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, out-dez, 2010.

DEAN, D.R. & JACOBSON, M.R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.763-834.

DROZDOWICZ, A. G. Microbiologia ambiental. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Tratado de microbiologia**. Rio de Janeiro: Manole, v. 2, p.1-102, 1991.

DUARTE, M. F.; POCOJESKI, E.; SILVA, L. S.; GRAUPE, F. A.; BRITZKE, D. Perdas de nitrogênio por volatilização de amônia com aplicação de ureia em solo de várzea com diferentes níveis de umidade. **Ciência Rural**, v.37, n.3, mai-jun, 2007.

EAGLESHAM, A.R.J., AYANABA, A. 1984. **Tropical stress ecology of rhizobia, root nodulation and legume nitrogen fixation**. In: Subba Rao, N.S. (Ed.), Selected Topics in Biological Nitrogen Fixation. Oxford/IBH Publishing, New Dehli, p. 1–35.

EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; MAINA, M.L.; GOLDMAN, B.J.; SINCLAIR, M.J.; AYANABA, A. Physiological and Biochemical Aspects of Diversity of *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) from three West African Soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.575-581, 1987.

EMBRAPA/CPAC, 1986, p. 33-74. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solo. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Rio de Janeiro, 1999, 412 p.

EMBRAPA - Embrapa Meio-Norte Sistemas de Produção. Cultivo de Feijão-Caupi. **2ISSN 1678-8818 Versão Eletrônica**. Janeiro, 2003.

EMBRAPA. Cultivo do feijão-caupi. EMBRAPA Meio Norte. Teresina, PI. Setembro de 2004.

EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de solos. 2ed. 2009.

EMBRAPA Roraima. **Tratamento e inoculação de sementes**, setembro de 2009.

Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/CultivodeSojanoCerradodeRoraima/tratamentosemente.htm>> Acesso em 03/09/2013.

EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosojainoculacao.htm>. Acesso em 29/10/2013.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.1-42.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.7, p. 835-842, julho de 2003.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. **Reserva Symposium** (Lavras), v. 3, p. 317-345, 2008.

FERREIRA, E. P. B. MARTINS, L. M. V. XAVIER G. R. RUMJANEK, N.G. Nodulação e produção de grãos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculado com isolados de rizóbio. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 4, p. 27-35, out.-dez., 2011.

FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H. A.; STMFORD, N.P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. 568 p.

FRANCO, A.A.; BALIEIRO, F.C. Fixação biológica do nitrogênio: Alternativa aos fertilizantes nitrogenados. In: Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.G.; Faquin, V.; Furtini Neto, A.E.; Carvalho, J.G. (eds.). **Inter-Relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas. Viçosa: SBCS**, Lavras: UFLA/DCS. p. 577-595, 1999.

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

FREIRE FILHO, F. R. Genética do caupi. In: ARAUJO, J. P. P. de & WATT, E.E. (Org.) **O caupi no Brasil**. Brasília, ITA/EMBRAPA, 1988. p. 194-222.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ALCÂNTARA, J. P.; BELARMINO FILHO, J.; ROCHA, M. M. BRS Marataoã: nova cultivar de feijão-caupi com grão tipo sempre-verde. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 771-777, 2005.

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

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. Feijão caupi: avanços tecnológicos. Brasília: **EMBRAPA**, 2005 b. Cap. 1. p 29–92.

FREIRE-FILHO et al. BRS Novaera: Cultivar de feijão-caupi de porte semi-ereto. Belem: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2008 . 4p (Comunicado técnico).

FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues. Feijão-Caupi no Brasil Produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Embrapa Meio-Norte Teresina, PI. 2011.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2ed. New York. Springer-Verlag, v.1, p.119-154, 2001.

GRAHAM, P.H.; PARKER, C.A. Diagnostic features in the root nodule bacteria of legumes. **Plant and Soil**, The Hague, v.20, p.383-396, 1964.

GUALTER, R. M. R; BODDEY, R. M; RUMJANEK, N. G; FREITAS, A. C. R; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de estirpes de rizobio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.

GUEDES, G. N. SOUZA, A. S; LIMA, A. S; ALVES, L. S. Eficiência agronômica de inoculantes em feijão-caupi no Município de Pombal – PB. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) v.5, n.4, p. 82 - 89 outubro/dezembro de 2010.

GUIMARÃES, S. L; BALDANI, J. I. ; BALDANI, V. L. D. ; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.3, p.393-398, março 2007.

HUNGRIA, M.; BARRADAS, C.A. & VALLSGROVE, R.M. Nitrogênio fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. J. **Experimental Botany**, 42:839-844, 1991.

HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-spi, 1994. p.9-90.

HUNGRIA, M. & STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.819-830, 1997.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O.; COCA, R.G.; MEGÍAS, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, 33:1349-1361, 2001(a).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I.C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: **Embrapa Soja**, 2001, 48 p (b).

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA — **SENSO DE 2010**. <http://www.ibge.gov.br/censo2010/>.

JESUS, E. D. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Leguminosaenodulating bacteria diversity from three different land use systems in Brazilian Western Amazon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

JONES, F.R.; TISDALE, W.B. The effect of soil temperature upon the development of nodules on the roots of certain legumes. **Journal of Agricultural Research**, Pakistan, v.22, p.17-23, 1921.

JORDAN. D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32 p.136-139, 1984.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. **Biochemistry**, New York, v.33, p.389-397, 1994.

LOPES, A. S.; BASTOS, A. R. R.; DAHER, E. Uso eficiente de fertilizantes nitrogenados e sulfatados na agricultura brasileira: uma visão do futuro. In: YAMADA, T.; STIPP, S. R.; VITTI, G. C. (Eds.). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: INPI Brasil, 2007. p. 161-187.

MAFRA, R. C. **Contribuição ao estudo do “feijão massacar”:** fisiologia, ecologia e tecnologia de produção. In: Curso de treinamento para pesquisadores de feijão-caupi, 1, 1979, Goiânia. Assuntos abordados. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF/IITA, 1979. p. 01-39.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. Funções. In: **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997. 67p.

MANSELL, B. O.; SCHROEDER, E.D. Biological denitrification in a continuous flow membrane reactor. **Water Science Technology**, London., v.38, n.1, p.9-14, 1998.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N.G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura em morfologia de colônias de “Rizóbio”**. Comunicado Técnico: EMBRAPA, n. 19, 14p. 1997.

MEDEIROS, E. V; MARTINS, C. M; LIMA, J. A. M; FERNANDES, Y. T. D; OLIVEIRA, V. R; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.

NASCIMENTO, S. P. do. **Efeito do déficit hídrico em feijão caupi para identificação de genótipos com tolerância à seca**. 2009. 109p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí, Teresina.

NEWTON, W.E.. Nitrogen fixation in perspective. In: Pedro's, F.O.; Hungrier, M.; Yates, M.G.; Newton, W.E. (Eds.). Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, 2000.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.

RAHMEIER, Wagner. **Caracterização de isolados e eficiência de estirpes de rizóbios em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal da Fundação Universidade Federal do Tocantins em 30 de Julho de 2009, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal - Área de Concentração em Microbiologia do Solo. 2009.

RAIJ B. van; SILVA, N.M. da; BATAGLIA, O.C.; QUAGGIO, J.A; HIROCE, R.; CANTARELLA, H.; BELINAZZI JÚNIOR, R; DECHEN, A .R.; TRANI, P.E. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas, Instituto Agrônomo, 1985. 107p. (Boletim Técnico, 100).

ROBSON, R.L.; WOODLEY, P.R.; PAU, R.N.; EADY, R.R. Second gene (*nifH\**) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter chroococcum* adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein, EMBO. J. v.5, p.1159-1163, 1986.

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., eds. Feijão-caupi; avanços tecnológicos. Brasília, **Embrapa/ Informação Tecnológica**, 2005. p.281-335.

RUMJANEK, N. G; XAVIER, G. R; MARTINS, L.M. V.; MORGADO, L.A; NEVES, M. C. P. **Feijão Caupi tem uma nova estirpe de rizóbios, BR 3267, recomendada como inoculante**. Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006.



SANT'ANA, E. V. P. SANTOS, A. B. dos. SILVEIRA, P. M. da. Adubação nitrogenada na produtividade, leitura spad e teor de nitrogênio em folhas de feijoeiro. **Revista Pesquisa Agropecuaria Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 4, p. 491-496, out./dez. 2010.

SANTOS, A. B.; SILVA, O. F. Manejo do nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. (Ed.). **Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p. 207-216.

SANTOS, C. E. DE R. E S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D.S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** v.2, n.4, p.249-256, out.-dez., 2007.

SANTOS, C.A.F.; BARROS, G.A.A.; SANTOS, I.C.C.N.; FERRAZ, M.G.S. Comportamento agrônômico e qualidade culinária de feijão-caupi no Vale do São Francisco. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 404-408, 2008.

SANTOS, L. A.; REIS, V.M. **A formação de nódulos e leguminosas**. Documentos. EMBRAPA Agrobiologia, 2008.

SELLSCHOP. J. P. F. Cowpeas. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Field Crop Abstract**, v.15, n.4, p.259-266, 1962.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, V. B. Atuação de rizóbio com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 03, p. 407-412, 2006 a.

SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; FIGUEIREDO, M.V.B,. Coinoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pelas plantas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 36:95-99, 2006 b.

SILVA, R. P. **INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO EM CAUPI NO SERTÃO DA PARAIBA**. Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciência do Solo, para obtenção do título de Mestre. 2006.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmosphere does prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, Washington, v.224, p.1095-1097, 1984.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004.

TEIXEIRA, K.R. dos S. **Bases moleculares e genética da Fixação Biológica de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, out. 1997. 26p. (Embrapa-CNPAB.Documentos, 32)

TEIXEIRA, K. R. S.; MARIN, V. A.; BALDANI, J.A.; **Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1998, 25p (Embrapa – CNPAB. Documentos, 84).

URQUIAGA, S.; ZAPATA, F. **Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe**. Porto Alegre: Gênese, 2000. 110 p.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, Blackwell Scientific, 1970. 164p.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. Tradução: Horácio Macedo. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1992. 712p.

WEBER, M.A. e MIELNICZUK, J. Estoque e disponibilidade de nitrogênio no solo em experimento de longa duração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. n.33. p. 429-437, 2009.

YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4581-4583, 2001.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro. **Caatinga** (Mossoró, Brasil), v. 20, n. 4, p. 01-09, 2007.

XAVIER, G. R.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L. Inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e a produtividade de grãos de feijão-caupi. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.2037-2041, out, 2008.

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. É; 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. **Revista ACTA Amazônica**. 2009.

ZILLI, J. É; NETO, M. L. S; JÚNIOR, I. F; PERIN, L; MELO A. R. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 2011.

ZILLI, J. É. PERREIRA, G. M. D.;FRANÇA JUNIOR, I.; SILVA, K.; HUNGRIA, M.;ROUWS, J. R. C.Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. **Acta Amazônica**, vol. 43(2) 2013: p.153 – 160.

## 7 ANEXOS

**ANEXO A** - Meio de cultura LMA para rizóbios (Concentrações para 1L de solução).

Manitol	10,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g
NaCl	0,1g
Extrato de Levedura	0,5g
Azul de bromotimol	5,0 ml
Ajuste do pH para 6,8 utilizando solução ácida e completar o volume para 1L com água destilada.	
Meio sólido, colocar 16g de ágar por litro.	

**ANEXO B** – Solução Salina para diluição. (Concentrações para 1L de solução).

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,4g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2g
NaCl	0,1g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02g
Solução de micronutrientes	2 ml
FeEDTA (solução 1,64%)	4 ml
KOH	4,5g
Ajustar pH para 7,0 com uma solução alcalina e completar o volume para 1L com água destilada.	

**ANEXO C** – Solução de Micronutrientes (Concentrações para 1L de solução).

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,20g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1,40g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,175g
Completar o volume para 1L com água destilada	