

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**CIÊNCIA DO SOLO**

**TESE**

**Eficiência Simbiótica de Estirpes de Rizóbio**  
**Inoculadas em Feijão-Caupi com Ênfase na Região**  
**Centro-Oeste do Brasil**

**Elson Barbosa da Silva Júnior**

**2015**



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

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO  
INOCULADAS EM FEIJÃO-CAUPI COM ÊNFASE NA REGIÃO  
CENTRO-OESTE DO BRASIL**

**Elson Barbosa da Silva Júnior**

*Sob a Orientação do Pesquisador*  
**Gustavo Ribeiro Xavier**

*e Co-orientação dos Pesquisadores*  
**Robert Michael Boddey e Jerri Édson Zilli**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor**, curso  
de Pós-Graduação em Agronomia, Área  
de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Janeiro de 2015

633.3309817

S586e

T

Silva Júnior, Elson Barbosa da, 1987-  
Eficiência simbiótica de estirpes de rizóbio  
inoculadas em feijão-caupi com ênfase na Região  
Centro-Oeste do Brasil / Elson Barbosa da Silva  
Júnior. – 2015.

126 f.: il.

Orientador: Gustavo Ribeiro Xavier.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em  
Agronomia – Ciência do Solo, 2015.

Bibliografia: f. 109-123.

1. Feijão-caupi – Cultivo – Brasil, Centro-Oeste -  
Teses. 2. Feijão-caupi - Inoculação - Brasil, Centro-  
Oeste - Teses. 3. Nitrogênio - Fixação - Teses. 4.  
Rizóbio – Teses. I. Xavier, Gustavo Ribeiro, 1973- II.  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso  
de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.  
III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**ELSON BARBOSA DA SILVA JÚNIOR**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 07/01/2015

---

Gustavo Ribeiro Xavier. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Lúcia Helena Cunha dos Anjos. Ph.D. UFRRJ

---

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ

---

Norma Gouvêa Rumjanek. Ph.D. Embrapa Agrobiologia

---

Glaciela Kaschuk. Ph.D. UNIPAR

## DEDICATÓRIA

A sociedade brasileira, que em sua grande maioria vive marginalmente a ciência, esta que é custeadora dos meus estudos. Onde bem diz Florestan Fernandes “Em nossa época, o cientista precisa tomar consciência da utilidade social e do destino prático reservado a suas descobertas”.

Dentro desta sociedade inclui à minha família, que me apoiou na construção de anos de estudo longe de casa, em especial a minha mãe Maria Ferreira da Silva. A minha companheira Maiza Gabrielle Ribeiro Pereira pelo amor inestimável e ao meu filho Arthur Marx Ribeiro Barbosa, onde ambos fazem meus esforços se tornarem leves.

*“Sou um homem de causas. Vivi sempre pregando, lutando, como um cruzado, pelas causas que comovem. Elas são muitas demais: a salvação dos índios, a escolarização das crianças, a reforma agrária, o socialismo em liberdade, a universidade necessária. Na verdade somei mais fracassos que vitórias em minhas lutas, mas isso não importa. Horrível seria ter ficado ao lado dos que nos venceram nessas batalhas”. (Darcy Ribeiro)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela saúde e proteção diária da minha vida e de todos os meus entes queridos.

A todos da minha família, em especial a minha mãe (Maria Ferreira da Silva), que sempre acreditou em uma vida melhor por meio dos estudos, mesmo com o pouco conhecimento sobre eles.

A meus irmãos irmãs Jenevaldo, Ivânia, Dirceu, Darci, Luciana e Benevaldo. Ao meu pai (Elson Barbosa da Silva) pela vida de trabalho e dedicação.

À UFRRJ e ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, pela estrutura e organização que me deu toda a segurança e confiança nesta trajetória.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Aos meus orientadores Drs. Gustavo Xavier, Robert Boddey e Jerri Zilli pela paciência, incentivo, críticas, sugestões e dedicação. E principalmente por acreditarem na minha capacidade. Muito Obrigado.

Ao João Luiz Bastos no qual não tenho palavras que possa expressar minha gratidão, foi técnico de laboratório, motorista, técnico de campo e amigo nas incansáveis viagens para o Mato Grosso, sendo importantíssimo neste trabalho.

À Embrapa Agrobiologia pelo apoio e infraestrutura recebidos para realização desse trabalho, com destaque para o Alderi (Terraço).

Ao Anderson Ferreira por toda dedicação na condução dos experimentos em Sinop, sem o seu compromisso nada disso seria possível.

A Embrapa Agrossilvipastoril pelo espaço e funcionários cedidos para a realização dos experimentos.

Ao Osmar Bonchila pelo apoio, dedicação e prazer em contribuir no desenvolvimento da pesquisa em Primavera do Leste-MT, sendo figura essencial neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEMI): Andréa (Doutoranda), Dra. Anelise, Carlos (Doutorando), Dani (Bolsista), Fernanda (Doutoranda), Jackson (Doutorando), Dr. Samuel, Silvana (Doutoranda), Sumaya (Doutoranda), Gustavo (Bolsista), Barbara (Bolsista), Israel (Bolsista), Gleyson (Bolsista) e Vinício (Bolsista). Em especial a Fernanda e Vinício que ajudaram diretamente na pesquisa e nos momentos de necessidade.

Ao grupo de Ciclagem de Nutrientes, em especial a Ana Paula e a Carla.

Aos pesquisadores do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEMI) Dra. Márcia, Dra. Norma, Dr. Luc e a analista Karine.

Aos colegas do curso, obrigada pelos momentos de descontração e convivência harmoniosa.

A minha companheira Maiza, pelo amor, apoio, carinho e cumplicidade na construção desta vitória, que agora se torna nossa.

A todos aqueles que direta e indiretamente, contribuíram para a execução do presente trabalho, sem estas colaborações o objetivo não teria sido alcançado.

## **BIOGRAFIA**

Elson Barbosa da Silva Júnior, filho de Elson Barbosa da Silva e Maria Ferreira da Silva, nasceu em 19 de fevereiro de 1987, na cidade de Varzelândia, estado de Minas Gerais. Em 2001 concluiu o ensino fundamental na Escola Estadual Padre José Silveira e ingressou na antiga Escola Agrotécnica Federal de Januária para concluir o ensino médio e Técnico em Agropecuária em 2004. No ano 2005 cursou o Técnico em Irrigação e Drenagem no Centro Federal de Educação Tecnológica de Januária, deixando o incompleto para em 2006 adentrar na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, graduando-se em Licenciatura em Ciências Agrícolas em 2009. No início de sua graduação dedicou-se a estudar sobre sociologia rural, estagiando na Pós Graduação em Desenvolvimento e Agricultura - CPDA/UFRRJ, depois então ingressou na Embrapa Agrobiologia, como bolsista de Iniciação Científica atuando diretamente em projetos de pesquisa de 2007 a 2009. Ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo (CPGA-CS) da UFRRJ em março de 2010, como bolsista da CAPES, desenvolvendo sua dissertação “Avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantios Tecnificados de Feijão-Caupi na Região Centro-Oeste do Brasil”, junto aos laboratórios de Ciclagem de Nutrientes e Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia, em 2012. Neste mesmo ano ingressou no Doutorado do curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo da UFRRJ, como bolsista da CAPES. Tendo feito seu estágio a docência na disciplina de Biologia do Solo/UFRRJ (IA-318) e atuado como professor colaborador em alternância via pesquisa e estágio de docência de doutoramento na disciplina de Agroecologia Básica II para discentes do curso de Licenciatura em Educação do Campo da UFRRJ. Atualmente é o presidente da Associação dos Profissionais Licenciados em Ciências Agrícolas (APLICA, 1977). Concluindo o doutorado no CPGA-CS, defendendo a tese “Eficiência simbiótica de estirpes de rizóbio inoculadas na cultura do feijão-caupi com ênfase na região Centro-Oeste do Brasil” na presente data.

## RESUMO GERAL

SILVA JÚNIOR, Elson Barbosa. **Eficiência simbiótica de estirpes de rizóbio inoculadas na cultura do feijão-caupi com ênfase na região Centro-Oeste do Brasil**. 2015. 126f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2015.

O objetivo do estudo foi evidenciar a eficiência da inoculação com a fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão-caupi, levando em conta a variabilidade da resposta em função das condições edafoclimáticas, da eficiência simbiótica e da densidade de células das estirpes inoculadas. As hipóteses apresentadas são: A nodulação do feijão-caupi na região Centro-Oeste pela estirpe de rizóbio inoculada no plantio é influenciada pela população nativa já estabelecida no solo; a inoculação com a mistura de estirpes de rizóbio para feijão-caupi tem maior capacidade de competir com as estirpes já estabelecidas no solo; e o aumento da densidade (UFC semente<sup>-1</sup>) na inoculação das sementes de feijão-caupi aumenta a capacidade das estirpes de rizóbio de competir contra as estirpes já estabelecidas no solo. O estudo constituiu de um experimento em vasos de Leonard, um experimento em vasos de 5 kg com substrato (areia e perlita), dois experimentos com amostras de solo (Planossolo Háplico e Latossolo Vermelho Amarelo) em vasos de 5 kg e oito ensaios de campo, localizados nas regiões Norte (Boa Vista-RR), Centro-Oeste (Sinop-MT e Primavera do Leste-MT) e Sudeste (Seropédica-RJ e Vila Pavão-ES). Nos experimentos foram usadas quatro estirpes recomendadas – BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B (BR 3301), UFLA 03-84 (BR 3302), mais a BR 3299 (em processo de recomendação), além do consórcio/mistura dessas estirpes. Em vasos de Leonard as estirpes individuais assim como o consórcio ou a mistura não diferiram quanto à nodulação. Nos ensaios em vasos no Planossolo Háplico e no substrato (areia e perlita), as avaliações com 35 DAE e 50 DAE não apresentaram diferença quanto á massa seca da parte aérea. No ensaio com amostra do Latossolo Vermelho Amarelo, o período de 20 a 40 DAE foi a fase que concentrou a maior atividade da nitrogenase das estirpes inoculadas e os resultados com a quantificação da FBN (%Ndfa) mostraram que a melhor época para a realização está entre 40 e 50 DAE; onde para o N derivado da FBN, a BR 3262 apresentou os maiores valores aos 30, 40 e 50 DAE. No ambiente de Cerrado, safra 2010/2011, a maior produtividade (1609 kg ha<sup>-1</sup>) foi para a inoculação com a mistura de estirpes; e na Mata Atlântica, safra 2012, o maior rendimento de grãos (1322 kg ha<sup>-1</sup>) ocorreu com a estirpe BR 3267. Na safrinha 2013 em Mato Grosso (Sinop e Primavera do Leste), foi observada nas estirpes inoculadas diluição isotópica pela abundância natural delta <sup>15</sup>N. O rendimento de grãos na inoculação com a estirpe BR 3262 foi superior ao controle (População nativa) e a inoculação com a estirpe BR 3299 em Primavera do Leste. Em Sinop a inoculação com esta estirpe teve a maior produtividade e foi superior a inoculação com BR 3267, BR 3301 e BR 3302. A estirpe BR 3262 também proporcionou o maior acúmulo de nitrogênio entre as estirpes inoculadas em ambos os experimentos e contribuiu para entrada de N no sistema via FBN superior ao controle (população nativa), nos dois ensaios em Sinop e Primavera do Leste, com 64 e 71 kg ha<sup>-1</sup> de N fixado, respectivamente. A nodulação no feijão-caupi respondeu positivamente ao aumento da densidade de células de rizóbios aplicadas nas sementes, e entre as densidades testadas, para o maior rendimento de grãos do feijão-caupi deve-se usar no mínimo 1,2 x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônias por sementes.

**Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*. Inoculação. Quantificação FBN.

## GENERAL ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, Elson Barbosa. **Symbiotic efficiency of rhizobia strains inoculated in the culture of cowpea with emphasis on the Midwest region of Brazil.** 2015. 126p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2015.

The study aimed to demonstrate the effectiveness of the inoculation with the nitrogen fixation in cowpea culture, taking in to account the variability of the response depending on the climate conditions, and the efficiency of symbiotic strains and the inoculated cell density. For that was approached three hypotheses: nodulation of cowpea in the Midwest by rhizobia strain inoculated at planting is influenced by the native population already established in the soil; inoculation with the mixture of rizóbios strains to cowpea is better able to compete with the strains already established in the soil and increasing density (seed<sup>-1</sup> Ufc) on the inoculation of cowpea seeds increases the capacity of strains rhizobium strains to compete against established in the soil. Thus the study consisted of one (1) experiment in Leonard jars, one (1) experiment in 5 kg pots with substrate (sand and perlite), two (2) experiments with soil (Fragiudult soil and Oxisol) in pots 5 kg and eight (8) field trials, located in the North (Boa Vista-RR), Midwest (Sinop-MT and Primavera do Leste-MT) and Southeast (Seropédica-RJ and Vila Pavão-ES). For the experiments we used the four strains recommended BR 3267; BR 3262; INPA 03-11B (BR 3301); UFLA 03-84 (BR 3302), plus BR 3299 (In process of recommendation) and the consortium / mixture of these strains. In Leonard jars individual strains as well as the consortium or the mixture did not differ in nodulation. In tests in pots in soil (Fragiudult soil) and the substrate (sand and perlite), the ratings with 35 and 50 DAE did not differ as to the dry weight of shoots. In Oxisol , the period 20-40 DAE is the phase that focuses the highest nitrogenase activity of inoculated strains and the results with the quantification of FBN (% Ndfa) showed that the best time to carry them out is between 40 and 50 DAE, and the evaluation of nitrogen derived from BNF, BR 3262 presented the highest values at 30, 40 and 50 DAE. When tested in the Cerrado 2010/2011 harvest inoculation with the mixture of strains provided the highest yield (1609 kg ha<sup>-1</sup>), while in the Atlantic Forest harvest 2012 to inoculation with the BR 3267 strain promoted the highest grain yield (1322 kg ha<sup>-1</sup>). In tests in the crop in 2013 in Mato Grosso (Sinop-MT and Primavera do Leste-MT), the inoculated strains showed isotopic dilution by natural abundance delta <sup>15</sup>N. Inoculation with strain BR 3262 afforded the yield of grains higher than the control (native population), the inoculation with the strain BR 3299 Primavera do Leste-MT while Sinop-MT inoculation with this strain had the highest productivity and is superior inoculation with BR 3267, INPA 03-11B (BR 3301) and UFLA 03-84 (BR 3302). The strain BR 3262 also resulted in the highest accumulation of nitrogen between the strains inoculated in both experiments and contributed to nitrogen entering the system via the top FBN provided by the control (native population) in both tests in Sinop-MT and Primavera do Leste-MT, providing 64 and 71 kg ha<sup>-1</sup> of N fixed, respectively. The nodulation in cowpea culture increased with increasing density of rhizobia cells applied to the seed, and among the tested densities, to be able to provide the highest yield of cowpea grain must be at least 1.2 x10<sup>6</sup> colony forming units per seed.

**Key words:** *Vigna unguiculata*. Inoculation. Quantification FBN.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Experimento em vasos de Leonard com feijão-caupi (30 DAE) na casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia. .... 30
- Figura 2.** Experimento com feijão-caupi (25 DAE) em vaso ao campo aberto na Embrapa Agrobiologia. .... 32
- Figura 3.** Experimento com feijão-caupi (50 DAE) em amostra de Latossolo Vermelho-Amarelo na casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia. .... 33
- Figura 4.** Média do número de nódulos por planta de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada com a estirpe BR 3267 (a), BR 3262 (b), BR 3301/INPA 03-11B (c), BR 3302/UFLA 03-84 (d), BR 3299 (e) e a mistura de estirpes (f), sendo todas as estirpes comparadas com a população nativa (Controle, sem inoculação e adubação). \*Significativo a 10%; \*\*Significativo a 5%; \*\*\*Significativo a 1%. .... 42
- Figura 5.** Média da massa seca de nódulos por planta de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada com a estirpe BR 3267 (a), BR 3262 (b), INPA 03-11B/BR 3301 (c), UFLA 03-84/BR 3302 (d), BR 3299 (e) e a mistura de estirpes (f), sendo todas as estirpes comparadas com a população nativa (Controle, sem inoculação e adubação). \*Significativo a 10%; \*\*Significativo a 5%; \*\*\*Significativo a 1%. .... 45
- Figura 6.** Média da massa seca da parte aérea por planta de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada com a estirpe BR 3267 (a), BR 3262 (b), INPA 03-11B/BR 3301 (c), UFLA 03-84/BR 3302 (d), BR 3299 3301 (e) e a mistura de estirpes (f), sendo todas as estirpes comparadas com a população nativa (Controle, sem inoculação e adubação). \*Significativo a 10%; \*\*Significativo a 5%; \*\*\*Significativo a 1%. .... 46
- Figura 7.** Média da atividade da nitrogenase em raízes noduladas de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada com a estirpe BR 3267 (a), BR 3262 (b), BR 3301 (c), BR 3302 (d), BR 3299 (e) e a mistura de estirpes (f), sendo todas as estirpes comparadas com a população nativa (Controle, sem inoculação e adubação). \*Significativo a 10%; \*\*Significativo a 5%; \*\*\*Significativo a 1%. .... 48
- Figura 8.** Média da quantificação da FBN (%Ndfa) pela abundância natural  $\delta^{15}\text{N}$  de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada com a estirpe BR 3267 (a), BR 3262 (b), INPA 03-11B/BR 3301 (c), UFLA 03-84/BR 3302 (d), BR 3299 (e) e a mistura de estirpes (f), sendo todas as estirpes comparadas com a população nativa (Controle, sem inoculação e adubação). \*\*\*Significativo a 1%; \*\*Significativo a 5% e \*Significativo a 10%. .... 53
- Figura 9.** Experimento de feijão-caupi na área de Cerrado (Sinop-MT) no campo experimental da Embrapa Agrossilvipastoril. .... 62
- Figura 10.** Experimento na área de Mata Atlântica (Vila Pavão-ES) no CEIER/ES. .... 63
- Figura 11.** Experimento de feijão-caupi (30 DAE) no período da safrinha na área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril (Sinop-MT). .... 77
- Figura 12.** Experimento de feijão-caupi (30 DAE) no período da safrinha na fazenda “Iberê” (Primavera do Leste- MT). .... 78
- Figura 13.** Número de nódulos por planta de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) “BRS Guariba”, 35 dias após emergência, em resposta a diferentes densidades de células rizobianas aplicadas por semente na região Norte, em área de primeiro cultivo e em área já cultivada, ambas em Boa Vista- RR. <sup>ns</sup>Não significativo. .... 99

- Figura 14.** Massa seca de nódulos por planta de feijão-caupi (BRS Guariba) em resposta a diferentes densidades de células rizobianas aplicadas por semente e em diferentes localidades no Brasil. Na região Norte, em área de primeiro cultivo e em área já cultivada, ambas em Boa Vista, RR; na região Centro-Oeste, em Sinop, MT; e, na região Sudeste, em Seropédica, RJ. \*\* e \*Significativo a 5 e 10% de probabilidade, respectivamente. <sup>ns</sup>Não significativo. Coeficientes de variação: na região Norte, em área já cultivada, de 21,49%; na região Centro-Oeste, de 17,86%; e, na região Sudeste, de 24,66%. ..... 100
- Figura 15.** Massa seca da parte aérea por planta de feijão-caupi (BRS Guariba) em função de diferentes densidades de células rizobianas aplicadas por semente e em diferentes localidades no Brasil. Na região Norte, em área de primeiro cultivo e em área já cultivada, ambas em Boa Vista, RR; na região Centro-Oeste, em Sinop, MT; e, na região Sudeste, em Seropédica, RJ. <sup>ns</sup>Não significativo. .... 101
- Figura 16.** Nitrogênio acumulado na parte aérea por planta de feijão-caupi (BRS Guariba), 35 dias após emergência, em função de diferentes densidades de células rizobianas aplicadas por semente nas regiões Sudeste (Seropédica, RJ) e Centro-Oeste (Sinop, MT). <sup>ns</sup>Não significativo. .... 102
- Figura 17.** Rendimento de grãos secos de feijão-caupi (BRS Guariba) em função de diferentes densidades de células rizobianas aplicadas por semente e em diferentes localidades no Brasil. Na região Norte, em área de primeiro cultivo e em área já cultivada, ambas em Boa Vista, RR; na região Centro-Oeste, em Sinop, MT; e, na região Sudeste, em Seropédica, RJ. \*\*\*, \*\* e \*Significativo a 1, 5 e 10% de probabilidade, respectivamente. <sup>ns</sup>Não significativo. Coeficientes de variação: na região Norte, em área já cultivada, de 18,77%; na região Centro-Oeste, de 10,86%; e, na região Sudeste, de 9,06%. .... 103
- Figura 18.** Nitrogênio acumulado nos grãos secos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) “BRS Guariba”, 75 dias após emergência, em função de diferentes densidades de células rizobianas aplicadas por semente nas regiões Sudeste (Seropédica, RJ) e Centro-Oeste (Sinop, MT). \*\*\*Significativo a 1% de probabilidade. Coeficientes de variação: na região Sudeste, de 5,61% e na região Centro-Oeste, de 12,77%. .... 104

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Avaliação do número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa da seca da parte aérea (MSPA) e teor de nitrogênio da parte aérea de feijão-caupi (IPA 206), em condições de casa de vegetação.....	36
<b>Tabela 2.</b> Avaliação do acúmulo de nitrogênio da parte aérea (ANPA), eficiência relativa na parte aérea (EfR PA), eficiência relativa dos nódulos (EfR N) e razão nodular (RN) de feijão-caupi (IPA 206), em condições de casa de vegetação.....	38
<b>Tabela 3.</b> Desdobramento do tratamento dentro de cada tempo de coleta, quanto a número e massa seca de nódulos, e massa seca da parte aérea de feijão-caupi (BRS Guariba) cultivado em amostras de solo (Planossolo Háplico) e em substrato (Perlita e areia)..	40
<b>Tabela 4.</b> Média de duas coletas (35 e 50 DAE) das variáveis número e massa seca de nódulos, e massa seca da parte aérea de feijão-caupi (BRS Guariba) em solo (Planossolo Háplico) e substrato (Perlita e areia).....	41
<b>Tabela 5.</b> Desdobramento do tratamento dentro de cada tempo de coleta durante o ciclo fenológico, quanto a número e massa seca de nódulos; massa seca de raiz e da parte aérea e atividade da nitrogenase de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada e não inoculada.....	43
<b>Tabela 6.</b> Média em cada tempo de coleta e do tratamento das variáveis número e massa seca de nódulos; massa seca de raiz e da parte aérea e atividade da nitrogenase de feijão-caupi (BRS Guariba).....	50
<b>Tabela 7.</b> Desdobramento do tratamento dentro de cada tempo de coleta, quanto as variáveis delta $\delta^{15}\text{N}$ (‰), porcentagem de nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio acumulado na parte aérea e nitrogênio derivado da FBN na parte aérea de feijão-caupi (BRS Guariba). ....	51
<b>Tabela 8.</b> Média dos tratamentos nos três tempos de coleta (30, 40 e 50 DAE) e média dos tempos de coleta das variáveis delta $\delta^{15}\text{N}$ (‰), porcentagem de nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio acumulado na parte aérea e nitrogênio derivado da FBN na parte aérea de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba). ....	54
<b>Tabela 9.</b> Análise da fertilidade, textura do solo e precipitação pluvial dos Experimentos na área de Cerrado (Sinop-MT) e em Mata Atlântica (Vila Pavão-ES).....	63
<b>Tabela 10.</b> Massa de nódulos secos e de raiz seca de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba). ....	65
<b>Tabela 11.</b> Massa da parte aérea seca (caule, ramos e folhas) e nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba).....	67
<b>Tabela 12.</b> Rendimento de grãos e nitrogênio acumulado nos grãos de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba). ....	68
<b>Tabela 13.</b> Eficiência relativa da parte aérea e eficiência relativa do nódulo de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba). ....	69
<b>Tabela 14.</b> Razão nodular de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba).....	70
<b>Tabela 15.</b> Análise da fertilidade e granulometria do solo e precipitação pluvial da camada de 0-20 cm nas áreas dos experimentos na safrinha, em Sinop-MT e Primavera do Leste-MT. ....	78

<b>Tabela 16.</b> Massa seca de nódulos e massa seca da parte aérea (caule, ramos e folhas) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 35 dias após emergência na safrinha/2013 em duas localidades do Mato Grosso (Sinop e Primavera do Leste). .....	81
<b>Tabela 17.</b> Massa seca da parte aérea (caule, ramos e folhas) e nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 50 dias após emergência na safrinha/2013 em duas localidades do Mato Grosso (Sinop e Primavera do Leste). ...	83
<b>Tabela 18.</b> Delta $\delta^{15}\text{N}$ (‰), nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio derivado da FBN na parte aérea e nitrogênio fixado ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 50 dias após a emergência na safrinha/2013 em Sinop-MT.....	84
<b>Tabela 19.</b> Delta $\delta^{15}\text{N}$ (‰), nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio derivado da FBN na parte aérea e nitrogênio fixado ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 50 dias após a emergência na safrinha/2013 em Primavera do Leste-MT...	85
<b>Tabela 20.</b> Nitrogênio acumulado nos grãos e produtividade de grãos secos de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 75 dias após emergência na safrinha/2013 em duas localidades do Mato Grosso (Sinop e Primavera do Leste).....	88
<b>Tabela 21.</b> Análise química e granulométrica do solo da camada de 0 a 20 cm de profundidade dos experimentos conduzidos nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil.....	98
<b>Tabela 22.</b> Rendimento de grãos secos em função da densidade de rizóbios na inoculação de sementes de feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> ) em resposta a adubação com $70 \text{ kg ha}^{-1}$ de N em experimentos da região Norte, Centro-Oeste e Sudeste.....	105

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio e a Cultura do Feijão-Caupi.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Início da FBN como tecnologia no Brasil.....	4
2.1.2 Cenário nacional do feijão-caupi .....	5
2.1.3 Contribuição da FBN na cultura do feijão-caupi.....	7
<b>2.2 Variação da Resposta das Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> Recomendadas para Feijão-Caupi.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 Fatores Específicos que Afetam Diretamente a Variabilidade da Eficiência Simbiótica .....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Competição por fotoassimilados .....	12
2.3.2 Absorção/remobilização do nitrogênio de outras fontes.....	14
2.3.3 Senescência dos nódulos.....	15
2.3.4 Atividade da nitrogenase .....	16
<b>2.4 Fatores Indiretos que Limitam a Eficiência da FBN.....</b>	<b>18</b>
2.4.1 Fatores edafoclimáticos.....	18
2.4.2 Sobrevivência e a competitividade nodular .....	19
2.4.3 Densidade de UFC por semente na inoculação.....	20
2.4.4 Nitrogênio presente no solo .....	21
2.4.5 Nutrição mineral da planta .....	21
<b>2.5 Prática Agrícola da Inoculação.....</b>	<b>23</b>
<b>3 CAPÍTULO I CARACTERIZAÇÃO DA NODULAÇÃO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES RECOMENDADAS PARA FEIJÃO-CAUPI.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 RESUMO.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 ABSTRACT .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.4.1 Nodulação das estirpes de feijão-caupi em vasos de Leonard .....	30
3.4.2 Caracterização da nodulação das estirpes de feijão-caupi em amostras de Planossolo Háplico e em substrato (Areia e perlita).....	31
3.4.3 Eficiência simbiótica das estirpes de feijão-caupi em função do ciclo fenológico em amostras de Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico do Centro-Oeste.....	32
<b>3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
3.5.1 Caracterização da nodulação das estirpes de feijão-caupi em vasos de Leonard.....	36
3.5.2 Caracterização da nodulação das estirpes de feijão-caupi em amostras de Planossolo Háplico e em substrato (Areia e perlita).....	39
3.5.3 Eficiência simbiótica das estirpes de feijão-caupi em função do ciclo fenológico em amostras de Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico da região Centro-Oeste..	41
<b>3.6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>4 CAPÍTULO II VARIAÇÃO DA RESPOSTA DO FEIJÃO-CAUPI A INOCULAÇÃO EM CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DISTINTAS .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 RESUMO.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2 ABSTRACT .....</b>	<b>59</b>

<b>4.3 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>4.4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>62</b>
<b>4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>4.6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>5 CAPÍTULO III QUANTIFICAÇÃO DA FBN NA CULTURA DO FEIJÃO-CAUPI EM CAMPO NA SAFRINHA NO CENTRO-OESTE .....</b>	<b>72</b>
<b>5.1 RESUMO.....</b>	<b>73</b>
<b>5.2 ABSTRACT.....</b>	<b>74</b>
<b>5.3 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>5.4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
<b>5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>5.6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>6 CAPÍTULO IV RESPOSTA DO FEIJÃO-CAUPI Á INOCULAÇÃO COM DIFERENTES DENSIDADES RIZOBIANAS .....</b>	<b>92</b>
<b>6.1 RESUMO.....</b>	<b>93</b>
<b>6.2 ABSTRACT.....</b>	<b>94</b>
<b>6.3 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>6.4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>97</b>
<b>6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>6.6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>106</b>
<b>7 CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>107</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>108</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>109</b>
<b>10 ANEXOS.....</b>	<b>124</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é conhecida como a cultura de pequenos agricultores de base familiar das regiões Norte e Nordeste, entretanto a cultura hoje é plantada também na região Centro-Oeste do Brasil por grandes agricultores que utilizam modernas tecnologias de produção. Em 2005, a cultura já era cultivada em mais de 45 mil ha sob sistema de plantio direto no período da safrinha, utilizando o resíduo dos fertilizantes aplicados na soja. Hoje, pode-se dizer que o feijão-caupi é uma cultura do agronegócio, que já ocupa mais de 150 mil hectares no Centro-Oeste (CONAB, 2012). Na presente situação, tornam-se relevantes pesquisas que abordem as condições de produção e o ambiente do Cerrado da região Centro-Oeste, pois resultados dos trabalhos oriundos das regiões Norte e Nordeste, podem não ser apropriados para nortear o cultivo da cultura no Centro-Oeste. Também os estudos sobre a eficiência simbiótica na fixação biológica de nitrogênio (FBN) se baseiam em realidade diferente da encontrada no Centro-Oeste.

Entre as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) primeiramente descrita a espécie *Rhizobium leguminosarum* tem destaque, pois dela se originou o nome rizóbio, que tem sido usado coletivamente para denominar as espécies de BFNNL. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) em feijão-caupi foi entendida por anos como um processo que não precisava de interferência, em virtude da promiscuidade da planta em ser nodulada, conseqüentemente por muitos anos a ideia de seleção de estirpes eficientes para a cultura foi desacreditada. Porém os trabalhos de seleção de estirpes dos últimos 15 anos provaram o contrário, o que levou a recomendação de quatro estirpes autorizadas para produção de inoculantes comerciais para a cultura no Brasil, e comercialização de mais de 150.000 doses por ano (ANPII, 2012).

Porém, esses estudos resultaram de ensaios localizados nas regiões Nordeste, Norte e Sudeste, com predomínio da primeira. Por outro lado, o Cerrado da região Centro-Oeste é caracterizado por alta densidade de rizóbios no solo, capazes de nodular o feijão-caupi, porém não se tem dados científicos sobre eficiência simbiótica das estirpes recomendadas.

A dificuldade de condução de trabalhos científicos que possam abranger mais de uma região ou até mesmo mais de um estado, faz com que os resultados de desempenho das estirpes inoculadas em feijão-caupi sejam limitados as condições do estudo. Torna-se necessário uma abordagem mais ampla, onde o desempenho das estirpes seja avaliado considerando sempre mais de uma condição, seja de casa de vegetação, solo, substrato e em campo. Somente avaliando o desempenho das estirpes, expostas a condições edafoclimáticas diferentes, podem ser obtidos resultados que ultrapassem a fronteira local de um dado estudo.

Na literatura estima-se que a contribuição da FBN em feijão-caupi pode estar entre 40 a 90%, uma faixa muito ampla; porém esses valores decorrem apenas de três trabalhos (BODDEY et al., 1990; FREITAS et al., 2012; ALCANTARA et al., 2014) que quantificaram a FBN em feijão-caupi a campo no Brasil, dois deles da região Nordeste. Ainda, os trabalhos que avaliaram nodulação e produção do feijão-caupi concentram em um dado local, ou seja, faltam pesquisas que englobem mais de uma região no Brasil. Assim diante do novo cenário no Centro-Oeste e da falta de resultados da eficiência simbiótica das quatro estirpes recomendadas para feijão-caupi na região, torna-se necessário estudo com essa ênfase.

A abordagem da FBN em campo está relacionada a questão do balanço nutricional do sistema do solo, pois o crescimento observado da lavoura do feijão-caupi no Centro-Oeste se dá em áreas comumente cultivadas com soja, onde praticamente não há aplicação de adubos nitrogenados de forma direta na cultura.

Diante do cenário exposto, a primeira hipótese do estudo foi que a nodulação do feijão-caupi na região Centro-Oeste pela estirpe de rizóbio inoculada no plantio é influenciada pela população nativa já estabelecida no solo ou derivada dos inoculantes da soja, que reduziria a eficiência da FBN no feijão-caupi. Essa hipótese foi desenvolvida nos capítulos I, II e III. Outra hipótese do estudo é de que a inoculação com a mistura de estirpes de rizóbio para feijão-caupi tem maior capacidade de competir com as estirpes já estabelecidas no solo, que a inoculação com uma única estirpe, assim promovendo aumento da produtividade e a eficiência da FBN. Esta hipótese também foi desenvolvida nos capítulos I, II e III.

O Capítulo I “Caracterização da nodulação e eficiência simbiótica das estirpes de feijão-caupi” buscou reunir o máximo de informações sobre o comportamento da nodulação do feijão-caupi inoculado em condições estéreis e não estéreis, assim como avaliar o potencial da eficiência simbiótica das estirpes testadas.

O Capítulo II “Variação da resposta do feijão-caupi a inoculação em condições edafoclimáticas distintas” relata resultados da investigação de como a inoculação com as estirpes de feijão-caupi pode responder diferentemente quando as estirpes são expostas em campo e em áreas distintas.

No Capítulo III “Quantificação da FBN na cultura do feijão-caupi em campo na safrinha no Centro-Oeste” foi avaliada a contribuição que a simbiose com as estirpes inoculadas possibilita ao feijão-caupi, através da entrada de nitrogênio no sistema produtivo.

A prática agrícola da inoculação em feijão-caupi ainda está em processo de adoção pelos agricultores em geral, assim existe a necessidade de mais pesquisas que mostrem as vantagens do uso da inoculação em campo, bem como políticas de financiamento e suporte que possibilitem acesso dos pequenos agricultores ao inoculante. Entre as pesquisas voltadas para inoculação do feijão-caupi, a densidade de bactérias por semente (UFC por semente) merece destaque, pois não se sabe ao certo qual seria este valor para a cultura. Já que a quantidade adequada da estirpe inoculada na semente seria uma estratégia para aumentar a efetividade das estirpes inoculadas diante as bactérias nativas do solo.

Em função da necessidade de uma prática de inoculação ideal, foi formulada a terceira hipótese, de que o aumento da densidade (UFC por semente) na inoculação das sementes de feijão-caupi aumenta a capacidade competitiva das estirpes de rizóbio em relação as estirpes já estabelecidas no solo, assim aumentando a nodulação e a produção do feijão-caupi. Sendo está hipótese abordada no Capítulo IV.

Os ensaios relatados no CAPÍTULO IV “Resposta do feijão-caupi á inoculação com diferentes densidades rizobianas” foram desenvolvidos em três regiões (Sudeste, Norte e Centro-Oeste), para que os resultados não fossem restritos ao local de estudo, contrapondo a questão da resposta em função da região. Assim os resultados obtidos para a densidade ideal serão abrangentes e podem ser aplicados nas diferentes regiões do país.

Nesta tese buscou-se compor e avolumar evidências da eficiência da inoculação com a fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão-caupi, levando em consideração a variabilidade da resposta em função das condições edafoclimáticas, da eficiência simbiótica e da densidade das estirpes inoculadas. Para isso, o estudo compreendeu os seguintes objetivos:

- a) Caracterizar a nodulação do feijão-caupi inoculado com rizóbio em substrato e em solo;
- b) Avaliar a eficiência simbiótica da nodulação das estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi em função do ciclo fenológico em solo da região Centro-Oeste;
- c) Indicar o período mais adequado de coleta de plantas para a quantificação da FBN com a abundância natural delta  $^{15}\text{N}$ ;
- d) Avaliar a resposta da inoculação com a mistura de estirpes no feijão-caupi em condições edafoclimáticas distintas;

- e) Quantificar a FBN em campo na cultura do feijão-caupi no período de safrinha do Centro-Oeste; e
- f) Recomendar a densidade rizobiana (UFC por semente) para a inoculação do feijão-caupi.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio e a Cultura do Feijão-Caupi

#### 2.1.1 Início da FBN como tecnologia no Brasil

A FBN juntamente com a fotossíntese e a decomposição da matéria orgânica do solo, são considerados os mais importantes processos biológicos do planeta. Entre os nutrientes minerais essenciais às plantas, o nitrogênio (N) é que consome mais energia e, potencialmente, o mais poluente, sendo geralmente o mais limitante à produção vegetal (HUNGRIA et al., 2007), com exceção de algumas culturas monocotiledôneas. Microrganismos fixadores de N, chamados de diazotróficos, são capazes de quebrar a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), transformando-o em amônia ( $NH_3^+$ ), que ainda nos nódulos são rapidamente incorporados íons hidrogênio ( $H^+$ ), abundantes nas células das bactérias, ocorrendo a transformação em íons amônio ( $NH_4^+$ ) assimilável pelas plantas, que serão então, distribuídos para a planta hospedeira e incorporados em diversas formas de N orgânico, como os ureídeos, aminoácidos e amidas (HUNGRIA et al., 2007).

Os primeiros trabalhos referentes à FBN no Brasil surgiram por volta de 1930, nos relatórios do Instituto Agronômico de Campinas com estudos de simbiose rizóbio/leguminosas (FREIRE, 1999). A partir, de então intensificaram os estudos e a organização dos grupos de trabalho, com destaque para o Centro de Fixação Biológica do Nitrogênio, da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), que em 1950 iniciaram a seleção de estirpes e a produção de inoculantes, na antiga Seção de Microbiologia Agrícola (SEMIA), da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul (FREIRE, 1999).

Em princípio as pesquisas envolvendo a FBN foram destinadas a cultura da soja, que por volta da década de 60 teve o grande impulso na produção nacional de soja, sendo que já em 1976, o Brasil ocupou a vice-liderança mundial na produção mundial da soja (BOHRER & HUNGRIA, 1998). Esta seleção de estirpes resultou de imediato na recomendação da estirpe SEMIA 587, de alta eficiência e competitividade, que foi recomendada juntamente com as estirpes SEMIA 532 e 543 (FREIRE, 1977; FREIRE et al., 1983) de 1968 a 1996.

Em 1979, a SEMIA 587 voltou a ser recomendada, juntamente com a SEMIA 5019 (29W), por mais tempo usada nos inoculantes, que é a mesma estirpe BR29-RJ, isolada na Embrapa Agrobiologia por José Roberto Perez, com participação de Johanna Döbereiner (DÖBEREINER et al., 1970), a partir de um nódulo produzido em uma planta de soja que havia sido inoculada com uma estirpe com origem SEMIA (FRANCO, 2009). De acordo com a descrição de Franco (2009) a Dra. Johanna Döbereiner ajudou a implantar no Programa Nacional de Pesquisa da Soja o Ensaio Nacional de Variedades Versus Estirpes de Rizóbio. Os trabalhos de seleção de estirpes prosseguiram e em 1992 foram recomendadas mais duas estirpes: SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (FREIRE, 1997).

A recomendação destas estirpes para a inoculação e o cultivo sucessivo da soja no Brasil, culminou no estabelecimento destas estirpes no solo e, hoje, poucas são as áreas sem uma população rizobiana elevada (BOHRER & HUNGRIA, 1998; MENDES et al., 2004). Assim como foi comprovado em alguns levantamentos, Hungria et al. (1994) constataram que dominam nos solos brasileiros os sorogrupos das estirpes SEMIA 566, SEMIA 5019 (29W) e SEMIA 587, caracterizadas pela competitividade elevada.

Um dos fatores preponderantes para o estabelecimento da soja no Brasil foi o desenvolvimento do trabalho de melhoramento genético aliado à seleção de estirpes,

resultando em uma FBN eficiente, devido em parte aos esforços da pesquisadora Johanna Döbereiner (DÖBEREINER & ARRUDA, 1967).

O caminho percorrido pela FBN e o estabelecimento da cultura de soja no Brasil é o melhor exemplo para a cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). De acordo com Ng & Marechal (1985) esta cultura tem sua origem no oeste da África, mais precisamente na Nigéria. O feijão-caupi chegou à América Latina no século XVI, primeiramente nas colônias espanholas e em seguida no Brasil, provavelmente a partir do estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988). Da Bahia, o feijão-caupi foi levado pelos colonizadores para outras áreas do Nordeste e outras regiões do País. No decorrer destes anos o estabelecimento da cultura se concentrou nas regiões Norte e Nordeste, cultivada pelos pequenos agricultores (FREIRE FILHO, 2005). Nos últimos anos, provavelmente a partir de 2005 em diante a cultura começou seu processo de expansão para a região Centro-Oeste ocupando espaço em grandes áreas, voltada para uma produção com maior investimento em tecnologia, visando a altos índices de produtividade.

Assim como na soja na década de 60, a presente década (2010 a 2020) poderá ser um marco para a expansão do feijão-caupi no Brasil, onde nos últimos anos tem aumentado o número de cultivares. Nota-se que o melhoramento genético está voltado para o aumento de produtividade e aperfeiçoamento da arquitetura da planta, para proporcionar o seu cultivo com maquinários. Entretanto, este melhoramento poderá interferir na FBN, como observado por Xavier et al. (2006), em que a taxa de ocupação nodular de estirpes de rizóbios utilizadas como inoculante é dependente da origem dos acessos de feijão-caupi.

### **2.1.2 Cenário nacional do feijão-caupi**

A lavoura do feijão-caupi foi caracterizada como de subsistência, sendo até a década de 90, quase exclusivamente cultivada por pequenos e médios agricultores de base familiar das regiões Norte (55,8 mil hectares) e Nordeste (1,2 milhão de hectares) (FREIRE FILHO, 2005); embora Zilli et al. (2009) tenham mostrado que na região Norte o feijão-caupi já ocupava área de 76 mil hectares. Segundo Amaral et al. (2005) o feijão-caupi ocupava 60% das áreas cultivadas com feijão no Nordeste e 30% da área total de feijão do Brasil, tendo em média níveis de produtividade inferiores aos do feijão comum. Estima-se que 95 a 100% das áreas plantadas com feijão nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte, o são com feijão-caupi; sendo o estado do Ceará o maior produtor nacional, com área plantada de 550,3 mil hectares e produção de 167,8 mil toneladas, seguido pelo Piauí (AMARAL et al., 2005).

Barbosa et al. (2010) avaliaram o perfil socioeconômico e tecnológico dos produtores de feijão-caupi na região Norte e constataram quatro sistemas de cultivo. O primeiro adotado por 39% dos agricultores e envolve o preparo mecanizado do solo e adubação mineral; o segundo era adotado por 8% dos agricultores, com preparo mecanizado do solo, porém sem adubação mineral; o terceiro sistema foi o mais utilizado, sendo adotado por 42% dos agricultores, onde se fazia uso do preparo manual do solo com adubação mineral; o último sistema foi adotado por 11% dos agricultores, e é considerado o tradicional, ou seja, envolve o preparo manual da área e sem uso de adubação mineral.

Almeida et al. (2008) realizou um diagnóstico em perímetro irrigado no estado do Piauí (Caldeirão, no município de Piriipiri) da fertilidade dos solos em áreas com histórico de cultivo entre dois e seis anos com feijão-caupi. Os autores constataram que a maioria das amostras de solo apresentava teores de P baixo e muito baixo, principalmente com o aumento da profundidade, mostrando que só a irrigação não é suficiente como prática de manejo para aumentar a produtividade da cultura.

Um dos fatores que provavelmente assegurou a produção de feijão-caupi por pequenos agricultores é sua capacidade de nodular com diferentes grupos de bactérias, promovendo assim a assimilação de nitrogênio independente da sua aplicação na forma de adubação, mesmo sendo estas taxas de FBN abaixo do esperado, em função da especificidade (RUMJANEK et al., 2005). Esta promiscuidade em ser nodulada fez com que somente em 2004, na reunião da RELARE (Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola), a estirpe, até então registrada no MAPA para feijão-caupi, BR2001, fosse substituída por três novas estirpes mais eficientes, a UFLA 03-84 (SEMIA 6461), a BR 3267 (SEMIA 6462) e a INPA 03-11B (SEMIA 6463). Mais recentemente, em 2006 a estirpe BR 3262 (SEMIA 6464) foi também inserida pela RELARE, compondo hoje quatro estirpes registradas para a inoculação de feijão-caupi. As estirpes originalmente chamadas de INPA 03-11B e UFLA 03-84 foram depositadas na coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia onde receberam a codificação institucional de BR 3301 e BR 3302, respectivamente. Portanto em pesquisas onde as estirpes são oriundas da coleção da Embrapa é comum o uso da codificação BR.

Assim como a evolução das pesquisas voltadas para FBN ajudou no desenvolvimento da lavoura do feijão-caupi, outro ponto relevante foi o melhoramento genético. O qual teve o início das pesquisas em meados de 1973 a 1991, época em que foi criado o Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, onde foi montada uma equipe de pesquisa para o feijão-caupi em rede nacional. Os trabalhos com o melhoramento da cultura atingiram sua máxima eficiência sob a responsabilidade da Embrapa Meio-Norte a partir de 1991 (FREIRE FILHO et al., 2009). Como resultado deste trabalho (1973 a 2010) Freire Filho et al. (2011), também citado por Alcantara (2011), destacam que primeiramente foram lançadas 36 cultivares, dentre estas, 30 foram para a região Nordeste. Segundo os autores, de 1991 até 2009 já foram lançadas 27 cultivares, destas quatro destinadas exclusivamente para a região Norte; treze exclusivas para região Nordeste; três recomendadas para as regiões Norte e Nordeste; seis para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste; e uma para a região Sudeste. Estes dados mostram que grande parte das cultivares está voltada para as regiões Norte e Nordeste.

O feijão-caupi está sendo plantado por agricultores com alto grau de investimento em tecnologia de produção no Cerrado, na safrinha e com o sistema de plantio direto. O feijão-caupi é cultivado nos meses de fevereiro, março, abril e maio logo após a saída do milho e da soja (ZILLI et al., 2011), substituindo lavouras que seriam de milho, algodão ou da própria soja de safrinha. Esta cultura também entra como a primeira na reforma de pastagens. A lavoura do feijão-caupi vem crescendo expressivamente no Centro-Oeste e mais precisamente no Mato Grosso, onde se tem plantado toda a sua segunda safra de feijão com o feijão-caupi, o que correspondeu na safra 2011/2012 a 152,1 mil ha plantados (CONAB, 2012). A lavoura é conduzida com diferentes patamares tecnológicos, quanto ao uso de adubos, pesticidas, maquinários, irrigação, cultivares e inoculantes, gerando diferentes níveis de produtividade, com variação de 200 kg ha<sup>-1</sup> até 2000 kg ha<sup>-1</sup> de grãos de feijão-caupi (SILVA JÚNIOR, 2012). Porém, a média de produtividade da região está em torno de 1000 kg ha<sup>-1</sup>, valor este superior a média nacional que é de 366 kg ha<sup>-1</sup> (DAMASCENO e SILVA, 2009).

A entrada do feijão-caupi no Centro-Oeste está ligada a necessidade de diversificação na produção, exigida pelo agronegócio. E este crescimento da produção agrícola no Centro-Oeste deve prosseguir com base na produtividade. De acordo com as projeções do MAPA (BRASIL, 2011) entre 2011 e 2021 a produção de grãos (arroz, feijão, soja, milho e trigo) deve aumentar em 23,0%, enquanto a área de plantio deverá expandir-se em apenas 9,5%. Então, assim como na soja na década de 60, esse poderá ser um marco para a expansão do feijão-caupi no Brasil. De acordo com Silva Júnior (2012) atualmente já ocupam 150 mil ha plantados com feijão-caupi Centro-Oeste, dos quais 90% estão em sistemas de alta tecnologia de produção e conseqüentemente ligados ao agronegócio.

O feijão-caupi já pode ser considerado uma cultura do agronegócio. Em 2011, os exportadores brasileiros conseguiram comercializar o feijão-caupi no mercado internacional a níveis de 50% a 65% acima da média dos 5 (cinco) anos anteriores (SEMENTES TOMAZETTI, 2012). Entre os motivos que levaram a exportação do produto está sua adoção por agricultores com maior uso de tecnologia na produção agrícola e já inseridos no mundo do agronegócio, como também o aumento do consumo de países como a Índia, que é o principal importador do feijão-caupi brasileiro. Além disso, a contínua redução de área de feijão nos países asiáticos produtores de feijão-caupi, que vem substituindo essa lavoura pelo milho e por fim os graves problemas climáticos, como o excesso de chuvas durante a safra, que a própria Índia e outros países asiáticos exportadores de feijão vêm enfrentando nos últimos anos (SEMENTES TOMAZETTI, 2012).

Apesar do potencial da cultura, o desempenho do feijão-caupi possui entraves tecnológicos; hoje não há registro junto ao MAPA de produtos específicos para cultura, além do inoculante, embora, no Centro-Oeste seja empregado na sua produção todo o aparato tecnológico usado para a soja. Ainda é pouco comum o uso de fertilizantes, entre os quais se destacam as fórmulas prontas 4-14-8 e 6-24-12 (N- K- P); embora trabalhos venham apontando os benefícios da adubação, como a fosfatada e a potássica (MELO et al., 2013). Por outro lado, é comum o emprego dos herbicidas de pré e pós emergência, defensivos agrícolas e os dessecantes no Centro-Oeste; apesar da escassez de trabalhos envolvendo a seletividade de herbicidas nesta cultura e falta de agrotóxicos registrados junto ao MAPA, dificultarem o uso de tais produtos (SILVA & ALBERTINO, 2009). A maioria das informações sobre a utilização de herbicidas está relacionada à cultura do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) ou da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (FREITAS et al, 2009). Quanto aos fungicidas destacam-se os produtos à base de carbendazim, carboxin, fludioxonil e thiram, os quais foram mostrados em estudo recente de Silva Neto et al. (2013) como compatíveis com a inoculação das estirpes BR 3262, BR 3267, INPA 03711B e UFLA 03784, aplicadas em veículo turfoso.

Segundo Freire Filho et al. (2011) na região Centro-Oeste há um excesso de produção de 38.271,7 toneladas. Muito em virtude da produtividade ( $1000 \text{ kg ha}^{-1}$ ) em comparação as regiões Norte e Nordeste ( $400 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e também do pouco consumo regional, ligado as preferências culturais. Assim, como nessa região a cada ano a produção aumenta, enquanto que nas regiões Norte e Nordeste há um déficit, o superávit poderá tanto ser exportado como comercializado nas outras regiões do Brasil.

### **2.1.3 Contribuição da FBN na cultura do feijão-caupi**

Até o momento nenhum estudo quantificou a taxa de N fixado nos cultivos de feijão-caupi no Cerrado e até mesmo em outras regiões com as estirpes recomendadas para a cultura. Os próprios trabalhos de seleção de estirpes não mensuraram a contribuição da FBN na cultura (MARTINS et al., 2003; LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; ZILLI et al., 2006), embora se apresente a estimativa de que a contribuição para a economia pela FBN na cultura é da ordem de US\$ 13 milhões, somente para a região Nordeste brasileira (RUMJANEK et al., 2005).

A quantificação da FBN em feijão-caupi é pouco conhecida e os poucos trabalhos já realizados apresentam valores bem variados, que estimam valores a campo na faixa de 40 a 90% do total de N acumulado pela cultura. Sugerindo que está variabilidade pode ser atribuída aos diferentes genótipos da planta e as diferentes espécies de rizóbios (RUMJANEK et al., 2005; XAVIER et al., 2006).

Para quantificar a contribuição da FBN, principalmente em culturas inoculadas, pode se utilizar quatro técnicas, que são comumente aplicadas aos estudos da fixação biológica do

N<sub>2</sub> atmosférico: a análise da seiva (HERRIDGE et al., 1982); a atividade da redução do acetileno (SCHOLLHORN & BURRIS, 1966); o aumento no conteúdo do N-total – método de Kjeldahl (LIAO, 1981); e as técnicas isotópicas, tais como abundância natural <sup>15</sup>N ou diluição isotópica <sup>15</sup>N/ marcação do solo com <sup>15</sup>N (BODDEY et al., 1987; 1990; BODDEY et al., 2000). A atividade de redução do acetileno (ARA) e as técnicas isotópicas são as mais usadas para mensurar a contribuição da FBN, apesar de a primeira apresentar limitações.

A utilização da redução do acetileno partiu da descoberta que o complexo enzimático que constitui a nitrogenase, que reduz o N<sub>2</sub> atmosférico à amônia (NH<sub>3</sub>), também era capaz de reduzir o acetileno a etileno (SCHOLLHORN & BURRIS, 1966), sem modificações durante o processo, e ainda que o etileno produzido não inibe a fixação do N<sub>2</sub> (HARDY et al., 1968; BURNS, 1969). Esta descoberta possibilitou o seu uso para indicar de forma indireta a contribuição da fixação biológica de nitrogênio. Porém, a atividade da redução de acetileno (ARA) ficou restrita a sistemas fechados e com raízes intactas (HARDY et al., 1968), o que é impossível nos ensaios a campo e até mesmo em vasos em casa de vegetação, onde as plantas noduladas são retiradas do solo e expostas ao acetileno. De acordo com Boddey et al. (2007), para estimar a contribuição da FBN usando o ARA em um sistema aberto seria necessária uma análise em fluxo contínuo, do contrário à técnica é quase inútil. Entretanto a técnica é útil como método semi-quantitativo, indicando a ocorrência da FBN e, desta forma, já foi utilizada para mostrar diferenças entre tratamentos por Hungria & Neves (1986) e mais recentemente Brito et al. (2009; 2011). Apesar de que, de acordo com Boddey et al. (2007) o ARA avalia a atividade da nitrogenase, apenas por alguns minutos, onde existe flutuação da atividade durante o dia e até mesmo ao longo do ciclo da planta.

A quantificação da FBN em sistemas naturais torna-se tarefa bem difícil em virtude das transformações que ocorrem com o nitrogênio no solo, porém, a partir de 1940, com a introdução de técnicas com o uso de <sup>15</sup>N em estudos de fixação biológica do N<sub>2</sub>, os trabalhos nesse tema evoluíram. Hoje, basicamente podem ser usados três métodos para se quantificar esse nitrogênio originado da FBN, o método de redução do <sup>15</sup>N, o método de marcação do solo com <sup>15</sup>N ou de diluição isotópica com <sup>15</sup>N e o método que faz uso das variações naturais de <sup>15</sup>N (TRIVELIN, 2001). Em sistemas simbióticos com leguminosas, a melhor forma de quantificar o nitrogênio de origem simbiótica é pela abundância natural do <sup>15</sup>N disponível do solo (BODDEY et al., 2000; 2001), pois pode ser utilizada para qualquer experimento e apresenta baixo custo comparada aos demais.

O uso do isótopo de nitrogênio, parte da premissa da distribuição dos isótopos estáveis <sup>14</sup>N e <sup>15</sup>N, onde o <sup>14</sup>N é mais abundante na atmosfera, com 99,6337%, enquanto o <sup>15</sup>N corresponde na atmosfera a 0,3663% (JUNK & SVEC, 1958). Desta forma, baseado que há um enriquecimento do solo com <sup>15</sup>N em comparação ao ar, convencionou-se que o delta ( $\delta$ )<sup>15</sup>N da atmosfera, usado como padrão nas análises, tem valor zero (0‰) (MARIOTTI, 1983). O uso da unidade delta ( $\delta$ ), correspondente ao excesso de <sup>15</sup>N em relação ao ar, que é o padrão, multiplicado por mil. Assim, com as análises isotópicas é possível determinar o nitrogênio proveniente do ar e do solo. Para fins de informação, 5 a 10‰ (deltas) são valores comuns para os solos brasileiros (ALVES et al., 2003), mensurado com plantas de referência. Exemplificando, uma planta fixadora que apresente 0‰ (deltas), corresponderá a uma fixação biológica de nitrogênio na planta de 100%. Enquanto que uma planta fixadora que apresente 5‰ deltas em solo que as plantas de referência tenham 10‰ (deltas), corresponderá aproximadamente a uma taxa de FBN de 50%, sem considerar o valor B.

O uso da técnica da abundância natural do isótopo <sup>15</sup>N depende da escolha de uma planta controle (referência), não fixadora de nitrogênio atmosférico e que ocorra na área experimental e tenha crescimento radicular similar a planta de estudo. Assim esta planta terá sua composição em <sup>15</sup>N semelhante à do N disponível do solo, enquanto que a planta fixadora

do N<sub>2</sub> da atmosfera apresentará teores menores de <sup>15</sup>N, devido ao efeito de diluição que esse N<sub>2</sub> causará, uma vez que o <sup>15</sup>N em excesso da atmosfera é próximo de zero (SHEARER e KOHL, 1986; BODDEY, 1987).

O primeiro trabalhou que quantificou a contribuição da FBN em feijão-caupi no Brasil foi de Boddey et al. (1990), com a cultivar Vita, que foi inoculada com a estirpe de *Bradyrhizobium* spp. BR 53. Foi estimada a contribuição da FBN pela técnica da diluição isotópica com <sup>15</sup>N marcado em duas localidades, e os autores observaram que no ensaio no Rio de Janeiro o N derivado da FBN na cultura chegava a apenas 36,7 %, na média de três plantas de referência (sorgo, soja não nodulante e arroz), enquanto no ensaio em Brasília foi obtida contribuição do N oriundo da FBN na planta de 73,5 %, com a média de duas plantas de referência (sorgo e arroz). Entretanto nesse trabalho também foi relatado que não havia diferença entre o N derivado da FBN nas plantas de feijão-caupi inoculadas com a estirpe de *Bradyrhizobium* spp. BR 53 e as não inoculadas.

Vários estudos apontam esta variabilidade da contribuição da FBN em feijão-caupi, e no Brasil um exemplo positivo desta variação foi encontrado por Castro et al. (2004), que o valor de N oriundo da FBN no feijão-caupi ultrapassou 90% e gerou um balanço de N positivo no sistema, devido à maior entrada de N derivado da FBN. Enquanto que Unkovich et al. (2010) mostraram na Austrália que o feijão-caupi obteve 2% do nitrogênio derivado da fixação biológica, com apenas 1 kg N fixado por hectare. Esta variabilidade é confirmada por Herridge et al. (2008), que encontraram na cultura do feijão-caupi valores desde 8 a 97% de nitrogênio oriundo da fixação biológica. Na África, esta variação está entre 15 - 89% do nitrogênio proveniente da FBN (média 52%) e na América do Sul essa variação é de 32 - 74% do nitrogênio proveniente da FBN (média 53%), com a média geral em todo o mundo de 54% do nitrogênio oriundo da FBN (PEOPLES et al., 2009).

Brito et al. (2009) avaliaram a contribuição da FBN em feijão-caupi comparando com feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) em experimento com vasos e usando a técnica da abundância natural do isótopo <sup>15</sup>N, onde observaram que a partir dos 31 dias o feijão-caupi já tinha atingido valor de FBN acima dos 70%. Ainda, foi verificado que na maturação fisiológica (78 DAS), o feijão-caupi obteve 93% do nitrogênio proveniente da fixação simbiótica, apontando o tempo maior para se atingir a máxima fixação biológica. Nesse ensaio os autores utilizaram a cultivar CNC x 284-4E e plantas de arroz e soja não nodulante como plantas de referência.

Em condições de campo no Brasil, porém em ambiente semi-árido Freitas et al. (2012) e usando a diluição isotópica com <sup>15</sup>N marcado, observaram que uma variedade de feijão-caupi obteve aos 80 dias 79% do nitrogênio oriundo da fixação biológica, correspondendo a entrada no sistema de 45 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio por via simbiótica.

Também no Brasil e em ambiente semi-árido, mas com a técnica da abundância natural do delta <sup>15</sup>N, Alcantara et al. (2014) constataram que todos os progenitores das cultivares de feijão-caupi avaliados foram responsivos à FBN, com os genótipos TVu 1190, CNC 0434, Alagoano e BRS Guariba, e alcançaram valores de cerca de 60% do N acumulado na parte aérea das plantas oriundo da FBN.

A quantificação da FBN em feijão-caupi é cada vez mais presente nos trabalhos com a cultura e pode ser ferramenta fundamental nas pesquisas. A quantificação é quase sempre baseada na abundância natural de  $\delta^{15}\text{N}$ , com destaque para os trabalhos de Belane & Dakora (2009), que avaliaram 30 genótipos de feijão-caupi em Ghana no ano de 2005; assim como Belane & Dakora (2010) que encontraram para plantas de feijão-caupi com 46 DAP variação de 63% a 87%. Também Belane & Dakora (2011) evidenciaram na avaliação de cultivares que existe correlação positiva entre o N fixado via simbiótica e o carbono fixado via fotossíntese. Nyembra e Dakora (2010), em estudo em zona agroecológica de Zambia, fizeram uso da abundância natural de  $\delta^{15}\text{N}$  e Pule-Meulenberg et al. (2010) avaliaram nove

genótipos de feijão-caupi em Ghana e encontraram valores de fixação biológica variando de 69% a 87%, para coleta aos 46 DAP. Os estudos mais recentes com feijão-caupi no continente africano também fizeram a quantificação da FBN com a abundância natural de  $\delta^{15}\text{N}$  (BELANE et al., 2011; 2014).

Normalmente, em solos pobres em nutrientes os valores de quantificação da FBN (%Ndfa) chegam aos 90% ou até mais na cultura da soja. Porém, deve-se ter em vista que em áreas com boa fertilidade e alto teor de matéria orgânica no solo e do próprio nitrogênio as plantas podem limitar a fixação biológica em uma preferência de obtenção de N via solo, já que o mesmo não é limitante no solo. Ainda assim não se pode comparar a soja com o feijão-caupi, já que a soja demanda quantidade de nitrogênio bem maior que o feijão-caupi, chegando a soja a exportar 200 kg N ha<sup>-1</sup> (ALVES et al., 2006). No ambiente de Cerrado atingem produtividade de soja de até 4.000 kg ha<sup>-1</sup>, exportando nos grãos entre 250 e 280 kg N ha<sup>-1</sup>, na maioria dos casos praticamente todo esse N derivado da FBN (ALVES et al., 2003). Comparativamente, hoje a produtividade média de feijão-caupi em sistema tecnificado no Cerrado é de 1000 kg ha<sup>-1</sup>, logo ao final do ciclo são exportados em torno de 40 kg N ha<sup>-1</sup> em forma de grãos, já que o teor de nitrogênio no grão de feijão-caupi é próximo de 4%. Assim a demanda da FBN em feijão-caupi para um balanço positivo é bem abaixo do necessário para a soja e, como mostrado por Freitas et al. (2012), já foi possível uma fixação de 45 kg N ha<sup>-1</sup>.

Desta forma, destaca-se o trabalho de Silva Júnior (2012), que avaliou a contribuição da FBN utilizando a técnica da abundância natural do  $^{15}\text{N}$ , em área de Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico, em Primavera do Leste-MT. O autor constatou que a média de nitrogênio acumulado nos grãos, consequentemente o valor que foi exportado do sistema na forma de grãos, foi de 32,7 kg ha<sup>-1</sup>; porém, com a inoculação foi colocado no sistema uma média de 17,2 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio pela via da fixação biológica do N atmosférico. A inoculação possibilitou a entrada de quase todo o N exportado, tendo a estirpe BR 3262 fixado 80% do N exportado. Assim, apesar de primariamente ter gerado um balanço negativo no sistema, a tendência é que a fixação biológica ultrapasse os 35 kg ha<sup>-1</sup> de N fixado, resultando em um balanço positivo. A avaliação feita de forma precoce, aos 35 dias após a emergência indicou o início do processo de fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão-caupi, a partir da nodulação da planta do feijão-caupi, que pode ser observada entre 15 e 20 dias após a emergência.

## **2.2 Variação da Resposta das Estirpes de *Bradyrhizobium* Recomendadas para Feijão-Caupi**

A inoculação do feijão-caupi é uma tecnologia recente no Brasil, e tem sua origem em trabalhos de seleção de estirpes nos últimos 15 anos, que já visavam ao registro no MAPA, embora esteja em processo de expansão. De acordo com o MAPA, na última instrução Normativa nº 13, de 25 de março de 2011, fazem parte da relação dos microrganismos autorizados para produção de inoculantes comerciais na cultura do feijão-caupi no Brasil quatro estirpes de *Bradyrhizobium* sp: UFLA 03-84= BR 3302 (SEMIA 6461); BR 3267 (SEMIA 6462); INPA 03-11B= BR 3301 (SEMIA 6463); e BR 3262 (SEMIA 6464). Sendo oriundas dos trabalhos de Martins et al., 2003 (BR 3267), Lacerda et al. (2004) e Soares et al. (2006) com (UFLA 03-84 e INPA 03-11B) e Zilli et al., 2009 (BR 3262) respectivamente. Estas estirpes substituíram a antiga estirpe recomendada, a BR 2001.

Os estudos prosseguem tanto no sentido de atestar a eficiência das estirpes em diferentes regiões e cultivares de feijão-caupi (ALMEIDA et al., 2010; CHAGAS JUNIOR et al., 2010; ALCANTARA et al., 2014; MARINHO et al., 2014), como também de selecionar

novas cepas, mais eficientes que as estirpes recomendadas (COSTA et al., 2011; FERREIRA et al., 2013).

Os trabalhos envolvendo o desempenho das estirpes recomendadas para feijão-caupi estão concentrados nas regiões Norte e Nordeste, como por exemplo, na região Nordeste (MARTINS et al., 2003; ZILLI et al., 2006; COSTA et al., 2011; MARINHO et al., 2014) e na região Norte (ZILLI et al., 2009; CHAGAS JUNIOR et al., 2010; GUALTER et al., 2011). Ainda pode-se destacar os trabalhos de Lacerda et al. (2004) e Soares et al. (2006) no estado de Minas Gerais. Porém, até hoje, não há um trabalho conjunto de avaliação da FBN em feijão-caupi em todo território nacional. No momento, a região Centro-Oeste é polo de interesse, por se tratar de uma nova área de produção e a falta de resultados da eficiência simbiótica com a inoculação das estirpes recomendadas (UFLA 03-84; BR 3267; INPA 03-11B e BR 3262).

No decorrer deste processo a estirpe BR 3299, isolada da Zona da Mata de Sergipe por Martins (1996), apesar de não estar registrada no MAPA é frequentemente utilizada nos estudos de eficiência em comparação com as estirpes recomendadas (ZILLI et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010; CHAGAS JUNIOR et al., 2010; GUALTER et al., 2011; MARINHO et al., 2014). Até pouco tempo a BR 3299 era considerada um *Bradyrhizobium* sp. Semelhante as quatro estirpes registradas, porém recente estudo de Radl et al. (2014) evidenciou que a estirpe pertence a uma nova espécie, *Microvirga vignae*. Portanto abre-se uma nova perspectiva de trabalho com essa estirpe, com técnicas e estratégias específicas, desde seu crescimento até seu uso como inoculante para feijão-caupi.

Dentre os primeiros resultados significativos da inoculação do feijão-caupi podem ser destacados a inoculação da cultivar IPA 206 com a estirpe BR 3267 (MARTINS et al., 2003), que proporcionou uma produtividade de 693 kg ha<sup>-1</sup>, similar ao tratamento com fertilizante nitrogenado, em experimento instalado em Petrolina, PE. Já as estirpes INPA03-11B e UFLA03-84 foram testadas nas cultivares BR14-Mulato, BR08-Caldeirão e Poços de Caldas, onde foram obtidas produções de grãos de 950 a 1.340 kg ha<sup>-1</sup>, equivalentes a adubação nitrogenada de 70 a 80 kg ha<sup>-1</sup> N-uréia (LACERDA et al., 2004), em experimentos realizados nos Municípios de Perdões e Iguatama no sul de Minas Gerais. A última estirpe recomendada, BR 3262 (ZILLI et al., 2009) foi testada na safra agrícola de Roraima, onde foram inoculadas sementes de feijão-caupi (cv BRS Mazagão), proporcionando rendimentos de grãos superiores a 2300 kg ha<sup>-1</sup> e em termos absolutos a houve um aumento da produtividade foi cerca de 34% em relação ao controle sem nitrogênio.

Os resultados levaram a inferir que na produção do feijão-caupi no Brasil a demanda de nitrogênio é suprida pela FBN. Assim mais trabalhos foram realizados para afirmar a eficiência da inoculação com as estirpes recomendadas em outras condições edafoclimáticas. Como por exemplo, Chagas Júnior et al. (2010) avaliaram as estirpes em Gurupi (TO) e observaram que a estirpe UFLA 03-84 (BR 3302) proporcionou os melhores resultados para três cultivares de feijão-caupi nos três experimentos, e estes foram semelhantes ao tratamento adubado com nitrogênio. Ao passo que em Soares et al. (2006) a estirpe INPA 03-11B (BR 3301) promoveu maior nodulação nas plantas; também como Costa et al. (2011), em Bom Jesus, Piauí, obtiveram maior nodulação por esta estirpe. Independente da estirpe, a produção com as sementes inoculadas foi superior à do controle sem inoculação.

Melo & Zilli (2009), avaliando a eficiência de estirpes para a região Norte, constataram que maiores rendimentos de grãos foram obtidos com o tratamento nitrogenado e com inóculo da estirpe BR 3262, com valores significativamente superiores aos do tratamento controle. Na região sudeste a estirpe BR 3267 foi testada com resultados favoráveis (SILVA JUNIOR et al., 2012), quando comparada ao tratamento controle sem nitrogênio e com nitrogênio, sem a comparação com as demais estirpes.

Em estudos recentes na região Nordeste, Alcantara et al. (2014) mostraram em Teresina-PI que quatro progenitores das cultivares de feijão-caupi avaliados responderam a FBN com a inoculação das estirpes recomendadas. Da mesma forma, Marinho et al. (2014) na mesma região observaram para quatro cultivares de feijão-caupi testadas na localidade de Bebedouro (Petrolina, PE) as menores produtividades no controle sem inoculação.

Exemplo de variação da resposta com a inoculação das estirpes recomendadas está no trabalho de Marinho et al. (2014), onde três de quatro cultivares estudadas obtiveram nodulação similar entre as plantas inoculadas com as estirpes recomendadas e as não inoculadas para a localidade de Mandacaru (Juazeiro-BA), enquanto que na localidade de Bebedouro (Petrolina, PE) três destas quatro cultivares mostram diferença na nodulação. Quando foi avaliada a produtividade na localidade de Mandacaru (Juazeiro-BA), em valores absolutos, a estirpe UFLA03-84 proporcionou o maior rendimento em duas variedades, a BR 3299 em uma e a BR 3267 em outra, enquanto que na localidade de Bebedouro (Petrolina, PE) a BR 3262 proporcionou o maior rendimento em duas variedades, a INPA03-11B em uma e a BR 3267 em outra. Resumidamente, uma estirpe pode mostrar melhores resultados que a outra quando muda à localidade ou a variedade, desta forma dificultando a recomendação específica de uma determinada estirpe para a inoculação no feijão-caupi.

Os resultados da produção do feijão-caupi com diferentes cultivares tem mostrado o benefício da inoculação independente da estirpe, apesar da planta ser conhecida como promíscua, ou seja, apresenta nodulação com diferentes bactérias do grupo rizóbio, incluindo bactérias nativas do solo. Este fato é associado a baixa eficiência simbiótica (NEVES & RUMJANEK, 1997), e aponta a necessidade de expansão da tecnologia de inoculação de sementes de feijão-caupi.

## **2.3 Fatores Específicos que Afetam Diretamente a Variabilidade da Eficiência Simbiótica**

### **2.3.1 Competição por fotoassimilados**

No estágio reprodutivo do feijão-caupi (R1 a R6) ocorre a translocação de nutrientes, entre eles o N, para as partes reprodutivas, sementes e vagens (dreno). Este processo comum de translocação de nutrientes para o dreno gera competição por fotoassimilados entre as bactérias dos nódulos e as vagens e sementes, reduzindo o suprimento de fotoassimilados para os nódulos, que conseqüente reduz a fixação biológica de nitrogênio (LAWN & BRUN, 1974).

Conforme Alcantara & Reis (2008) a FBN é dependente da formação de fotoassimilados e conseqüentemente a taxa de fixação é proporcional à taxa fotossintética do vegetal. Esta hipótese é destacada por Schulze (2004), que afirma que a taxa de fixação do N é regulada pelo fornecimento de assimilados aos nódulos ou pelo metabolismo de assimilados de compostos que podem ser usados pelos bacteróides. Assim a redução da FBN no estágio reprodutivo é conseqüência da diminuição da fotossíntese e a competição por carboidratos para os órgãos reprodutivos aumenta, diminuindo a FBN (PATE, 1996), o que também explicaria porque a taxa máxima da FBN em feijão-caupi ocorre próximo a floração (R2), pois esta é exatamente a fase em que ocorre maior taxa fotossintética.

A translocação dos fotoassimilados para a nutrição dos microrganismos contidos nos nódulos constitui, de acordo com Alcantara & Reis (2008), a fosforilação oxidativa, oriunda de produtos elaborados nas folhas pelo processo da fotossíntese (sacarose, glicose e ácidos orgânicos), que fornece energia e poder redutor para os bacteróides e células corticais e também esqueletos de carbono para o transporte do nitrogênio fixado. Segundo Alcantara & Reis (2008) a sacarose, produto da fotossíntese é a principal fonte de energia para os nódulos,

sendo metabolizados dicarboxilados (malato e succinato), enzimaticamente, no citoplasma vegetal. Para Reis et al. (2006) estes dicarboxilados suprirão a demanda energética dos bacteróides ativos na FBN.

Com o suprimento energético para os bacteróides, os mesmos manterão a FBN ativa, assim o N derivado da FBN, contido, por exemplo, no glutamato é usado para suprir outros tecidos das plantas, através da síntese de compostos aminados. Existe uma variação na molécula usada no transporte deste N, geralmente leguminosas de clima tropical exportam ureídos, enquanto que as de clima temperado exportam amidas (UDVARDI et al., 1990). Os produtos exportados apresentam diferentes custos energéticos, no caso de ureídos (alantoínas e ácidos alantóicos) são os carboidratos transportados e a relação C:N é de cerca de 1:1; enquanto que para amino-compostos (asparagina e glutamina) a relação é de 2:1 (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O metabolismo do carbono é fundamental para o sucesso da FBN, pois o carbono produzido nos órgãos fotossintéticos é necessário para fornecer a energia que será utilizada na fixação do nitrogênio, redução do nitrato e assimilação do nitrogênio em proteínas (NEVES, 1981). Assim estima-se que o custo de C para a FBN está entre 6 e 12 g de C g<sup>-1</sup>N fixado Pimentel (1998) e que os nódulos chegam a consumir de 13 a 28% dos fotossintatos totais de leguminosas (VANCE & HEICHEL, 1991).

O uso do C e do N concomitantemente como forma de aumentar a eficiência produtiva foi observado por Belane & Dakora (2010: 2011), onde genótipos de feijão-caupi com altas taxas fotossintéticas apresentaram maior biomassa da parte aérea e proporcionou maior N fixado por via simbiótica na parte aérea. Também em feijão-caupi Rodrigues et al. (2013), com plantas inoculadas observaram o aumento na atividade de invertase ácida solúvel, sendo que de acordo os autores esta resposta deve ter sido crucial na manutenção de um esqueleto de C inalterado, evitando assim alterações na FBN nos nódulos.

Diante da importância do metabolismo de carbono no fornecimento de energia para os bacteróides, Fischinger & Schulze et al. (2010) estudaram a importância da fixação de CO<sub>2</sub> no nódulo, avaliando a eficiência da fixação simbiótica de nitrogênio em ervilha no crescimento vegetativo e durante a formação de vagens, pois a fixação de CO<sub>2</sub> fornece malato para os bacteróides e oxalacetato para a assimilação do nitrogênio, assim uma baixa taxa fixação de CO<sub>2</sub> reduz a assimilação e transporte de N para a parte aérea. Os autores observaram que as plantas em formação de vagens apresentaram taxas de crescimento e fixação de N<sub>2</sub> mais elevadas, quando comparadas com as plantas em crescimento vegetativo e a atividade específica de nódulos ativos foi de cerca de 25% maior na formação de vagens, porém os autores observaram que cerca de um terço dos nódulos aos 42 DAE mostrava claros sinais de senescência. A fixação de CO<sub>2</sub> no nódulo aumentou na fase de formação de vagens, porém a concentração de malato em nódulos era apenas 40% do observado durante o período de crescimento vegetativo; mesmo assim os dados indicaram que o aumento na fixação de N<sub>2</sub> no período de formação de vagem está relacionado com o aumento da absorção de CO<sub>2</sub>.

De acordo com Prell & Poole (2006) o fornecimento de carbono e fontes de energia para bacteróides na forma de ácidos dicarboxílicos, especialmente malato e succinato é o modelo simples do metabolismo do bacteróide, chamado de modelo clássico. Os autores propõem um novo modelo e identificam como um ciclo em vez de um transporte (pois não há evidência de que os aminoácidos são levados para cima ou secretados). Neste modelo o aminoácido, como por exemplo o glutamato ou um derivado do mesmo, é fornecido pela planta ao bacteróide.

Entretanto essa ideia de redução da FBN em função da competição por fotoassimilados ou a limitação da simbiose por falta de carbono para fornecimento de energia para os bacteróides não é definida como uma linha exata, pois Kaschuk et al. (2012) mostrou que a soja adapta a sua taxa fotossintética para suportar o maior fornecimento de energia para

os bacteróides. A cultivar de soja “BRS 154” do estudo de Kaschuk et al. (2012) foi inoculada com duas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, as plantas noduladas pela CPAC 390 obtiveram taxa de fotossíntese maior do que as plantas noduladas pela CPAC 7. Este resultado evidencia que as plantas de soja podem aumentar a fotossíntese para compensar os custos com carbono para a fixação de nitrogênio e o fato é devido ao estímulo gerado pela simbiose (KASCHUK et al., 2009; 2010a,b; 2012). A nodulação funcionaria como dreno de fotoassimilados, o que estimaria a planta a aumentar sua taxa fotossintética para suportar o fornecimento de carbono.

### 2.3.2 Absorção/remobilização do nitrogênio de outras fontes

Na perspectiva de uma absorção/remobilização do nitrogênio, Schulze (2004) defende o conceito do “N- *feedback*”, inicialmente proposto por Hartwig (1998). Assim Schulze (2004) exclui a hipótese que a competição por fotoassimilados entre o dreno (vagens e sementes) e os nódulos seja a explicação para a redução das taxas de fixação de nitrogênio. Pois de acordo com o autor o N assimilado e o fixado exercem papel regulador na planta (*feedback*), inclusive durante o enchimento de grãos. Para sustentar esta hipótese o autor evidencia quatro pontos: a) redução das taxas de fixação de nitrogênio, seguida da remoção das vagens e acompanhada da acumulação de N na parte aérea e nos nódulos; b) os picos de fixação de nitrogênio ocorrem no momento de maior demanda (início do enchimento de vagens); c) subsequente declínio da atividade da nitrogenase, provavelmente relacionado com o N remobilizado das folhas senescentes; e d) as taxas de fixação de nitrogênio correspondem à extensão e a taxa de folhas senescentes e pode ser prolongada quando a senescência é atrasada.

Fischinger et al. (2006) mostraram que o N remobilizado de folhas inferiores, “N- *feedback*” está envolvido na redução da FBN durante o período reprodutivo (enchimento de grãos), fato que foi evidenciado em feijão-comum. Fischinger et al. (2006) observaram que a remobilização de N de folhas inferiores no período de crescimento vegetativo resultou na redução da taxa de N<sub>2</sub> fixado e quando as folhas inferiores foram removidas no crescimento reprodutivo, as taxas de fixação de N<sub>2</sub> aumentaram, assim concluíram que o N remobilizado de folhas inferiores durante a senescência foliar está envolvido na redução da fixação de N<sub>2</sub> durante o período de enchimento de grãos.

Apesar dos trabalhos de Schulze (2004) e Fischinger et al. (2006) serem amplamente citados pela proposta do mecanismo “N-*feedback*”, Almeida et al. (2000) evidenciaram que a remobilização do N de folhas inferiores exercia papel regulador, e de acordo com os autores este mecanismo poderia ser desencadeado pela deficiência de fósforo, o que foi relatado anteriormente por Sa & Israel (1991; 1998) e mais recente Sulieman et al. (2013).

Gil-Quintana et al. (2013a) trabalhando com *Medicago truncatula* em condições de estresse hídrico, observaram que o total de aminoácidos acumulados individualmente em todos os órgãos das plantas testadas aponta para uma regulação mais complexa do “N-*feedback*”, não sendo apenas um aminoácido, como por exemplo, a literatura aponta, com destaque para asparagina e aspartato. Gil-Quintana et al. (2013b) trabalhando com soja e também em condições de estresse hídrico, concluíram que a hipótese de uma regulação local na fixação de nitrogênio é válida na soja e que isto minimiza a importância dos ureídeos na inibição da FBN.

A absorção de N de outra fonte, mais a remobilização do N de folhas inferiores (FISCHINGER et al., 2006), também está relacionada com a redução da FBN na fase reprodutiva. Conforme Diaz-Leal et al. (2012), que avaliaram a presença de ureídeos como moléculas chave no transporte e armazenamento de nitrogênio, em *Phaseolus vulgaris* a concentração de ureídeos só mostra boa correlação entre a fixação no nitrogênio e a não

fixação até o aparecimento da floração, pois o valor de ureídeos encontrado nas plantas não inoculadas e adubadas com nitrato foi comparável com as plantas inoculadas, este fato está relacionado com a remobilização do N das folhas senescentes. Fato que também foi observado por Alamillo et al. (2010) em plantas de *P. vulgaris* sob estresse hídrico, onde as plantas cultivadas com nitrato acumularam ureídeos normalmente e a maior acumulação de ureídeos ocorreu depois da seca em plantas noduladas, o que inibiu a fixação de N<sub>2</sub>.

### 2.3.3 Senescência dos nódulos

A senescência dos nódulos é um processo comum entre as principais leguminosas de grãos, pode-se destacar a soja, feijão comum e o feijão-caupi, normalmente no estágio reprodutivo (LAWN & BRUN, 1974). De acordo com Alcantara et al. (2009) é um processo altamente organizado e dependente dos fatores relacionados à idade, mais a longevidade dos nódulos é também determinada por fatores ambientais e estressantes. Por exemplo, elevada disponibilidade de nitrato, altas temperaturas, solos ácidos, ação de patógenos nas raízes e seca induzem à ocorrência precoce da senescência (GROTEN et al., 2006). Segundo Alcantara et al. (2009) alguns autores sugerem que a senescência dos nódulos ocorre como uma reação da planta hospedeira contra o estabelecimento do rizóbio (PUPPO et al., 2005), ou coincide com a senescência das raízes (FISHER et al., 2002), ou com a senescência da planta (TIMMERS et al., 2000; VAN DE VELDE et al., 2006).

A senescência dos nódulos é um processo comum entre as principais leguminosas de grãos, pode-se destacar a soja, feijão comum e o feijão-caupi, normalmente no estágio reprodutivo (LAWN & BRUN, 1974). De acordo com Alcantara et al. (2009) é um processo altamente organizado e dependente dos fatores relacionados à idade, mais a longevidade dos nódulos é também determinada por fatores ambientais e estressantes. Por exemplo, elevada disponibilidade de nitrato, altas temperaturas, solos ácidos, ação de patógenos nas raízes e seca induzem à ocorrência precoce da senescência (GROTEN et al., 2006). Segundo Alcantara et al. (2009) alguns autores sugerem que a senescência dos nódulos ocorre como uma reação da planta hospedeira contra o estabelecimento do rizóbio (PUPPO et al., 2005), ou coincide com a senescência das raízes (FISHER et al., 2002), ou com a senescência da planta (TIMMERS et al., 2000; VAN DE VELDE et al., 2006).

A nodulação na soja, uma das leguminosas mais estudadas, intensifica até o florescimento, havendo manutenção na nodulação até a formação das vagens, quando inicia a senescência dos nódulos (HUNGRIA et al., 1994). Já o feijão comum e o feijão-caupi, apresentam prolongamento na nodulação após a formação das vagens, conforme observaram Vasconcelos et al. (1976) em feijão-de-corda, Hungria & Neves (1985) em feijão comum e, mais recente, para duas cultivares de feijão-caupi, Xavier et al. (2007), onde a nodulação aumentou durante o ciclo fenológico, com o maior número de nódulos aos 30 dias após a emergência- DAE (início do florescimento) e 50 DAE (formação das vagens). Estes dados confirmam o que já tinha sido observado por Neves et al. (1981), que a maior parte da atividade da nitrogenase está concentrada na fase de crescimento reprodutivo das plantas.

A redução da fixação biológica de nitrogênio ocorre em consonância com a senescência dos nódulos, que de acordo com Alessandrini et al. (2003a), compreende um período no qual a atividade da nitrogenase residual é perdida, ocasionando um rápido declínio na FBN. Os autores ainda observaram a expressão do gene da cisteína protease na senescência dos nódulos de soja, quando a fixação de N<sub>2</sub> começou a diminuir.

Segundo Puppo et al. (2005) a interação entre a planta e a bactéria é controlada pela planta e é altamente específica, sendo controlada geneticamente, em que a senescência é consequência da falta de regulação da troca de sinais e metabólitos da interação; porém são necessárias pesquisas sobre variedades com senescência tardia. É possível observar durante o

processo de senescência alterações visíveis nos nódulos, por exemplo, a cor dos tecidos durante a fixação é vermelha (devido à presença de funcional leghemoglobina), com a diminuição da leghemoglobina os nódulos perdem este aspecto, reduzindo a FBN. De acordo com Dupont et al. (2012) o conteúdo de leghemoglobina (Lb) diminui progressivamente com o início da senescência e esta diminuição da Lb impacta no metabolismo geral do nódulo, como também diminui a disponibilidade de O<sub>2</sub> para os bacteroides e libera ferro livre para a produção de espécies reativas de oxigênio. Porém em condições de estresse, Puppo et al. (2005) observou em ervilha o decréscimo da fixação de N antes da diminuição da leghemoglobina.

As reações oxidativas estão relacionadas diretamente a senescência dos nódulos, pois o declínio de antioxidantes celulares, como por exemplo, o ascorbato, que, de acordo com Grotenet al. (2006), deve ter um papel regulatório no desenvolvimento dos nódulos. O que comprova as conclusões de Puppo et al. (2005), de que mudanças nos níveis de antioxidantes, como glutathiona e ascorbato, afetam diretamente no número e na estabilidade dos nódulos. Isto também foi observado por Alessandrini et al., (2003b), que durante a senescência ocorre um estresse oxidativo com aumento de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos de lipídios.

Diante da hipótese que a senescência dos nódulos é um mecanismo em paralelo com a senescência foliar Van de Velde et al. (2006) mostraram que genes ligados ao processo de senescência de nódulos, envolvidos no catabolismo, transporte, estresse e defesa/respostas, operam também durante a senescência foliar. Ainda, os autores concluem que os hormônios etileno e ácido jasmônico parecem desempenhar um papel tanto na senescência foliar, quanto na nodular. De acordo com esses autores durante as duas situações de senescência, precede pela fase de iniciação da sinalização, fase de reorganização durante o qual os nutrientes catabólicos são reciclados e finalmente levando à degeneração do órgão.

Segundo Dupont et al. (2012) entre as modificações que ocorrem durante a senescência, o metabolismo de carbono desempenha um papel importante, pois a FBN é um processo altamente energético que exige uma fonte de energia constante. De acordo os autores, alterações no teor de sacarose nos nódulos foram observadas em diferentes condições de estresse, como por exemplo, no estresse hídrico e estresse salino (BEN SALAH et al., 2009; GORDON et al., 1997; DUPONT et al., 2012), que inibi a sacarose sintetase, que está envolvida na degradação da sacarose em glicose e frutose e também inibe o conteúdo de malato que é um dos substratos preferenciais para a respiração do bacteroide (PRELL e POOLE, 2006). Assim a diminuição da concentração de sacarose associada a uma escassez de fotoassimilados gera deficiência na produção de energia; em contraste, a acumulação de sacarose durante o estresse sugere que as enzimas glicolíticas dos nódulos são afetadas (DUPONT et al., 2012). Outro ponto importante levantado por Dupont et al. (2012) é a concentração de O<sub>2</sub> no nódulo, pois a oferta adequada de O<sub>2</sub> é determinante para a respiração nodular, enquanto que a baixa pressão de O<sub>2</sub> deve ser mantida para evitar a inibição da nitrogenase.

### **2.3.4 Atividade da nitrogenase**

A redução da atividade da nitrogenase (complexo nitrogenase) interfere diretamente na eficiência da FBN, porque ela é a enzima que catalisa o processo de redução do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) a NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (amônia). São conhecidos três tipos de nitrogenase: a que possui molibdênio (Mo) e ferro (Fe); a em que o vanádio (V) substitui o Mo; e por último a que só tem ferro, e algumas bactérias possuem os três tipos (PAU et al., 1989).

Brito et al. (2009) observaram, por exemplo, que no feijão-comum e no feijão-caupi o pico da nitrogenase foi próximo à floração (38 DAS) e, logo após, decaiu drasticamente,

principalmente depois dos 58 DAS, confirmando o observado por Xavier et al. (2007), onde o maior número de nódulos foi obtido aos 30 e 50 DAE, intervalo no qual Brito et al. (2009) encontrou o pico da nitrogenase (38 DAS). Brito et al. (2009) também identificaram que a porcentagem de N nas plantas de feijão-comum e feijão-caupi proveniente do solo decresceu no decorrer do ciclo da cultura, tendo a maior contribuição relativa dessa fonte na fase inicial (17 e 24 DAS) decrescendo de forma acentuada, a partir dos 31 DAS. Segundo os autores este fato foi consequência do acentuado aumento na FBN.

A redução da atividade da nitrogenase, em feijoeiro foi observada por Franco et al. (1979), que constataram que logo após a floração a atividade da enzima foi reduzida, o que por outro lado não foi observado na enzima nitrato redutase, que ao contrário teve sua atividade intensificada, principalmente durante a formação de vagens e enchimento de grãos.

No trabalho de Almeida et al. (2013), também em feijoeiro, a nitrogenase apresentou a maior atividade aos 34 DAE, antes da floração, enquanto que a nitrato redutase teve sua máxima atividade aos 20 DAE. Neste mesmo trabalho observou-se que após a taxa máxima a nitrogenase apresentou queda drástica, já a nitrato redutase apresentou queda até os 45 DAE, porém estabilizou aos 55DAE. Embora, o tratamento que recebeu N mineral e uma dose de MO manteve a atividade da nitrato redutase estável dos 34 ao 45 DAE, sendo que a partir dos 34 DAE foi registrado a queda da nitrogenase.

Já no trabalho de Pessoa et al. (2001), em feijoeiro e com aplicação de molibdênio, a nitrogenase apresentou valor máximo aos 55 DAE, nas fases de pleno florescimento do feijoeiro e início do enchimento de grãos, coincidindo com a mais alta atividade da nitrato redutase, entre os 40 e 55 DAE, com queda drástica após esse estágio. Os autores destacam que a queda da atividade da nitrogenase é recorrente a redução da translocação de carboidratos para o sistema radicular.

Outro fator relacionado com a redução da atividade da nitrogenase é a presença de  $\text{NH}_4^+$ , que de acordo com Reis & Teixeira (2005), na maioria dos diazotrofos, a adição de  $\text{NH}_4^+$  inibe a atividade da nitrogenase e somente após o esgotamento do amônio extracelular, ocorre à recuperação da atividade enzimática, porém os mecanismos relacionados com esse processo diferem entre os vários microrganismos fixadores de  $\text{N}_2$ . Outra forma de inibição da nitrogenase, segundo Reis & Teixeira (2005), são os aminoácidos, que podem inibir a enzima, já que são fontes de N, porém precisam ser assimilados e nem todos os aminoácidos são metabolizados da mesma forma pelas bactérias.

A atividade da nitrogenase sofre influência direta do fornecimento de fotoassimilados, conforme demonstram Tsikou et al. (2013), que avaliaram a atividade da nitrogenase em nódulos de *Lotus japonicus* em plantas em condições normais, após 24 horas de escuridão, após 72 horas de escuridão e uma avaliação depois de 48 horas após as plantas recuperarem as condições normais de luminosidade. Assim observaram que depois 24 horas de escuridão, a atividade da nitrogenase foi reduzida quase 7 vezes em comparação com as plantas mantidas em condições normais de fotoperíodo, enquanto que após 72 horas de escuridão a atividade da nitrogenase foi reduzida em 30 vezes em comparação as plantas em condições normais. Após recuperarem as plantas em condições normais de fotoperíodo, a atividade da nitrogenase foi parcialmente recuperada, chegando a quase 60% do seu nível original. Neste caso a limitação de luz reduziu a taxa fotossintética da planta que provavelmente limitou o fornecimento de fotoassimilados para os bacteroides, o que conseqüentemente afetou a nitrogenase.

A redução da atividade da nitrogenase pode ser uma consequência da falta de fornecimento de fotoassimilados da parte aérea para os nódulos e esta redução poderá ser o início para desencadear o processo de senescência dos nódulos. Outro fator que pode ser responsável pela redução da atividade da nitrogenase e conseqüente senescência dos nódulos é a remobilização do nitrogênio de outras fontes, principalmente das folhas senescentes, o que

é influenciado pela fisiologia de cada espécie vegetal. Fatores Indiretos que Limitam a Eficiência da FBN

## 2.4 Fatores Indiretos que Limitam a Eficiência da FBN

### 2.4.1 Fatores edafoclimáticos

Os fatores edafoclimáticos têm sido estudados como componentes que afetam na nodulação e conseqüentemente a eficiência da FBN, merecendo destaque a acidez do solo, salinidade, temperatura e o estresse hídrico (HUNGRIA e VARGAS, 2000).

Entre estes, a acidez do solo é a mais evidenciada pelo predomínio no território brasileiro de solos das classes de Latossolos e Argissolos, caracterizados por terem perfis profundos, com baixa fertilidade natural e geralmente ácidos. A simbiose entre as bactérias e leguminosas é negativamente influenciada por condições de baixo pH, onde a faixa de crescimento bacteriano ideal está entre 6,0 e 7,0 de pH (HUNGRIA e VARGAS, 2000). A tolerância a acidez do solo é uma característica estudada em bactérias, sendo variável entre as espécies e entre o grupo dos rizóbios poucos se desenvolvem bem com valores de pH abaixo de 5,0 (HUNGRIA e VARGAS, 2000), entre as exceções pode-se destacar o *Bradyrhizobium* sp.

Soares et al. (2014) mostraram que diversas estirpes de feijão-caupi cresceram de forma eficiente, em diferentes valores de pH, inclusive em pH 5,0 as estirpes excederam a concentração de  $10^9$  Ufc mL<sup>-1</sup>, fato que indica uma boa capacidade de resistir as condições ácidas. Sendo que entre estas estirpes, estavam as BR 3267, INPA03-11B e UFLA03-84, que são recomendadas para produção de inoculantes para feijão-caupi e foram usadas neste estudo.

Appunu & Dhar (2006) estudando estirpes de *Bradyrhizobium* da cultura de soja em solos ácidos caracterizaram as mesmas como tolerantes ao baixo pH, pois sobreviveram e cresceram em condições de pH 4,0, sendo observado que a inoculação nestas condições com estas estirpes proporcionou uma boa nodulação, acúmulo de matéria seca e aumento no conteúdo de nitrogênio da soja.

Atuando de forma combinada com a acidez do solo, a toxidez por alumínio é um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola, pois quando o pH do solo é  $\geq 5,5$  e na presença do Al<sup>3+</sup>, o mesmo solubiliza-se na solução do solo e torna-se potencialmente tóxico para as plantas. O aumento da concentração de Al<sup>3+</sup> na solução do solo é também prejudicial às estirpes de rizóbios, além de provocar danos nas raízes dificultando o processo de nodulação. Geralmente a exposição à acidez altera as características culturais, a síntese de exopolissacarídeos e os fatores nod (MORÓN et al., 2005), que são responsáveis pela síntese de proteínas denominadas nodulinas, que iniciam a simbiose com a leguminosa, que ocorre pelos efeitos indutores dos exsudatos da planta leguminosa específica (COOPER, 2004). Estes fatores nod são importantes no processo pré-infecção e iniciação dos primórdios nodulares, desta forma sua alteração afetaria a etapa de infecção, onde o rizóbio entra em contato com as raízes da planta e induz à formação do nódulo reprogramando o desenvolvimento da célula cortical.

Assim torna-se um fator relevante a tolerância das estirpes de rizóbio a presença de Al<sup>3+</sup>. Soares et al. (2014) observaram que na presença  $5 \text{ mmolc dm}^{-3}$  Al<sup>3+</sup> as estirpes de feijão-caupi atingiram a concentração  $10^9$  Ufc mL<sup>-1</sup>, já com  $10 \text{ mmolc dm}^{-3}$  estas cresceram, porém atingiram  $10^8$  Ufc mL<sup>-1</sup> e quando se passou para  $20 \text{ mmolc dm}^{-3}$  as estirpes se mostraram sensíveis, exceto a estirpe UFLA 03-84, que foi capaz de crescer mesmo em altas concentrações de Al<sup>3+</sup>, indicando capacidade de adaptação. .

A salinidade é um problema relevante tendo em conta que o feijão-caupi é cultivado em muitas áreas do semi-árido brasileiro, em que além das condições naturais, o manejo indevido do solo aumenta a salinidade destas áreas chegando a atingir 20% dos 95 milhões de hectares de terras cultivadas (MELO et al., 2006). Assim Medeiros et al. (2007) observaram que nas concentrações de 75 e 100 g L<sup>-1</sup> de NaCl não houve crescimento de nenhum dos isolados estudados. No estudo de Xavier et al. (2006) foi constatado que à medida que a concentração de NaCl aumentava reduziu a porcentagem de isolados tolerantes, sendo que cerca de 40% foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 1% de NaCl; na concentração de 2% de NaCl cresceram 17% do total de isolados; e na concentração de 3%, apenas 12% das estirpes testadas cresceram. Nesta mesma ótica Nóbrega et al. (2004) observaram que não houve crescimento das estirpes estudadas na concentração de 50 g L<sup>-1</sup> de NaCl, indicando que a tolerância a salinidade das estirpes estudadas seria entre 2 a 30 g L<sup>-1</sup> de NaCl.

A temperatura é outro fator comumente encontrado que interfere na eficiência da FBN, o valor considerado mais propício para a nodulação se encontra na faixa dos 25°C (HUNGRIA e VARGAS, 2000). Na região Centro-Oeste temperaturas do solo de até 35°C são observadas. Este fato afeta diretamente na eficiência da FBN, pois a maior atividade da nitrogenase é encontrada entre 19 e 30°C de acordo Pankhurst & Sprent (1976), valor este também usado como referência por Bizarro (2008).

Por outro lado, Xavier et al. (2006) observaram que rizóbios de feijão-caupi foram capazes de tolerar temperaturas de até 42°C, e dentre as 18 estirpes capazes de tolerar altas temperaturas, 13 delas foram provenientes da região do sertão, ou seja, ambiente com elevada temperatura, porém os autores não constataram esta tolerância com relação as características de origem (local/ solo onde a bactéria foi isolada) das estirpes. Também com estirpes de rizóbios de feijão-caupi, Pinheiro et al. (2013) encontraram que 96,4% dos isolados foram capazes de tolerar a temperatura de 39°C, apesar de que na medida em que a temperatura aumentava reduzia o número de isolados, e na temperatura de 45°C, entre as estirpes padrões, somente a BR 3267 e a BR 3302 cresceram. Corroborando com a ideia da tolerância a altas temperaturas pelas estirpes de rizóbios de feijão-caupi, Medeiros et al. (2007) mostraram que na temperatura de 30°C, o comportamento dos isolados foi similar ao observado na temperatura de 28°C e que nas temperaturas de 34 e 36°C não houve diferença em relação ao comportamento dos isolados.

Atuando em conjunto com o aumento de temperatura, o estresse hídrico afeta diretamente na nodulação, pois pode diminuir a emissão de pelos radiculares e até aumentar a taxa de abortamento dos nódulos (GOORMACHTIG et al., 2004). Apesar da cultura do feijão-caupi ser conhecida por sua baixa exigência hídrica e suportar elevadas temperaturas, quando estas estão fora das faixas propícias a produtividade da lavoura e as taxas de FBN são reduzidas, como mostrou Ferreira et al. (1994).

#### **2.4.2 Sobrevivência e a competitividade nodular**

A capacidade de sobrevivência das células bacterianas diante das condições adversas do meio externo é um fator essencial, pois somente tolerando estas condições poderá competir por sítios de nodulação contra bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, entretanto esta competição pode ser alterada pela diversidade estabelecida no sistema. A diversidade é influenciada pela população nativa, Soares et al. (2014) quando avaliaram a população nativa, observaram que ocorreu nodulação até a diluição do solo de 10<sup>-6</sup> e também constataram para a população nativa em estudo que esta nodulação proporcionou uma massa de parte aérea nas diluições 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-3</sup> similar ao controle com N-fertilizante. Assim os

autores indicam a presença de uma população nativa altamente eficiente e elevada densidade de rizóbio no solo.

No ensaio conduzido por Silva et al. (2008) no perímetro irrigado de São Gonçalo, município de Sousa - PB, os autores concluíram que a população rizobiana no solo proporcionou uma FBN efetiva, dispensando a necessidade de inoculação das sementes ou a adubação nitrogenada para a área do estudo.

A competição pela ocupação dos nódulos da planta hospedeira pode ser afetada, em diferentes estágios da nodulação, pela população presente no sistema; pois as estirpes inoculadas têm que competir na rizosfera, onde ainda são afetadas por alterações do meio externo, e só então ocorrem a ocupação dos sítios de infecção, para penetrar nas raízes e promover o desenvolvimento dos nódulos (SESSITSCH et al., 2002).

Em feijão-caupi a competição por sítios de nodulação é ainda mais acirrada, pois a planta é conhecida por sua promiscuidade em nodular, associando com diferentes espécies de rizóbio, sendo as mais conhecidas a *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN, 1982) e a *B. elkanii* (KUYKENDALL et al., 1992); além de outras já diagnosticadas como *Sinorhizobium fredii* (LAJUDIE et al., 1994), *S. xinjiangensis* (CHEN et al., 1988), *Rhizobium hainanense* (CHEN et al., 1997), *R. tropici* IIA (ZILLI, 2001) e mais recentemente a *Microvirga vignae* sp. (RADL et al., 2014).

Trabalhos anteriores voltados para a cultura da soja relatavam a espécie de *B. elkanii* como a espécie com maior capacidade de competir por sítios de nodulação (BODDEY & HUNGRIA, 1997; NEVES & RUMJANEK, 1997). Porém, em trabalho posterior com feijão-caupi Zilli et al. (2006) mostraram não haver diferença quanto à eficiência simbiótica e a ocupação nodular entre as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. E *Bradyrhizobium elkanii*, sendo que hoje para feijão-caupi as quatro estirpes recomendadas são definidas como *Bradyrhizobium* sp.

### 2.4.3 Densidade de UFC por semente na inoculação

Outro fator importante é a densidade de células aderidas às sementes, que é uma relação entre a concentração das bactérias no inoculante e a quantidade de sementes usadas. A recomendação pelo MAPA é que o inoculante tenha a concentração de  $1 \times 10^9$  UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônia- UFC) da estirpe utilizada e a presença de contaminantes não deve exceder  $10^5$  células mL<sup>-1</sup>. Para a cultura da soja, por outro lado, os resultados de pesquisas indicaram que essa densidade inicialmente seria de  $0,3 \times 10^6$  UFC semente<sup>-1</sup>, passou para  $0,6 \times 10^6$  UFC semente<sup>-1</sup> e é atualmente de  $1,2 \times 10^6$  UFC semente<sup>-1</sup>. O aumento da densidade de células rizobianas por semente tem sido uma estratégia usada inclusive para minimizar os danos da aplicação de fungicidas no tratamento de sementes de soja (CAMPO et al., 2010). No entanto para o feijão-caupi não há qualquer experimentação científica que apoie a recomendação técnica de qual a densidade de células ideal para a inoculação da cultura.

Thies et al. (1991) concluíram que a presença de população nativa de rizóbio do solo adequada para atender aos requisitos de fixação do N<sub>2</sub> da planta foi a principal razão das culturas não responderem a inoculação. Pule-Meulenberg et al. (2010) observaram em Ghana, em feijão-caupi não inoculado, que genótipos com 100 mg de nódulos secos possibilitaram rendimentos de grãos diferentes, com valores para um genótipo de 252 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto que o outro chegou a 686 kg ha<sup>-1</sup>. Já Belane & Dakora (2010) encontraram para plantas de feijão-caupi, também não inoculada e com 67 DAP, variação de 56,2% a 96,3% do nitrogênio oriundo da fixação biológica em função da cultivar. Esses resultados evidenciam que a população nativa de rizóbios do solo apresenta eficiência muito variável, justificando a necessidade da a densidade ideal para inoculação.

Para feijão-caupi, Silva et al. (2012) observaram que à medida que a taxa de inóculo foi elevada houve aumento da nodulação das plantas em condições de casa de vegetação. No entanto, os autores ressaltam que ainda não existem informações em condições de campo da recomendação técnica de qual a densidade de células ideal para a inoculação do feijão-caupi, apenas uma orientação de uso em torno de  $0,6 \times 10^6$  UFC semente<sup>-1</sup>, o que de acordo com os mesmos autores está abaixo da necessidade.

#### **2.4.4 Nitrogênio presente no solo**

A presença do nitrogênio (N) no solo é um componente que interage diretamente com a eficiência da FBN, valores altos de FBN são frequentemente relativos a áreas com baixo teor de N no solo. De acordo com Mendes et al. (2008) a abundância de N no solo leva esta fonte a ser absorvida preferencialmente comparada com o N oriundo do processo de fixação, apenas se inverte quando o N do solo se torna limitante.

O N se encontra disponível no solo em diversas formas, como amônio, nitrato, aminoácidos, peptídeos e formas complexas insolúveis. Porém, as plantas absorvem o N preferencialmente na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (WILLIAMS & MILLER, 2001). Sendo que em feijão-caupi, o N é geralmente oriundo da mineralização da matéria orgânica e da FBN; pois não é prática comum à aplicação de fertilizantes nitrogenados para a cultura.

O N pode ser absorvido do solo e translocado direto para as partes reprodutivas (BOLLARD, 1960), apesar de preferencialmente ser remobilizado dos tecidos vegetativos para as sementes e vagens (IMSANDE & SCHMDT, 1998), assim não havendo necessidade de uma FBN efetiva, com gasto de energia para a planta.

Os trabalhos de eficiência agrônômica mostram que a utilização de adubo nitrogenado reduz a nodulação e conseqüentemente a FBN, porem alguns autores já apontaram a necessidade de uma dose de N para arranque no desenvolvimento da cultura do feijão-caupi. Porém Brito et al. (2009; 2011) observaram não ser necessária a dose inicial para o feijão-caupi, pois quando bem nodulado essa cultura é eficiente quanto a FBN, podendo dispensar outras fontes de N e ainda atingir alta produtividade (RUMJANEK et al., 2005).

A adição de adubo nitrogenado tem sido apontada como forma de fornecimento de N no início do crescimento da planta, quando a simbiose ainda não está em plena atividade. Mas, Brito et al. (2011) mostraram que o feijão-caupi inoculado (BR2001) dispensa o uso da adubação nitrogenado, inclusive a aplicação inicial na semeadura, e o aumento da dose de nitrogênio aplicada levou a redução na FBN.

Sampaio & Brasil (2009) mostram que o N e o nutriente mais extraído do solo pelo feijão-caupi, em média a cultura chega a extrair  $103 \text{ kg ha}^{-1}$  do nutriente, destes  $52 \text{ kg ha}^{-1}$  são exportados para fora do sistema, evidenciando a importância da FBN como forma de entrada de nitrogênio no sistema. Nas áreas de feijão-caupi no Cerrado praticamente não há aplicação de adubos nitrogenados de forma direta e a aplicação de fertilizantes nitrogenados para a lavoura apresenta baixa eficiência, como mostram estudos em que o feijão-caupi absorveu mais N do solo e da fixação simbiótica do que de fertilizantes como ureia e sulfato de amônio (ALFAIA, 1997; BRITO et al., 2009; 2011).

#### **2.4.5 Nutrição mineral da planta**

Apesar da planta de feijão-caupi ser conhecida pela sua rusticidade e tolerância, teores inadequados de nutrientes no solo levam a queda da produtividade, assim como a redução da FBN. Um dos nutrientes mais requeridos pela planta é o N, sabe-se que na falta de N no solo e

de bactérias fixadoras de nitrogênio a cultura necessita de  $100 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$  para o seu desenvolvimento completo (FREIRE FILHO et al., 2005).

Entretanto com a eficiência da FBN, a cultura inoculada dispensa a aplicação de adubo nitrogenado, mas para os nutrientes exigidos no processo de fixação biológica, como cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), fósforo (P) e molibdênio (MO), devem estar em níveis adequados no solo.

Seja por plantas que usam a FBN ou não, o P atua no aumento no número de pelos radiculares e consequentemente aumento de sítios de infecção para a bactéria, aumentando a nodulação; além do efeito do P na nodulação pela transferência de energia na forma de ATP (OKELEYE & OKELANA, 1997). Assim, este nutriente em baixa quantidade no solo afeta diretamente na redução da eficiência da associação simbiótica (FREIRE FILHO et al., 2005).

O fósforo (P) é fator muito importante no ciclo das leguminosas (ARAUJO et al., 2000; 2012), onde estudos tem mostrado que a deficiência de fósforo (P) nos nódulos pode afetar os bacteroides reduzindo as taxas de FBN (SA & ISRAEL, 1991; 1998). Estudos mais recentes de Sulieman et al. (2013) concluíram que a deficiência de P é um dos fatores limitantes críticos, afetando negativamente a nodulação e a fixação de  $\text{N}_2$  em leguminosas. Quanto a relação entre fosforo e a produção, Oliveira et al. (2011) obtiveram maior produtividade do feijão-caupi em função da dose de fosforo ( $120 \text{ kg de P}_2\text{O}_5$ ) alcançando o valor de  $1.343 \text{ kg ha}^{-1}$ , sendo a dose de máxima eficiência econômica a de  $89 \text{ kg de P}_2\text{O}_5$ , com produção de  $1.306 \text{ kg ha}^{-1}$  de feijão-caupi, já que com a redução de 25% na aplicação de fósforo a perda de produção foi de apenas  $36 \text{ kg ha}^{-1}$ .

Assim como o P, o Ca está ligado ao desenvolvimento radicular e a sua deficiência diminui os pontos de crescimento da raiz, paralisando e ocorrendo o escurecimento e posterior morte da raiz. O Ca deve estar presente no sistema em maior quantidade preferencialmente no início da nodulação, pois uma vez formados os nódulos a leguminosa pode crescer com concentrações relativamente baixas desse nutriente (MALAVOLTA, 1997).

Nas bactérias fixadoras de nitrogênio, onde a enzima nitrogenase responsável pelo poder de fixação biológica de nitrogênio, o Mo é elemento-chave do centro ativo desta enzima (MENGEL e KIRKBY, 2001). Assim como o Mo atua na nitrogenase, este elemento também atua na enzima nitrato redutase, que é responsável pela redução do  $\text{NO}_3^-$  para que posteriormente possa ser assimilado pela planta (DECHEN et al., 1991). Assim mesmo sendo exigido em baixas quantidades o Mo é elemento regulador de nitrogênio na planta. Leite et al. (2009) encontraram que a dose estimada de  $63 \text{ g ha}^{-1}$  de Mo proporcionou a máxima produtividade de grãos ( $799 \text{ kg ha}^{-1}$ ), assim a inoculação associada com a aplicação de Mo favoreceu o aumento da produção de grãos em feijão-caupi. Esse resultado, provavelmente, é proveniente da maior atividade da nitrogenase e do consequente aumento no fornecimento de N para planta.

O K apresenta atuação indireta, pois sua função principal está ligada à fotossíntese, assim a sua deficiência afetaria o fornecimento de fotossintatos da planta para a bactéria, no processo de simbiose, limitando a nodulação e a simbiose de fato (DUKE e COLLINS, 1985). Quanto a produção, Oliveira et al. (2009) avaliaram o efeito da adubação potássica sobre o rendimento produtivo e econômico do feijão-caupi, cultivar Pitiuba, e encontraram que a dose de máxima eficiência econômica para a produtividade de grãos secos foi a de  $141 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$ , com produção de  $1,87 \text{ t ha}^{-1}$ .

O Mg é um elemento de muita interação, sendo considerado um ativador de enzimas e é cofator de quase todas as enzimas fosforilativas; sua ação se dá diretamente na conversão de energia, assim atua em uma das principais funções dos cloroplastos (MALAVOLTA, 1997). Em excesso, o Mg pode causar a deficiência de K ou, principalmente, de Ca, assim sua regulação no solo é importante pois este interage com outros nutrientes.

## 2.5 Prática Agrícola da Inoculação

A indústria de inoculantes trabalha em grande parte voltada para cultura da soja com 95% da produção, com grande ênfase para a região Centro-Oeste, pelo grande mercado de produtores dessa região. Os inoculantes comercializados são os turfosos e os líquidos; porém, nos últimos anos a produção dos inoculantes turfosos tem diminuído por questões ambientais relacionadas a extração deste material em áreas de solos orgânicos, muitas vezes com danos severos a aquíferos, pois no Brasil, por exemplo, são turfeiras baixas formadas no período Quaternário, originando em várzeas em cursos baixos de rios e em baixadas paralelas a linha da costa, assim o próprio processo de extração em profundidade comprometem os aquíferos que abastecem os cursos dos rios. Desta forma, a produção de inoculantes líquidos tem aumentado. De acordo com dados do ANPII (2011) os inoculantes líquidos, a partir de 2003, passaram a ser mais utilizados que os inoculantes turfosos, pois são considerados mais adequados a aplicação em grandes plantios por facilitar a semeadura mecanizada (LUPWAYI et al., 2005), mesmo assim os inoculantes turfosos ainda ocupam uma grande parte do mercado.

Em função da extensão da soja no Brasil e a grande ênfase de pesquisas para essa cultura é de se esperar que a maior parte das bactérias encontradas nos solos da região Centro-Oeste seja oriunda dos próprios inoculantes ou bactérias nativas com maior especificidade para nodular a soja, levando a um enriquecimento da população de *Bradyrhizobium* nos solos. Porém, como a soja é uma cultura exótica no Brasil, inicialmente os solos brasileiros não continham bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, capazes de formar simbiose efetiva com a lavoura (HUNGRIA et al., 1994). Hoje, praticamente em todas as áreas de cultivo de soja as populações naturalizadas são elevadas e quase não se encontram áreas que não tenham sido inoculadas, e mesmo nessas é constatada a presença dessas populações, devido à dispersão de estirpes de áreas produtoras de soja para áreas virgens (HUNGRIA et al., 1994).

A prática da inoculação hoje recomendada prescreve a inoculação com no máximo 24 horas antes do plantio, e aponta que a partir deste período a população rizobiana começa a cair de forma acelerada. Porém, alguns trabalhos recentes indicam outras formas de inoculação além da tradicional no plantio.

Como estratégia alternativa de inoculação na cultura da soja, tanto Vieira Neto et al. (2008) quanto Zilli et al. (2010a) avaliaram a viabilidade da aplicação do inoculante no sulco de semeadura. Em ambos os estudos, os resultados foram favoráveis, porém quando se faz esta prática na presença de fungicidas ou em solo de primeiro ano de cultivo os resultados mostraram-se abaixo dos obtidos na inoculação tradicional, via sementes e no plantio.

Diferente da estratégia anterior (inoculação no sulco), Zilli et al. (2008) avaliaram os benefícios da inoculação de *Bradyrhizobium* na cultura da soja pela pulverização em cobertura e em outra prática a inoculação de pré-semeadura por Zilli et al. (2010b). Entretanto em ambos os trabalhos a inoculação tradicional, via sementes no plantio, mostrou-se mais a viável, que as estratégias de inoculação por pulverização e pré-semeadura.

A prática agrícola da inoculação tem se mostrado vantajosa, porém a população elevada de *Bradyrhizobium* nos solos brasileiros é um dos motivos que dificulta a introdução de novas estirpes para a produção de inoculantes. Para a cultura da soja, que demanda a maior parte dos inoculantes, quatro estirpes são recomendadas para a cultura, quais sejam: SEMIA 587; 29 w (SEMIA 5019); CPAC 15 (SEMIA 5079) e CPAC 7 (SEMIA 5080), e ainda assim o programa de seleção de novas estirpes mais eficientes para a cultura da soja continua.

A estabilização da população de *Bradyrhizobium* nos solos brasileiros, principalmente no Centro-Oeste é uma questão a ser considerada na introdução das quatro estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para feijão-caupi: UFLA03-84= BR 3301 (SEMIA 6461); BR 3267 (SEMIA 6462); INPA03-11B= BR 3302 (SEMIA 6463) e BR 3262 (SEMIA 6464).

Zilli et al. (2011), em casa de vegetação, observaram que as estirpes recomendadas para a soja nodularam o feijão-caupi e apresentaram resultados similares as estirpes recomendadas para feijão-caupi quanto ao número e massa de nódulos; enquanto que a estirpe SEMIA 587 apresentou eficiência de FBN na cultura do feijão-caupi semelhante a observada para a INPA 03-11B e a BR 3267.

Entre as estirpes de feijão-caupi recomendadas, até o momento, a indústria optou por priorizar a comercialização de apenas duas, a BR 3267 e a BR 3262. O que também se observa na soja, com o predomínio das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019. Porém a competitividade na nodulação entre estirpes de soja com alta densidade no solo e com população já estabelecida (MENDES et al., 2004), versus as estirpes agora introduzidas com a cultura do feijão-caupi inoculado nas mesmas áreas, cria novas perspectivas de pesquisas e desenvolvimento de tecnologias.

### **3 CAPÍTULO I**

## **CARACTERIZAÇÃO DA NODULAÇÃO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES RECOMENDADAS PARA FEIJÃO-CAUPI**

### 3.1 RESUMO

A nodulação do feijão-caupi é uma investigação que necessita sempre de um novo trabalho muito em função da característica promiscua da planta, nodulando com diferentes grupos de rizóbios, assim estudos de caracterização da diferença de eficiência das estirpes de feijão-caupi selecionadas para a inoculação é uma forma de obter melhores respostas com a simbiose. Desta forma o objetivo deste estudo foi caracterizar a nodulação do feijão-caupi inoculado com rizóbio em substrato e em solo, assim como avaliar a eficiência simbiótica da nodulação das estirpes de rizóbios em feijão-caupi em função do ciclo fenológico em solos da região Centro-Oeste. Foram conduzidos quatro experimentos com as estirpes BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B (BR 3301), UFLA 03-84 (BR 3302) e a BR 3299: um em vasos de Leonard, um em vasos de 5 kg com substrato (areia e perlita), outro também em vasos contendo 5 kg de amostra de solo Planossolo Háplico e o quarto em vasos de 5 kg de amostra de Latossolo Vermelho Amarelo, coletados de área no Centro-Oeste (Sinop-MT) cultivada com soja a 10 (dez) anos. Em vasos de Leonard as estirpes individuais assim como o consórcio ou a mistura entre elas não diferiram quanto à nodulação. Nos ensaios no solo (Planossolo Háplico) e no substrato (areia e perlita), as avaliações aos 35 e 50 DAE quanto a massa seca da parte aérea não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. No ensaio realizado no material de solo do Centro-Oeste, não foi encontrada resposta para a massa da parte aérea, tendo as plantas inoculadas praticamente o mesmo desenvolvimento das plantas noduladas com as estirpes nativas, já estabelecidas no solo. O período de 20 a 40 DAE foi a fase em que se concentra a maior atividade da nitrogenase, tendo as estirpes BR 3267 e INPA 03-11B (BR 3301) apresentado alta atividade da nitrogenase em valores absolutos, enquanto que a estirpe BR 3262 já apresentou atividade da nitrogenase aos 20 DAE. Os resultados com a quantificação da FBN (%Ndfa) mostraram como melhor época para a análise entre 40 e 50 DAE. Onde na avaliação do nitrogênio derivado da FBN, a BR 3262 apresentou os maiores valores nos três períodos (30, 40 e 50 DAE).

**Palavras-chave:** Nitrogenase. Nodulação. Estirpes.

### 3.2 ABSTRACT

The nodulation of cowpea is an investigation that always needs new work largely due to the promiscuous characteristic of the plant, nodulating with different groups of rhizobia, so studies to characterization of the difference of the efficiency of cowpea strains selected for inoculation is a way to get better answers to the symbiosis. This form the objective of this study was to characterize the nodulation of cowpea inoculated with rhizobia in substratum and soil, as well as to evaluate the symbiotic efficiency of nodulation of strains of rhizobia in cowpea for the phenological cycle in soil of the Midwest. Four experiments with BR 3267 strains were conducted; BR 3262; INPA 03-11B (BR 3301); UFLA 03-84 (BR 3302) and BR 3299: A Leonard jars in a 5 kg pots with substrate (sand and perlite), another well in 5 kg vessels Fragiudult soil fourth vessels in 5 kg a Oxisol red yellow an area of the Midwest (Sinop-MT) planted with soybeans to ten (10) years. In Leonard jars individual strains as well as the consortium or the mixture between them did not differ in nodulation. In tests on soil (Fragiudult soil) and the substrate (sand and perlite), evaluations with 35 and 50 DAE as the dry weight of shoots showed no statistical difference between treatments. When tested with the soil of the Midwest, the shoot mass did not answer, and the plants inoculated almost the same development of plants nodulated with native strains, established in the soil. The period 20-40 DAE is the phase that focuses the highest nitrogenase activity, and the BR 3267 and INPA 03-11B strains (BR 3301) presented high nitrogenase activity in absolute terms, while the strain BR 3262 20 DAE already has an activity of nitrogenase. The results of the quantification of FBN (% Ndfa) showed that the best time to carry them out is between 40 and 50 DAE, and the evaluation of nitrogen derived from BNF, the BR 3262 presented the highest values in the three periods (30, 40 and 50 DAE).

**Key words:** Nitrogenase. Nodulation. Strains.

### 3.3 INTRODUÇÃO

O efeito positivo da inoculação é visível através da nodulação e conseqüentemente uma simbiose eficiente; porém o feijão-caupi é conhecido como uma planta promíscua, ou seja, capaz de nodular com diferentes espécies de rizóbios no solo, o que faz com que o processo de nodulação seja uma variável sensível em função do solo onde a cultura é plantada. Já em casa de vegetação, em condições estéreis, a nodulação com as estirpes recomendadas para a cultura tende a apresentar valores similares massa de nódulos, como foi observado por Zilli et al. (2006) e Melo & Zilli (2009), para as estirpes BR 3267 e BR 3262.

Para avaliar a nodulação é comum o uso de indicadores como eficiência, eficácia e efetividade no processo inicial da seleção de estirpes de rizóbios quanto ao desempenho (LIMA et al. 2012). Entretanto os indicadores mais usados são eficiência e eficácia, que inicialmente foram propostos e diferenciados no trabalho de Guzmán & Döbereiner (1968). A eficácia foi proposta para a avaliação da simbiose como um todo, enquanto o termo eficiência seria reservado para indicar a quantidade de nitrogênio fixado por unidade de tecido nodular. Esses indicadores foram amplamente utilizados e divulgados com o trabalho de Döbereiner et al. (1970). A eficiência é a relação do acúmulo de N na parte aérea das plantas inoculadas com as estirpes teste pelo acúmulo de N parte aérea das plantas que recebem N-mineral. Enquanto que a eficácia é a relação do acúmulo de N na parte aérea das plantas inoculadas com as estirpes teste pelo acúmulo de N parte aérea das plantas que sem inoculação e sem adição de N-mineral. Já a efetividade é a relação do acúmulo de N na parte aérea das plantas inoculadas com as estirpes teste pelo acúmulo de N parte aérea das plantas inoculadas com a estirpe referência para a cultura (estirpe já recomendada).

Os estudos de nodulação em casa de vegetação, com substrato estéril devem ser entendidos como uma etapa, pois os mesmos podem não refletir inteiramente as condições de solo, como Döbereiner et al. (1970) já tinham descrito, pois regressões lineares observadas em experimentos em substrato podem não se repetir em condições de solo, pois neste há maior disponibilidade de nitrogênio. Desta forma a caracterização da nodulação deve ser feita tanto em substrato quanto em solo, para estudos de identificação da diferença de eficiência das estirpes de feijão-caupi inoculadas, pois preferencialmente em feijão-caupi a fixação simbiótica forneceu a maior parte do N acumulado nas plantas de feijão-caupi, seguida, em ordem decrescente, pelo solo e fertilizante nitrogenado (BRITO et al., 2009; 2011).

A caracterização da nodulação em condição controlada, em que é controlada a entrada e a saída de nitrogênio, pode ser usada para calcular a eficiência das estirpes, admitindo que todo nitrogênio da planta inoculada seja oriundo da FBN.

A nodulação é uma interação entre planta e bactérias, porém é mais influenciada pela planta, desta forma a caracterização da nodulação é função do desenvolvimento da planta. O feijão-caupi tem seu ciclo fenológico dividido em duas fases, a vegetativa e a reprodutiva (CAMPOS et al., 2000). De acordo com Campos et al. (2000) a fase vegetativa compreende os estádios: V0 – Semeadura; V1 – os cotilédones emergidos na superfície do solo; V2 – as folhas unifolioladas completamente abertas; V3 – a primeira folha trifoliolada; V4 - a segunda folha trifoliolada; V5 - a terceira folha trifoliolada; V6 – os primórdios do ramo secundário surgem nas axilas das folhas unifolioladas; V7 – a primeira folha do ramo secundário; V8 – a segunda folha do ramo secundário; V9 – a terceira folha do ramo secundário. Enquanto que na fase reprodutiva concentra os estádios: R1 – os primórdios do primeiro botão floral no ramo principal; R2 – antese da primeira flor; R3 – início da maturidade da primeira vagem; R4 – maturidade de 50% das vagens da planta; e R5 – maturidade de 90% das vagens da planta.

A capacidade do feijão-caupi em nodular com diferentes espécies do solo, faz com que as estirpes recomendadas devam ser avaliadas em condições de solo para determinar sua capacidade de competir contra as estirpes nativas. Porém neste ambiente são necessários outros métodos para avaliar a simbiose, como a atividade da nitrogenase (redução de acetileno) e a quantificação da FBN (abundância natural delta  $^{15}\text{N}$ ). A avaliação da eficiência simbiótica em solo é uma tarefa complexa, pois neste ambiente não há um sistema fechado de entrada e saída de nitrogênio. No entanto a caracterização da eficiência em ambiente competitivo como o solo possibilitará resultados mais próximos aos esperados nas áreas de produção.

Assim este capítulo objetiva caracterizar a nodulação do feijão-caupi inoculado com rizóbio em substrato e em amostras de solo, assim como avaliar a eficiência simbiótica da nodulação das estirpes de rizóbios em feijão-caupi, em função do ciclo fenológico em condições de solo da região Centro-Oeste, município de Sinop-MT e da região Sudeste, município de Seropédica-RJ.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Nodulação das estirpes de feijão-caupi em vasos de Leonard

O experimento foi conduzido na Embrapa Agrobiologia em condições de casa de vegetação (Figura 1). Foram utilizados vasos de Leonard (VINCENT, 1970) contendo areia e vermiculita (2:1 v/v) esterilizadas em autoclave. Antes do plantio, as sementes da cultivar de feijão-caupi IPA 206 foram desinfestadas pela imersão em etanol 70% por dois minutos, peróxido de hidrogênio 10% por cinco minutos e lavadas 10 vezes com água destilada esterilizada. Foram semeadas três sementes por vaso e após a emergência foi realizado o desbaste. Semanalmente cada vaso recebeu 250 mL da solução nutritiva de Norris (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994).



**Figura 1.** Experimento em vasos de Leonard com feijão-caupi (30 DAE) na casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia.

Foram utilizadas as estirpes recomendadas pelo MAPA para a cultura (BR 3267; BR 3262; INPA03-11B/BR 3301 e UFLA03-84/BR 3302), mais a BR 3299, que está em processo de recomendação. As estirpes utilizadas em todo o estudo foram oriundas da coleção de cultura da Embrapa Agrobiologia, desta forma ao longo do trabalho são identificadas pelo código BR.

As estirpes foram crescidas em meio de cultura 79 YMA líquido (VINCENT, 1970) sob agitação orbital constante de 150 rpm pelo tempo apropriado para o crescimento de cada uma. No plantio foram inoculados: 1 mL da suspensão bacteriana, para os tratamentos onde foi inoculada apenas uma estirpe de rizóbio; 0,5 mL da suspensão bacteriana de cada uma das

estirpes, nos tratamentos em consórcio de estirpes duas a duas; e 0,2 mL de cada estirpe, no tratamento avaliando a mistura das cinco estirpes. .

O experimento foi montado em blocos casualizados com três repetições utilizando os tratamentos: o consórcio das cinco estirpes associadas duas a duas (dez associações), além das cinco estirpes individualmente e um tratamento com o conjunto das cinco estirpes (mistura), mais os dois tratamentos controle sem inoculação, com e sem fornecimento de N mineral.

As variáveis foram todas avaliadas aos 35 dias após a emergência, sendo estas: o número de nódulos ( $n^{\circ}$  nódulos planta<sup>-1</sup>), massa de nódulos secos (mg planta<sup>-1</sup>), massa de matéria da parte aérea seca (mg planta<sup>-1</sup>), após secagem em estufa de circulação forçada a 65°C até massa constante, teor de nitrogênio na parte aérea- TNPA pelo método Kjeldhal (LIAO, 1981), acúmulo de nitrogênio na parte aérea - ANPA (mg planta<sup>-1</sup>), eficiência relativa da parte aérea - EfRPA (%), eficiência relativa do nódulo - EfRN (%) e razão nodular - RN (mg nódulo/ mg nitrogênio).

Sendo que:

$$\text{ANPA} = \text{MPAS} \times \text{TNPA} / 100$$

$$\text{EfRPA} (\%) = [(\text{MPAS}_{\text{tratamento inoculado}} / \text{MPAS}_{\text{tratamento positivo}}) \times 100]$$

$$\text{EfRN} (\%) = [(\text{ANPA}_{\text{tratamento inoculado}} - \text{ANPA}_{\text{tratamento negativo}}) / \text{MSN}] \times 100$$

$$\text{RN} = 1 / [(\text{ANPA}_{\text{tratamento inoculado}} - \text{ANPA}_{\text{tratamento negativo}}) / \text{MSN}] \text{ ou } 1 / \text{EfRN}$$

A EfRPA (%) está relacionada ao crescimento da planta e é uma variável bastante comum em trabalhos de seleção de estirpes. A EfRN(%) é uma forma de estimar a eficiência da simbiose, analisando o acúmulo de nitrogênio em função da massa de nódulos. A RN é usada para quantificar a quantidade de nódulos (expressa em mg) necessária para acumular a quantia de 1 mg de nitrogênio na planta. O valor ideal para a RN seria igual a 1, ou seja, cada mg de nódulos resulta em 1 mg de nitrogênio acumulado na planta; conseqüentemente teria um valor de EfRN igual a 100%.

Os dados foram analisados através do programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008), com a análise de variância pelo teste F, a 5% de probabilidade e comparação das médias através do método de Scott- Knott ao nível de probabilidade de 0,05.

### **3.4.2 Caracterização da nodulação das estirpes de feijão-caupi em amostras de Planossolo Háplico e em substrato (Areia e perlita)**

Foram realizados dois experimentos em vasos de 5 kg, um com amostras de solo não estéril e o outro em substrato de areia e perlita (2:1 v/v) autoclavada (Figura 2). Antes do plantio, as sementes da cultivar de feijão-caupi BRS guariba foram desinfestadas pela imersão em etanol 70% por dois minutos, peróxido de hidrogênio 10% por cinco minutos e lavadas 10 vezes com água destilada esterilizada. Foram semeadas três sementes por vaso e após a emergência foi realizado o desbaste.

Para o ensaio em vasos, o substrato areia e perlita (2:1 v/v) foi autoclavado e após a germinação semanalmente cada vaso recebeu 250 mL da solução nutritiva de Norris (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994). Cada vaso recebeu volume de 300 mL de água em média por dia para manter umidade adequada ao crescimento das plantas.

A amostra de solo foi coletada na área experimental da Embrapa Agrobiologia, em horizonte superficial na profundidade de 0-20 cm em um Planossolo Háplico. A fertilidade do solo foi analisada conforme Claessen (1997) e os seguintes valores foram encontrados: pH, 4,8; alumínio trocável, 0,31 cmolc dm<sup>-3</sup>; Ca, 0,54 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg, 0,25 cmolc dm<sup>-3</sup>; matéria orgânica, 5,2 g dm<sup>-3</sup>; K, 32 mg dm<sup>-3</sup>; P, 4,26 mg dm<sup>-3</sup>; e N, 0,70 g dm<sup>-3</sup>.

Para ajuste da fertilidade do solo foram utilizadas  $2,21 \text{ t ha}^{-1}$  de calcário dolomítico com PRNT de 80% para a correção da acidez; além de  $333 \text{ kg ha}^{-1}$  de superfosfato simples (18%  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e  $67 \text{ kg ha}^{-1}$  de cloreto de potássio (60%  $\text{K}_2\text{O}$ ).



**Figura 2.** Experimento com feijão-caupi (25 DAE) em vaso ao campo aberto na Embrapa Agrobiologia em amostras de Planossolo Háplico e em substrato (areia e perlita).

Ambos os experimentos foram compostos por fatorial de 7 (fonte de N) x 2 (tempo de coleta), com quatro repetições em delineamento de blocos ao acaso. Os tratamentos foram compostos pela fonte de N: inoculado com a estirpe BR 3267; inoculado com a estirpe BR 3262; inoculado com a estirpe INPA 03-11B (BR 3301); inoculado com a estirpe UFLA 03-84 (BR 3302); inoculado com a estirpe BR 3299; inoculado com a mistura de estirpes; e um controle sem inoculação. O fatorial do tempo de coleta foi composto por duas coletas, com 35 e 50 dias após a emergência (DAE).

As variáveis analisadas foram: número de nódulos ( $\text{nódulos planta}^{-1}$ ), massa seca dos nódulos ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) e massa seca da parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ ). A massa seca dos nódulos e a massa seca da parte aérea foram analisadas após secagem em estufa de circulação forçada à  $65^\circ\text{C}$  até atingir a massa constante.

Os dados foram analisados através do programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008), com a análise de variância pelo teste F, a 5% de probabilidade e comparação das médias através do método de Scott- Knott ao nível de probabilidade de 0,05.

### **3.4.3 Eficiência simbiótica das estirpes de feijão-caupi em função do ciclo fenológico em amostras de Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico do Centro-Oeste**

Primeiramente foi coletada amostra de solo na camada de 0-20 cm de profundidade na área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril ( $11^\circ 51' 29'' \text{ S}$  e  $55^\circ 36' 1,6'' \text{ W}$ ), em Sinop (MT), região Centro-Oeste. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico (SANTOS et al., 2006), a área possui elevação de 368m e foi cultivada com soja

nos últimos dez (10) anos. A fertilidade do solo foi analisada conforme Claessen (1997) e os seguintes valores foram encontrados: pH, 5,1; alumínio trocável, 0,13 cmolc dm<sup>-3</sup>; Ca, 1,19 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg, 0,28 cmolc dm<sup>-3</sup>; matéria orgânica, 24,5g dm<sup>-3</sup>; K, 94 mg dm<sup>-3</sup>; P, 13,61 mg dm<sup>-3</sup>; e N, 1,5 g dm<sup>-3</sup>.

Foi avaliada a população de rizóbios no solo, pela técnica do número mais provável (NMP), com a infecção em plantas de feijão-caupi (BRS guariba). As plantas foram cultivadas em vasos de Leonard com substrato de areia: vermiculita (2:1) esterilizado em autoclave. Semanalmente cada vaso recebeu 250 mL da solução nutritiva de Norris (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994) e as plantas foram coletadas aos 35 DAE. O inóculo foi preparado a partir da diluição seriada do solo, de acordo com metodologia de Andrade & Hamakawa (1994). Para a estimativa do número de células bacterianas capaz de nodular o feijão-caupi utilizou-se a tabela de número mais provável (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994) para a obtenção do fator NMP.

O experimento foi montado em vasos de 5 kg em casa de vegetação não estéril (Figura 3), e composto por fatorial de 7 (fonte de N) x 6 (tempo de coleta), com três repetições em delineamento de blocos ao acaso. Os tratamentos foram compostos pela fonte de N: inoculado com a estirpe BR 3267; inoculado com a estirpe BR 3262; inoculado com a estirpe INPA 03-11B (BR 3301); inoculado com a estirpe UFLA 03-84 (BR 3302); inoculado com a estirpe BR 3299; inoculado com as cinco estirpes (mistura); e um controle sem inoculação. O fatorial do tempo de coleta foi composto por seis épocas de coleta, com: 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a emergência (DAE), correspondendo respectivamente aos estádios V3, V6, R1, R2, R3 e R4 (CAMPOS et al., 2000).



**Figura 3.** Experimento com feijão-caupi (50 DAE) em amostra de Latossolo Vermelho-Amarelo na casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia.

Neste experimento e com o mesmo solo também foi montado em vaso de 5 kg um controle com planta não fixadora, o feijão não nodulante - NORH 54 (*Phaseolus vulgaris*), com três repetições e seis coletas, para quantificar a FBN pela técnica da abundância natural

do  $^{15}\text{N}$  no solo. Foram coletadas como referência plantas da gramínea pé-de-galinha (*Eleusine indica*), que se desenvolveram nos vasos de forma espontânea. Cada vaso foi irrigado com volume de cerca de 300 mL de água em média por dia.

As variáveis analisadas foram: número de nódulos (nod. planta<sup>-1</sup>), massa seca dos nódulos (mg planta<sup>-1</sup>), massa seca da raiz (mg planta<sup>-1</sup>), massa seca da parte aérea (mg planta<sup>-1</sup>), % N na parte aérea, N acumulado na parte aérea (g planta<sup>-1</sup>), atividade da nitrogenase (ARA) e abundância natural de delta  $^{15}\text{N}$ . A massa seca dos nódulos e a massa seca da parte aérea foram avaliadas após secagem em estufa de circulação forçada a 65°C até massa constante. O teor de nitrogênio total na parte aérea foi determinado pelo método Kjeldhal (LIAO, 1981).

A atividade da enzima nitrogenase foi medida indiretamente nas raízes pelo método da atividade de redução do acetileno (ARA) (HARDY et al., 1968). Para isso as raízes foram coletadas com o mínimo de impacto possível, retirado o excesso de solo aderido e foram colocadas em frascos de vidros de 250 mL e, em seguida, fechadas hermeticamente. Foram retirados previamente 10% da atmosfera do vidro e injetado 10% de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (acetileno). Após 15 minutos, foram retiradas três amostras com seringas plásticas de 1 mL e, em seguida, desse volume foram injetados 0,5 cm<sup>3</sup> no cromatógrafo a gás modelo Perkin-Elmer L Auto System e Integrator PE Nelson Modelo 1022, com Detector de Ionização de Chama (FID – Flame Ionization Detector) e coluna cromatográfica Poropak N, conforme metodologia descrita em Saito (1980). O padrão foi preparado a partir de 500 mg L<sup>-1</sup> de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> para determinação do controle, com vidros sem raízes e injeção de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.

Para a quantificação da FBN as plantas foram secas a 65°C em estufa de circulação forçada até massa constante, moídas e analisadas quanto à abundância natural do isótopo  $^{15}\text{N}$  (OKITO et al., 2004) por espectrômetro de massa de razão isotópica, modelo Delta Plus (Finnigan MAT, Bremen, Germany) no “Laboratório John M. Day de Isótopos Estáveis” da Embrapa Agrobiologia.

A composição do isótopo  $^{15}\text{N}$  foi mensurada através da diferença do número de átomos de  $^{15}\text{N}$  para  $^{14}\text{N}$ , usando a atmosfera como padrão de acordo com métodos de Junk e Svec (1958) e Mariotti et al. (1981):

$$\delta^{15}\text{N} (\%) = \frac{[^{15}\text{N}/^{14}\text{N}]_{\text{amostra}} - [^{15}\text{N}/^{14}\text{N}]_{\text{padrão}}}{[^{15}\text{N}/^{14}\text{N}]_{\text{padrão}}} \times 1000$$

Para o cálculo da estimativa da FBN por meio da abundância natural utiliza-se a seguinte expressão %Ndfa de Shearer e Kohl (1986):

$$\% \text{Ndfa} = 100 \frac{((\delta^{15}\text{N ref}) - (\delta^{15}\text{N planta fixadora}))}{(\delta^{15}\text{N ref} - B_{\text{pa}})}$$

**$^{15}\text{Nref}$**  – Valor de  $\delta^{15}\text{N}$  do solo obtido de plantas não fixadoras (referência), sendo utilizada como planta de referência o feijão não nodulante NORH 54 (*Phaseolus vulgaris*).

**$\delta^{15}\text{N planta fixadora}$**  – Valor de  $\delta^{15}\text{N}$  da planta fixadora de N<sub>2</sub> (feijão-caupi);

**$B_{\text{pa}}$**  – Valor do  $\delta^{15}\text{N}$  do nitrogênio derivado da FBN, sendo o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  da parte aérea da leguminosa crescida totalmente dependente da FBN.

Para este trabalho foi usado o valor  $B_{\text{pa}}$  de  $\delta^{15}\text{N}$  para a parte aérea de feijão-caupi presente na literatura de -1,66‰ (BODDEY et al., 2000).

Também foi estimada a quantidade de nitrogênio na parte aérea oriunda da FBN, de acordo com Shearer e Kohl (1986) e Maskey et al. (2001):

**N derivado FBN na parte aérea (mg planta<sup>-1</sup>) = (%Ndfa / 100) x N acumulado massa seca parte aérea).**

Os dados foram analisados através do programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008), com a análise de variância pelo teste F, a 5% de probabilidade, análise de regressão e comparação das médias através dos testes de Tukey e Scott Knott, ambos ao nível de probabilidade de 0,05.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 Caracterização da nodulação das estirpes de feijão-caupi em vasos de Leonard

Em casa de vegetação as estirpes individuais assim como o consórcio ou a mistura entre elas não diferiram quanto ao número e massa de nódulos (Tabela 1). Desta forma os dados indicam que em condições controladas (casa de vegetação) as estirpes apresentam competitividade nodular similar, conseqüentemente tendem a proporcionar valores próximos. Também em casa de vegetação outros estudos (ZILLI et al., 2006; MELO & ZILLI, 2009) constataram por exemplo, que a inoculação com as estirpes BR 3267 e BR 3262 proporcionaram uma massa de nódulos similar.

**Tabela 1.** Avaliação do número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa da seca da parte aérea (MSPA) e teor de nitrogênio da parte aérea de feijão-caupi (IPA 206), em condições de casa de vegetação.

BR 3267	BR 3262	BR 3299	INPA 03-11B (BR 3301)	UFLA 03-84 (BR 3302)	Mistura	C/N	S/N	Nº nod planta <sup>-1</sup>	Nod secos (mg planta <sup>-1</sup> )	Parte aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )
x								91A	338A	1,89B
x		x						83A	301A	2,37A
x			x					59A	281A	1,91B
x				x				74A	335A	1,92B
x	x							71A	301A	1,82B
		x						61A	278A	1,26D
		x	x					87A	314A	1,60C
		x		x				55A	261A	1,62C
	x	x						44A	243A	1,44C
			x					50A	317A	1,64C
			x	x				72A	301A	2,34A
	x		x					63A	237A	2,55A
				x				46A	249A	1,86B
	x			x				63A	309A	2,69A
	x							91A	349A	2,27A
						x		0	0	1,18D
							x	0	0	0,77D
					x			78A	327A	2,28A
<b>CV%</b>								23,34*	14,59*	18,01

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott, a 5% de significância. C/N= Com nitrogênio; S/N= Sem nitrogênio. \*Dados transformados com raiz quadrada (Y + 1).

Quanto à massa da parte aérea a BR 3262 foi à única estirpe individual que proporcionou biomassa similar aos tratamentos com o consórcio entre BR 3262 e UFLA 03-84 (BR 3302); BR 3262 e INPA 03-11B (BR 3301); INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302); BR 3267 e BR 3299 e a mistura de estirpes, que diferiram dos demais

tratamentos. E individualmente as estirpes INPA 03-11B (BR 3301), UFLA 03-84 (BR 3302), BR 3267 e BR 3299 proporcionaram massa da parte aérea inferior. Entretanto as estirpes INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302) são compatíveis entre si e com a BR 3262 na formação do consórcio, assim como a BR 3299 é compatível com a BR 3267 no consórcio.

Estes resultados mostram que o consórcio tem atuação semelhante à estirpe BR 3262 e melhor que as demais estirpes individuais nas condições estudadas. Assim, em um primeiro momento verifica que o consórcio é viável. Segundo Rumjanek et al. (2005), não só a densidade de células no inoculante é responsável por promover nodulação satisfatória, mas outros eventos como a interferência dos fatores ambientais e do solo e a capacidade de sobrevivência da estirpe, sem contar na competição das estirpes nativas (SANTOS et al., 2005). Contudo o consórcio poderá aumentar tanto a sobrevivência, quanto a competição no solo, isso devido às estirpes selecionadas apresentarem características diferentes, o que as permite utilizar mecanismos de sobrevivência e competição distintos, tendo assim maiores chances de sucesso em campo com relação à estirpe individual.

Avaliando o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Tabela 2), a inoculação com o consórcio entre as estirpes BR 3262 e UFLA 03-84 (BR 3302) e a INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302) foram superiores aos demais consórcios e as estirpes individuais. Quando as sementes foram inoculadas com a mistura de estirpes o acúmulo de nitrogênio foi superior as estirpes individuais BR 3267, BR 3299 e INPA 03-11B (BR 3301), e foi similar as estirpes BR 3262 e UFLA 03-84 (BR 3302).

Ao avaliar o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Tabela 2), o consórcio entre as estirpes BR 3262 e UFLA 03-84 (BR 3302) e INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302) foram superiores aos demais consórcios e as estirpes individuais. Contudo na eficiência relativa da parte aérea, variável extremamente importante, as estirpes individuais apresentaram baixa eficiência; embora quando estão juntas no tratamento da mistura elevam a eficiência ao patamar de 193% e se igualam estatisticamente aos melhores tratamentos. Junto com a mistura de estirpes os tratamentos inoculados com o consórcio entre a INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302) ou consorciadas com a BR 3262, mais a BR 3267 e BR 3299 e a BR 3262 individualmente foram melhores que os demais tratamentos quanto à eficiência relativa da parte aérea (Tabela 2). Mais uma vez a BR 3262 é a única estirpe individual que se iguala aos consórcios/mistura e mesmo assim percebe-se que quando consorciada com as estirpes INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302) aumenta sua eficiência para mais de 100%. O mesmo acontece com as estirpes INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302), que quando inoculadas em consórcio aumentam a eficiência, assim como as estirpes BR 3267 e BR 3299. A BR 3299 inoculada individualmente tem eficiência de 118% e quando consorciada com a BR 3267, o valor passa para 200%.

A eficiência relativa dos nódulos aparentemente é baixa, e em todos os tratamentos o valor foi abaixo de 35%; e o consórcio entre as estirpes UFLA 03-84 (BR 3302) e BR 3262 apresentou o valor mais próximo de 34% (Tabela 2). A inoculação com as estirpes individuais apresentou eficiência abaixo dos consórcios, exceto a inoculação com a UFLA 03-84 (BR 3302), com valor de 27%. Estes valores abaixo de 35% não indicam que as estirpes sejam ineficientes, mas sim, que neste experimento não foi possível obter para cada 1 mg de nódulo 1mg de nitrogênio na planta, como mostra a razão nodular. Para essa variável a mistura de estirpes, os consórcios entre a BR 3267 e BR 3299, BR 3267 e INPA 03-11B/BR 3301, BR 3262 e BR 3299, BR 3262 e INPA 03-11B/BR 3301, BR 3262 e UFLA 03-84/BR 3302 e INPA 03-11B/BR 3301 e UFLA 03-84/BR 3302, foram superiores aos demais tratamentos, juntamente com as estirpes individuais BR 3262 e a UFLA 03-84/BR 3302 (Tabela 2). Observa-se através da razão nodular que a estirpe mais comercializada para inoculação em feijão-caupi (BR 3267) precisaria de 6,7 mg de nódulos para gerar 1 mg de N na planta, a estirpe em teste (BR 3299) de 8,5 mg de nódulos para gerar 1 mg de N na planta, enquanto

que para a mistura de estirpes são apenas 4,9 mg, valor este que estatisticamente difere entre os tratamentos que proporcionaram a melhor razão nodular (Tabela 2).

**Tabela 2.** Avaliação do acúmulo de nitrogênio da parte aérea (ANPA), eficiência relativa na parte aérea (EfR PA), eficiência relativa dos nódulos (EfR N) e razão nodular (RN) de feijão-caupi (IPA 206), em condições de casa de vegetação.

BR 3267	BR 3262	BR 3299	INPA 03-11B (BR 3301)	UFLA 03-84 (BR 3302)	Mistura	C/N	S/N	ANPA (mg planta <sup>-1</sup> )	EfR PA (%)	EfR N (%)	RN (mg nod/ mg N)
x								62C	160B	15B	6,7B
x	x							86B	200A	25A	4,0A
x			x					71B	162B	21B	4,8A
x				x				72B	162B	18B	5,5B
x	x							62C	154B	17B	5,9B
		x						40C	118B	12B	8,5B
		x	x					59C	136B	15B	6,5B
		x		x				60C	137B	19B	5,3B
	x	x						54C	138B	31A	4,7A
			x					61C	139B	16B	6,7B
			x	x				95A	198A	28A	3,7A
	x		x					77B	216A	28A	3,6A
				x				76B	157B	27A	3,8A
	x			x				117A	227A	34A	2,9A
	x							82B	192A	22B	4,8A
						x		41C	100C	-	-
							x	11D	65C	-	-
					x			81B	193A	21B	4,9A
<b>CV%</b>								8,78*	16,80	13,94*	9,84*

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott, a 5% de significância. C/N= Com nitrogênio; S/N= Sem nitrogênio. \*Dados transformados com raiz quadrada (Y + 1).

Melo & Zilli (2009) avaliaram a eficiência nodular em casa de vegetação, mas não subtraíram o N acumulado nas plantas inoculadas pelo N acumulado do controle sem inoculação, como feito neste trabalho. Desta forma os autores encontram valor de eficiência nodular próximo a 1 (um) com diferentes variedades inoculadas com as estirpes BR 3267 e BR 3262. Com esta mesma fórmula Alcantara et al. (2014) avaliaram a eficiência nodular em campo e encontraram valores abaixo de 1 (um) para progenitores de cultivares de feijão-caupi.

Em ambos os estudos acima a eficiência nodular equivale à razão nodular como obtida nesse estudo, porém a eficiência nodular, que é um dos parâmetros de avaliação da normativa de validação de inoculante, é calculada a partir da divisão de mg de N da massa seca de planta por mg de nódulos secos (BRASIL, 2011; MELO & ZILLI, 2009; ALCANTARA et al., 2014). Nesse estudo adotou-se para esta relação à designação de razão e diferentemente da literatura foi usada a relação invertida, com mg nódulos por mg de N. Assim a eficiência nodular foi redefinida como eficiência relativa dos nódulos. Por fim, nesse estudo é proposto que valores de razão nodular abaixo de um (1) indicariam a entrada de nitrogênio de outra

fonte que não a FBN, portanto não se aplicaria a variável eficiência relativa dos nódulos - EfRN, que consequentemente seria maior que 100%.

O termo eficiência foi proposto inicialmente para indicar a quantidade de nitrogênio fixado por unidade de tecido nodular, porém ensaios em substrato proporcionam resultados diferentes dos realizados em solos, devido a disponibilidade de nitrogênio presente no solo (DÖBEREINER et al., 1970). Assim as duas variáveis (eficiência relativa dos nódulos - EfR N e razão nodular- RN) usadas nesse estudo são adequadas a experimentos de casa de vegetação, pois neste ambiente controlado as raízes não podem buscar outra fonte de N, como acontece em experimentos de campo, o que pode levar a resultados equivocados, atribuindo todo o nitrogênio e a massa da planta como resultante da inoculação, e de fato aos nódulos. Pois no campo as raízes podem obter nitrogênio de outra fonte como, por exemplo, o solo, como também da própria semente.

Normalmente cada semente de feijão-caupi tem massa de 200 mg, com teor de 4% de N, assim tem-se na semente 8 mg de N. Como esse teor é transferido para a planta, se observa que mesmo em casa de vegetação existe outra fonte de N que não a FBN. O que justifica a necessidade de subtrair o valor do nitrogênio total das plantas inoculadas pelo N das plantas não inoculadas, que nesse experimento foi de 11 mg de N.

Os dois novos parâmetros (eficiência relativa dos nódulos- EfR N e razão nodular- RN), usados para interpretar os dados podem ser adequados em experimentos de casa de vegetação, pois indicam a capacidade dos nódulos em proporcionar o acúmulo de nitrogênio na planta.

### **3.5.2 Caracterização da nodulação das estirpes de feijão-caupi em amostras de Planossolo Háplico e em substrato (Areia e perlita)**

Entre as estirpes inoculadas nas plantas cultivadas no solo, a BR 3267 apresentou o maior número de nódulos e a maior massa seca de nódulos aos 35 DAE, sendo a única estirpe com nodulação superior à da população nativa (Tabela 3). Na avaliação das plantas aos 50 DAE cultivadas no solo, não houve diferença quanto ao número e massa seca de nódulos (Tabela 3).

Nas plantas cultivadas em substrato não houve diferença quanto ao número de nódulos aos 35 DAE, mas em valores absolutos a inoculação com as estirpes UFLA 03-84 (BR 3302), BR 3262, BR 3267 e a mistura de estirpes possibilitaram uma nodulação com mais 30 nódulos por planta, sendo mais que o dobro do controle (população nativa). Enquanto que aos 50 DAE o maior número de nódulos foi obtido pela mistura de estirpes, seguido da BR 3262 e BR 3267, que foram superiores ao controle (população nativa), entretanto a mistura de estirpes foi superior também a inoculação com a UFLA 03-84 (BR 3302). Quanto a massa de nódulos a inoculação com a estirpe BR 3262 e a mistura de estirpes foi superior a inoculação com a BR 3299 aos 35 DAE. Já aos 50 DAE a inoculação mais uma vez com a BR 3262 e agora com a BR 3267 apresentou valores superiores a inoculação com a BR 3299.

Nota-se que mesmo no controle com o substrato (população nativa) as plantas foram noduladas. Isto se deve ao fato que os vasos foram colocados em campo aberto, ficando susceptíveis a nodulação por bactérias presentes. Levando em consideração que a Embrapa Agrobiologia é um centro de pesquisa com décadas de trabalhos com a caracterização e seleção de estirpes de diversas leguminosas, e que o feijão-caupi é uma planta promiscua, essa nodulação é um fato explicável. Em condições completamente estéreis, como no primeiro experimento em vasos de Leonard, não foi possível detectar diferenças na nodulação das estirpes, ao passo que no substrato foram observadas diferenças na nodulação proporcionada por cada estirpe (Tabela 3).

Tanto no material de solo como no substrato, as avaliações quanto a massa seca da parte aérea aos 35 DAE e 50 DAE não mostraram diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 3). Em valores absolutos, em ambos 35 DAE e 50 DAE, a BR 3299 apresentou maior massa da parte aérea no solo. Também em valores absolutos, aos 35 e 50 DAE, o substrato apresentou a menor massa da parte aérea, assim como foi observado em casa de vegetação, no experimento anterior (Tabela 1). Porém, diferindo desses resultados, Gualter (2010) avaliou a estirpe BR 3299 e aos 50 DAE e em casa de vegetação, encontrou para a BR 3299 número, massa seca de nódulos e massa seca da parte aérea similar às demais estirpes inoculadas (BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B/BR 3301 e UFLA 03-84/BR 3302), em diferentes variedades.

**Tabela 3.** Desdobramento do tratamento dentro de cada tempo de coleta, quanto a número e massa seca de nódulos, e massa seca da parte aérea de feijão-caupi (BRS Guariba) cultivado em amostras de solo (Planossolo Háplico) e em substrato (Perlita e areia).

Tratamentos	Época de avaliação (dias após a emergência)			
	35		50	
	Solo	Substrato	Solo	Substrato
Número de nódulos (N° planta <sup>-1</sup> )				
BR 3267	43a	35a	48a	56ba
BR 3262	36ba	36a	41a	71ba
INPA 03-11B (BR 3301)	38ba	20a	35a	38cba
UFLA 03-84 (BR 3302)	34ba	39a	36a	32cb
BR 3299	28ba	15a	37a	42cba
Mistura de Estirpes	30ba	34a	36a	80a
População Nativa	26b	12a	39a	17c
CV%	10,25*	23,13*	10,25*	23,13*
Massa seca de nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )				
BR 3267	561a	230ba	334a	474a
BR 3262	374ba	307a	437a	489a
INPA 03-11B (BR 3301)	299ba	160ba	354a	254ba
UFLA 03-84 (BR 3302)	324ba	235ba	351a	227ba
BR 3299	466ba	50b	336a	176b
Mistura de Estirpes	464ba	249a	389a	464ba
População Nativa	274b	179ba	396a	302ba
CV%	15,90*	25,13*	15,90*	25,13*
Massa seca da parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )				
BR 3267	3,4a	1,5a	5,5a	7,3a
BR 3262	2,9a	1,7a	5,5a	7,6a
INPA 03-11B (BR 3301)	2,0 a	1,1 a	6,3 a	6,7 a
UFLA 03-84 (BR 3302)	3,1 a	1,6 a	6,1 a	4,8 a
BR 3299	4,1 a	0,5 a	6,5 a	3,1 a
Mistura de Estirpes	3,0 a	1,8 a	5,9 a	7,3 a
População Nativa	2,4 a	1,3 a	6,2 a	4,2 a
CV%	19,49*	35,09*	19,49*	19,56*

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. \*Dados transformados com raiz quadrada (Y + 1).

Em ambiente de competitividade, como no caso do solo, e com a influência dos fatores abióticos, observa-se que a BR 3299 apresenta comportamento diferente, quando comparado ao de ambiente controlado. Este fato sugere um comportamento de sinergia com outras

bactérias no solo, que pode ter correspondência com a atuação de rizobactéria promotora de crescimento, já estudado por Silva et al. (2006) em feijão-caupi, e também efeitos sinérgicos e associações com outros microorganismos do solo, que podem aumentar o aproveitamento dos nutrientes do solo (SILVA et al., 2006).

Na média das duas avaliações (35 e 50 DAE) a inoculação com a estirpe BR 3267 proporcionou número de nódulos superior a BR 3299, a mistura de estirpes e a população nativa, para as plantas cultivadas no solo. Porém, na variável massa seca de nódulos, que apresenta menor variabilidade espacial e temporal, possibilitando melhor correlação com o desempenho simbiótico (BOHRER & HUNGRIA, 1998; SOUZA et al., 2008), não houve diferença entre os tratamentos, mesmo a BR 3267 tendo a maior massa em valores absolutos (Tabela 4). O estudo de Souza et al. (2008) ressaltou que em solos com população estabelecida de rizóbio é preferível optar pela massa seca de nódulos como variável para comparação de tratamentos. Nas plantas cultivadas no substrato, o maior número de nódulos foi obtido com a inoculação com a mistura de estirpes, que foi superior ao controle (população nativa). Para a massa de nódulos a inoculação com a BR 3262, BR 3267 e a mistura de estirpes mostrou valores superiores a inoculação com a BR 3299 (Tabela 4). Quanto à massa seca da parte aérea, independente do cultivo em solo ou substrato não houve diferença entre os tratamentos.

No substrato, o controle (população nativa) apresentou 14 nódulos, justificável em função da exposição dos vasos no campo. Esses nódulos resultaram em massa de mais de 240 mg (Tabela 4), ou seja, cada nódulo com mais de 17 mg, evidenciando processo de formação de nódulo com nódulos deformados e provavelmente ineficientes quanto a simbiose.

**Tabela 4.** Média de duas coletas (35 e 50 DAE) das variáveis número e massa seca de nódulos, e massa seca da parte aérea de feijão-caupi (BRS Guariba) em amostras de solo (Planossolo Háplico) e substrato (Perlita e areia).

Tratamentos (Estirpes)	N° nódulos		MS nódulos		MS parte aérea	
	N° planta <sup>-1</sup>		mg planta <sup>-1</sup>		g planta <sup>-1</sup>	
	Solo	Substrato	Solo	Substrato	Solo	Substrato
BR 3267	46a	46ba	448a	352a	4,4a	4,4a
BR 3262	39ba	53ba	406a	398a	4,2a	4,7a
INPA 03-11B (BR 3301)	37 ba	29 cba	326a	207ba	4,1a	3,9a
UFLA 03-84 (BR 3302)	35 ba	36 ba	338a	231ba	4,6a	3,2a
BR 3299	33 b	29 cba	401a	113b	5,3a	1,8a
Mistura de Estirpes	33 b	57 a	426a	356a	4,4a	4,6a
População Nativa	33 b	14 c	335a	241ba	4,3a	2,8a
CV%	10,25*	23,13*	15,90*	25,13*	19,49*	35,09*

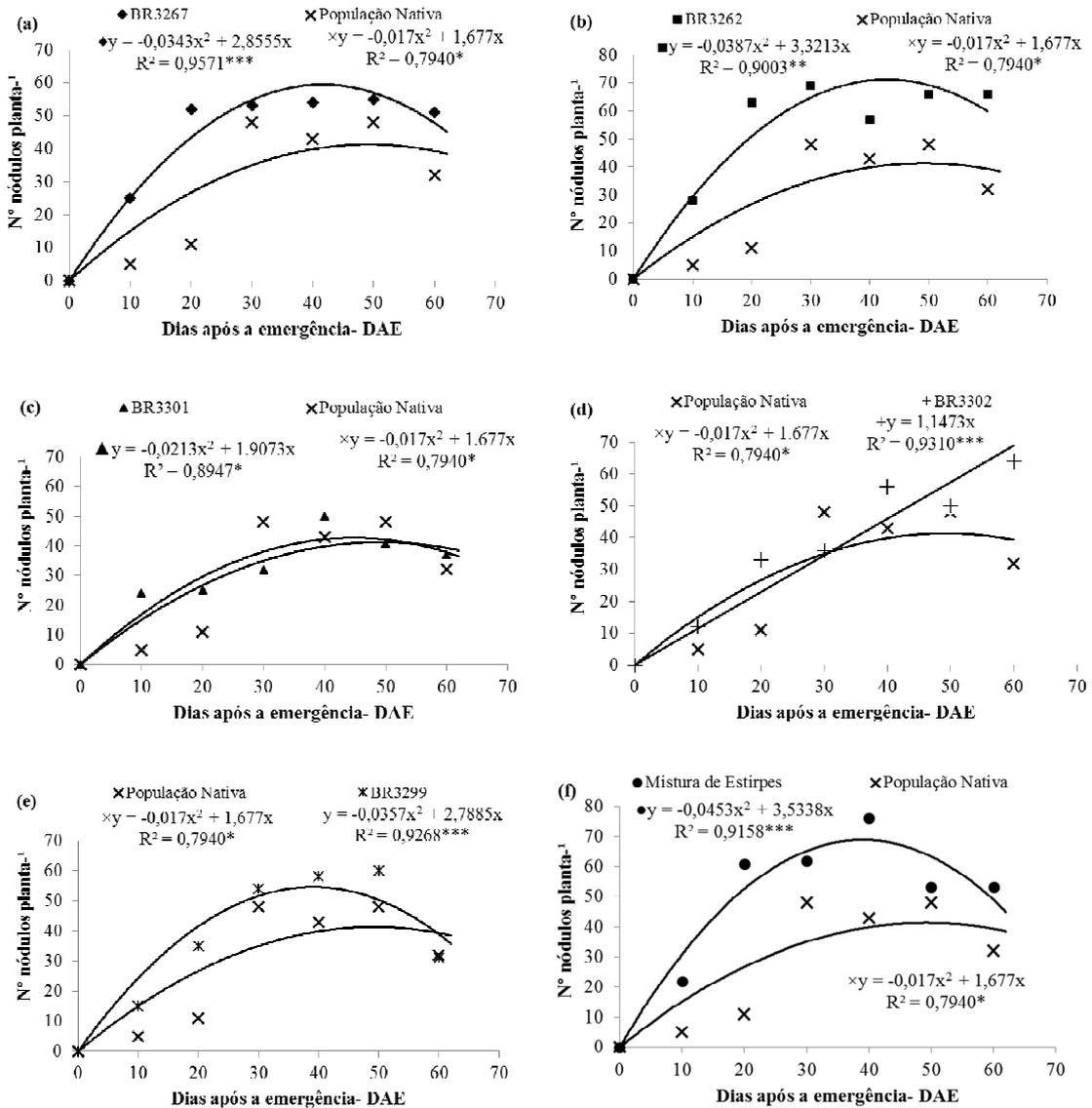
Para cada variável, médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. \*Dados transformados com raiz quadrada (Y + 1).

### 3.5.3 Eficiência simbiótica das estirpes de feijão-caupi em função do ciclo fenológico em amostras de Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico da região Centro-Oeste

A inoculação com as estirpes BR 3267 (a), BR 3262 (b), INPA 03-11B/BR 3301(c), BR 3299 (e) e a mistura de estirpes (f), mostrou respostas quanto ao número de nódulos de forma quadrática (Figura 4), indicando que existe um pico da nodulação e em seguida uma queda, fato este que acontece também com o controle, com a nodulação de estirpes nativas já

estabelecidas no solo. Diferentemente da estirpe UFLA 03-84 (BR 3302) que apresenta um padrão de nodulação linear.

Independente da estirpe, a inoculação promoveu aceleração na nodulação, nas coletas de 10 DAE e 20 DAE. Entretanto aos 10 DAE somente a inoculação com a BR 3262 proporcionou nodulação superior ao controle (população nativa), ao passo que aos 20 DAE junto com a BR 3262, a BR 3267 e a mistura de estirpes também mostrou nodulação superior à população nativa (Tabela 5).



**Figura 4.** Média do número de nódulos por planta de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada com a estirpe BR 3267 (a), BR 3262 (b), BR 3301/INPA 03-11B (c), BR 3302/UFLA 03-84 (d), BR 3299 (e) e a mistura de estirpes (f), sendo todas as estirpes comparadas com a população nativa (Controle, sem inoculação e adubação). \*Significativo a 10%; \*\*Significativo a 5%; \*\*\*Significativo a 1%.

Geralmente a avaliação da nodulação em feijão-caupi é feita aos 30-35 DAE, quanto a variável número de nódulos (Figura 4). A nodulação do feijão-caupi com as estirpes nativas, já estabelecidas no solo, mostrou valores estatisticamente similares às estirpes recomendadas

a partir dos 30 DAE; por conseguinte nas avaliações de 40, 50 e 60 DAE não se observam mais diferenças entre a nodulação da população nativa e as estirpes recomendadas (Tabela 5). Fato este devido à alta população de rizóbios no solo, capaz de nodular o feijão-caupi, e conforme a técnica do número mais provável (NMP) a densidade observada foi de  $3,478 \times 10^7$  rizóbios  $g^{-1}$  solo.

**Tabela 5.** Desdobramento do tratamento dentro de cada tempo de coleta durante o ciclo fenológico, quanto a número e massa seca de nódulos; massa seca de raiz e da parte aérea e atividade da nitrogenase de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada e não inoculada.

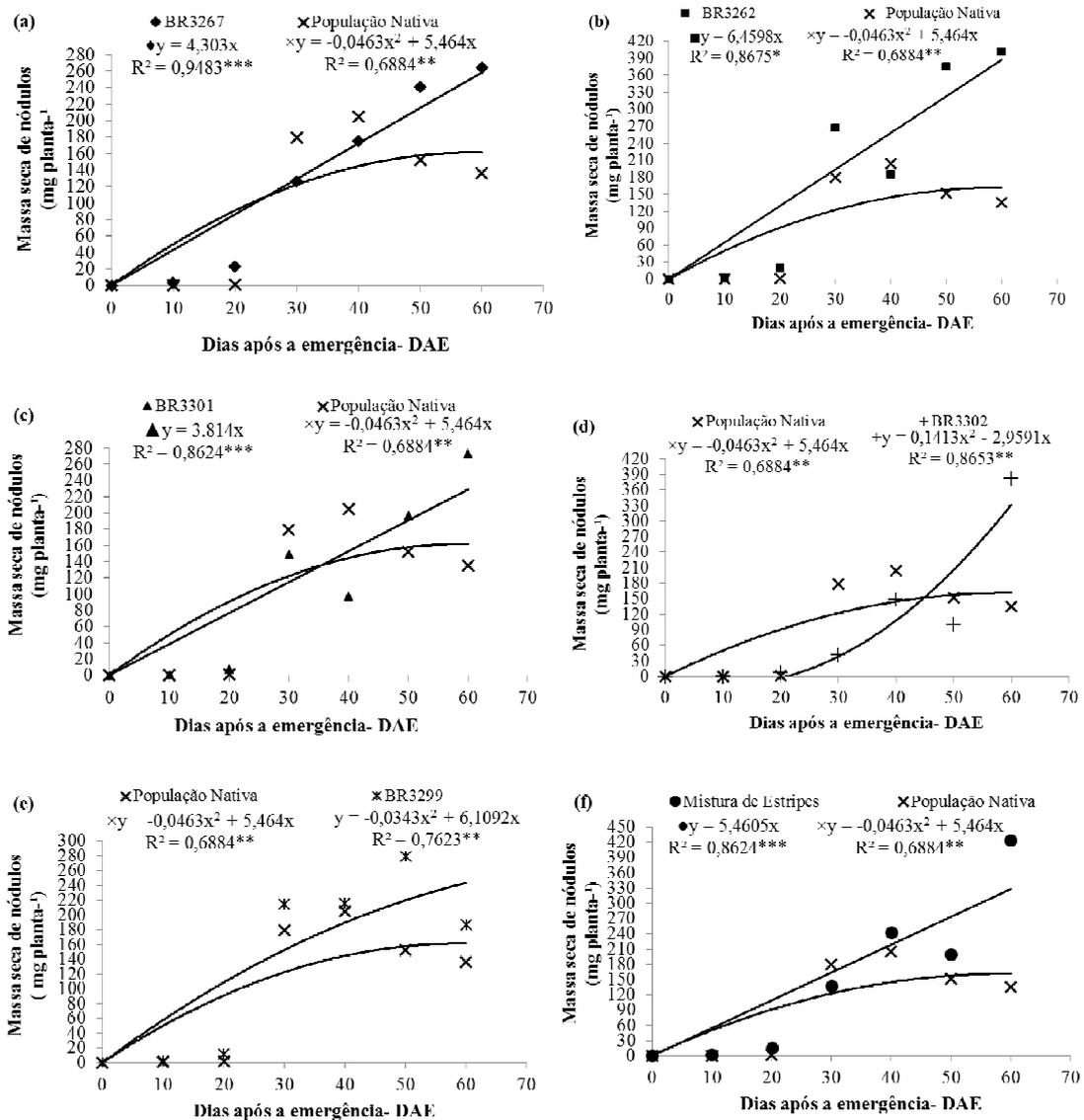
Tratamentos	Época de avaliação (dias após a emergência- DAE)					
	10	20	30	40	50	60
Número de nódulos ( $N^{\circ}$ planta $^{-1}$ )						
BR 3267	25ba	52a	53a	54a	55a	52a
BR 3262	30a	63a	69a	57a	66a	66a
INPA 03-11B (BR 3301)	24ba	25ab	32 a	50a	41a	37a
UFLA 03-84 (BR 3302)	12 ba	33ab	36 a	56a	50a	44a
BR 3299	27ba	35ba	54 a	58a	60a	31a
Mistura de Estirpes	22ba	61a	62 a	76a	53a	54a
População Nativa	5b	11b	48 a	43a	48a	32a
CV%	22,20*					
Massa seca de nódulos (mg planta $^{-1}$ )						
BR 3267	3,0 a	23 a	127 ba	175 a	241 cba	264 cba
BR 3262	1,7 a	20 a	267 a	185 a	376 a	403 a
INPA 03-11B (BR 3301)	0,7 a	7a	149 ba	97 a	196 cba	273 cba
UFLA 03-84 (BR 3302)	0,7a	8a	41 b	149 a	101 b	383 ba
BR 3299	2,0a	11 a	214 a	215 a	279 ba	187 cb
Mistura de Estirpes	2,7a	16 a	138 ba	243 a	200 cba	425 a
População Nativa	0,4 a	2 a	179 a	204 a	152 ba	136 c
CV%	28,62*					
Massa seca de raiz (g planta $^{-1}$ )						
BR 3267	0,10a	0,3 a	0,7 a	1,0 a	1,4 a	1,9 ba
BR 3262	0,07 a	0,3 a	0,7 a	0,9 a	1,3 a	2,0 a
INPA 03-11B (BR 3301)	0,08 a	0,2 a	0,6 a	1,0 a	1,4 a	1,8 cba
UFLA 03-84 (BR 3302)	0,08 a	0,3 a	0,6 a	1,0 a	1,3 a	1,4 b
BR 3299	0,09a	0,2 a	0,5 a	1,0 a	1,5 a	1,6 cba
Mistura de Estirpes	0,08 a	0,2 a	0,6 a	1,0 a	1,3 a	1,7 cba
População Nativa	0,06 a	0,2 a	0,7 a	1,1 a	1,2 a	1,4 ba
CV%	4,66*					
Massa seca da parte aérea (g planta $^{-1}$ )						
BR 3267	0,4 a	1,3 a	2,9 a	4,0 a	6,9 a	9,6 ba
BR 3262	0,3 a	1,3 a	4,0 a	4,7 a	5,8 ba	8,6 ba
INPA 03-11B (BR 3301)	0,3 a	1,0a	3,5 a	3,9 a	6,1 ba	8,5 ba
UFLA 03-84 (BR 3302)	0,4 a	1,2 a	3,2 a	4,9 a	5,8 ba	10,0 a
BR3 299	0,4 a	1,1 a	3,2 a	4,4 a	5,8 ba	7,9 b
Mistura de Estirpes	0,4 a	1,2 a	3,5 a	4,8 a	5,8 ba	8,6 ba
População Nativa	0,3 a	1,0 a	3,7 a	4,6 a	5,0 b	8,1 ba
CV%	6,46*					
Atividade específica da nitrogenase ( $nmol h^{-1} mg$ nódulo $^{-1}$ )						

BR 3267	0 a	39 a	65 a	2ba	12 a	0 a
BR 3262	0 a	18 ba	21 ba	25 a	9 a	0 a
INPA 03-11B (BR 3301)	0 a	0,3 b	77 a	0,04 b	3 a	0 a
UFLA 03-84 (BR 3302)	0 a	6 b	3 b	1 b	0,3a	0 a
BR 3299	0 a	0 b	6 b	2 ba	8 a	0 a
Mistura de Estirpes	0 a	12 ba	11 b	16 ba	6 a	0 a
População Nativa	0 a	0 b	3 b	3ba	5 a	0 a
CV%	71,39*					

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. \*Dados transformados com raiz quadrada ( $Y + 1,0$ ).

A massa seca de nódulos proporcionada pela população nativa apresentou padrão de resposta quadrático, assim como a nodulação com a estirpe BR 3299 (e). Porém, a nodulação das estirpes BR 3267 (a), BR 3262 (b), INPA 03-11B/BR 3301 (c) e a mistura de estirpes (f) apresentou aumento da massa de nódulos em padrão linear (Figura 5). Enquanto que a estirpe BR 3302 (d) respondeu de forma quadrática, diferentemente da variável número de nódulos, na qual a mesma respondeu de forma linear. O padrão linear de resposta da massa de nódulos, indica a senescência tardia dos nódulos. Assim as estirpes que possibilitam nodulação acelerada já aos 20 DAE, com o prolongamento da vida útil dos nódulos, podem aumentar a contribuição na FBN.

Diferente do observado no número de nódulos, na avaliação da massa de nódulos aos 10 e 20 DAE não há diferença estatística, o que mostra que a população nativa promoveu nodulação similar às estirpes recomendadas, como foi também observado aos 40 DAE (Tabela 5). Entretanto, aos 30 DAE, as maiores nodulações são obtidas com a BR 3262, BR 3299 e a população nativa; com valores superiores a nodulação com a inoculação da estirpe UFLA 03-84 (BR 3302). Já aos 50 DAE somente a nodulação da estirpe BR 3262 foi superior a UFLA 03-84 (BR 3302). Por fim, aos 60 DAE a maior massa seca de nódulos foi obtida pela inoculação com a mistura de estirpes e a BR 3262, com valores superiores a nodulação da população nativa e da BR 3299 (Tabela 5).

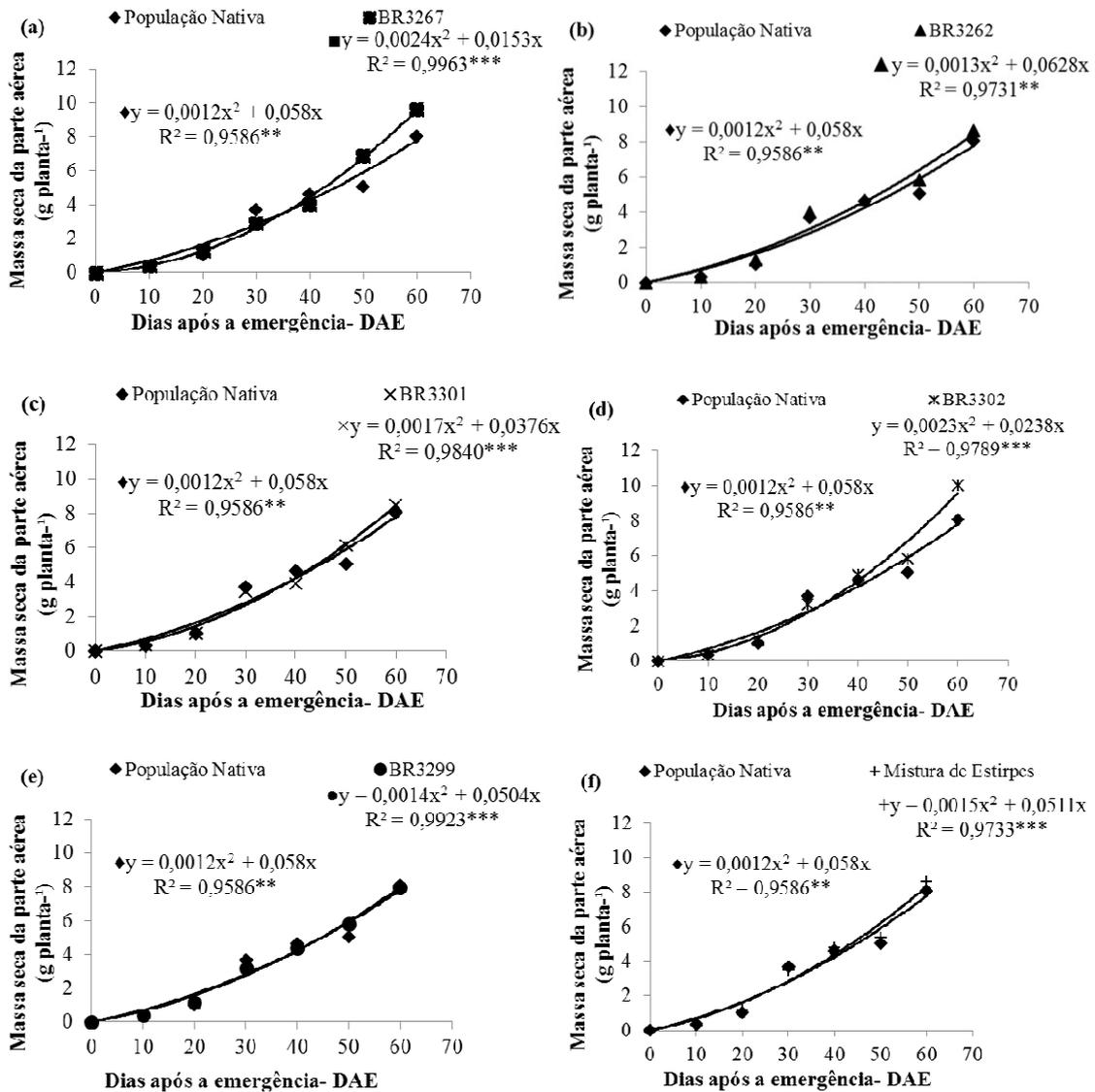


**Figura 5.** Média da massa seca de nódulos por planta de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada com a estirpe BR 3267 (a), BR 3262 (b), INPA 03-11B/BR 3301 (c), UFLA 03-84/BR 3302 (d), BR 3299 (e) e a mistura de estirpes (f), sendo todas as estirpes comparadas com a população nativa (Controle, sem inoculação e adubação). \*Significativo a 10%; \*\*Significativo a 5%; \*\*\*Significativo a 1%.

Avaliando a ontogenia da nodulação com a cultivar BRS Guariba, Xavier et al. (2007) observaram maior número de nódulos aos 30 DAE, com queda aos 40 DAE, e aumento aos 50 DAE. O mesmo ocorreu nesse estudo na inoculação com a estirpe BR 3262 (Figura 5, b); porém Xavier et al. (2007) cultivaram as plantas em areia e inocularam com a estirpe BR2001, que não é mais recomendada. Já para a massa de nódulos o maior valor foi obtido aos 50 DAE e, assim como no número de nódulos, observa-se uma queda aos 40 DAE. Porém, Xavier et al. (2007) observaram com outra cultivar a maior massa de nódulos aos 60 DAE; como também encontrado nesse estudo, exceto para a inoculação com a estirpe BR 3299 (Figura 5, e; Tabela 5).

Apesar do aumento inicial da nodulação promovido pela inoculação, não houve resposta da massa da parte aérea, tendo as plantas inoculadas praticamente o mesmo

desenvolvimento das plantas noduladas com as estirpes nativas, já estabelecidas no solo (Figura 6). Esta curva de crescimento similar resulta da ausência de diferença estatística para a massa da parte aérea entre os tratamentos nas avaliações de 10, 20, 30 e 40 DAE (Tabela 5). Aos 50 DAE a inoculação com a BR 3267 mostrou massa da parte aérea superior a população nativa e aos 60 DAE a estirpe UFLA 03-84 (BR 3302) foi superior a BR 3299. Estes dados mostram que está variável não é sensível para diferenciar a eficiência dessas estirpes, principalmente ao considerar que diferentes números e massa de nódulos levaram aos mesmos resultados de parte aérea.



**Figura 6.** Média da massa seca da parte aérea por planta de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada com a estirpe BR 3267 (a), BR 3262 (b), INPA 03-11B/BR 3301 (c), UFLA 03-84/BR 3302 (d), BR 3299 3301 (e) e a mistura de estirpes (f), sendo todas as estirpes comparadas com a população nativa (Controle, sem inoculação e adubação). \*Significativo a 10%; \*\*Significativo a 5%; \*\*\*Significativo a 1%.

Nos primeiros 20 DAE as plantas se caracterizam por crescimento lento (Figura 6), o que está relacionado ao estabelecimento do sistema radicular, e que este não é atrasado pela formação dos nódulos. A população nativa, que apresentou baixa nodulação nestes 20 DAE,

não mostrou diferença para as plantas que foram inoculadas e que aos 20 DAE já apresentavam alta nodulação. Isto indica que a nodulação inicial promovida pela inoculação não afetou o desenvolvimento da planta e, ao contrário, pode ser a chave para o aumento da FBN em feijão-caupi. Xavier et al. (2007) também observaram crescimento constante com a cultivar BRS-Guariba, dos 10 até os 50 DAE, com queda aos 60 DAE. Porém diferente deste trabalho, as plantas foram cultivadas em areia, o que pode ter limitado o desenvolvimento da planta.

A atividade específica da nitrogenase (Figura 7) mostra, de forma geral, que mesmo com a nodulação das plantas de feijão-caupi já aos 10 DAE, nesta fase ainda não há atividade expressiva da nitrogenase, mensurável pela metodologia utilizada (Tabela 5). Como aos 60 DAE conclui a atividade da nitrogenase (Tabela 5), apesar dos dados de nodulação indicarem que ainda existem nódulos estes estão em provável processo de senescência (ALESSANDRINI et al., 2003).

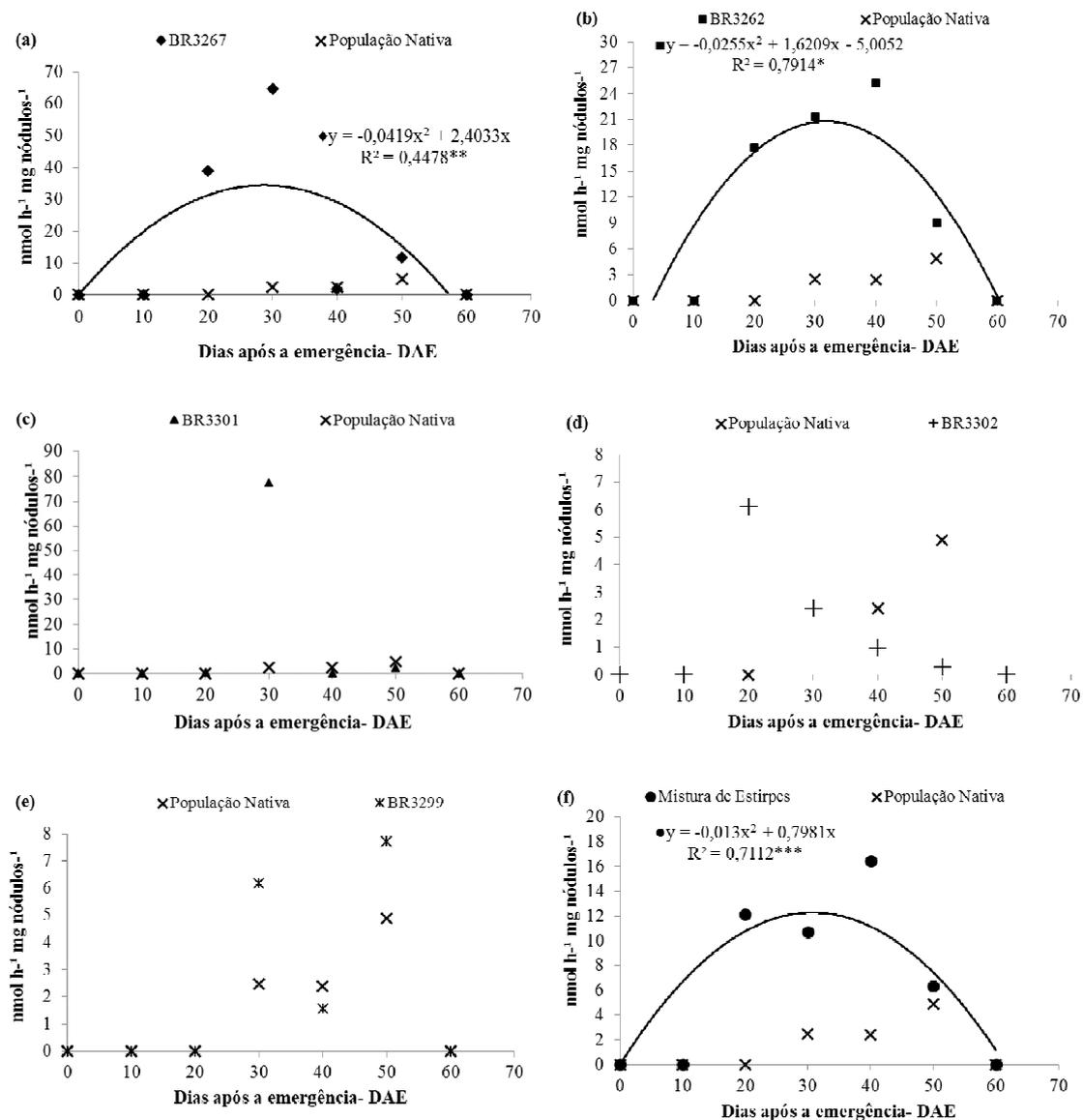
Os dados não se ajustam claramente a uma curva de regressão (Figura 7), como já foi constatado em feijão-caupi por Brito et al. (2009). Ainda assim a inoculação com a BR 3267 (a), BR 3262 (b) e a mistura (f) resultou em valores que são possíveis de se adequar a uma curva de regressão, sendo o melhor ajuste a equação quadrática, que indica nitrogenase ativa já a partir dos 20 DAE. A estirpe BR 3262 (b) e a mistura de estirpes (f) apresentaram valores máximos de atividade aos 40 DAE; a BR 3267 (a) obteve o máximo aos 30 DAE e aos 40 DAE a mesma reduziu drasticamente sua atividade.

As estirpes BR 3267 e a INPA 03-11B (BR 3301) apresentaram alta atividade da nitrogenase em valores absolutos, sendo superiores aos demais tratamentos, exceto para a inoculação com a BR 3262 aos 30 DAE (Tabela 5). Porém a BR 3301 tem baixa estabilidade, com máximo valor de atividade apenas aos 30 DAE. Zilli et al. (2006) avaliaram a atividade da nitrogenase aos 35 DAE em diversas estirpes de feijão-caupi e obtiveram os maiores valores com as estirpes BR 3267 e BR 3262, com o maior valor para a BR 3267. Mas a atividade da nitrogenase não é uma metodologia de quantificação da FBN, mas apenas como indicativo do período de FBN ativo.

A inoculação com a estirpe BR 3262 (b) já apresenta uma atividade da nitrogenase aos 20 DAE, crescente com 20, 30 e 40 DAE e, após este período ocorre queda rápida na atividade aos 50 e 60 DAE. Este período ativo de cerca de 20 dias pode representar ganho efetivo de fixação biológica de nitrogênio (Figura 7, b). Assim como a inoculação com a mistura de estirpes (Figura 7, f), que apresentou resposta similar à estirpe BR 3262, também com atividade no período de 20, 30 e 40 DAE, com o valor máximo aos 40 DAE, seguido de queda aos 50 e 60 DAE.

Por outro lado, a BR 3267 apresentou atividade da nitrogenase crescente no período de 20 e 30 DAE, seguida de queda brusca aos 40 DAE, com baixa atividade aos 50 DAE e cessando a atividade aos 60 DAE (Figura 7, a). Nesse caso a estirpe BR 3267 proporciona período menor de FBN, com atividade expressiva de apenas cerca de 10 dias. Porém sua alta atividade aos 20 DAE (Tabela 6), superior aos demais tratamentos, exceto a BR 3262, pode ajudar no estabelecimento inicial da planta. Da mesma forma a INPA 03-11B/BR 3301 (Figura 8, c) apresentou somente um pico de atividade da nitrogenase, aos 30 DAE, embora seja este o maior valor de atividade da nitrogenase entre todas as estirpes.

O período de 20 a 40 DAE foi a fase que concentrou a maior atividade da nitrogenase. O pico de máxima atividade da nitrogenase em feijão-caupi foi detectado por Brito et al. (2009) aos 38 DAS (dias após a semeadura). Esses autores, assim como nesse trabalho, também identificaram o início da atividade aos 24 DAS. Porém, para a inoculação foi usada a estirpe BR 2001, que não é mais recomendada.



**Figura 7.** Média da atividade específica da nitrogenase em raízes noduladas de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada com a estirpe BR 3267 (a), BR 3262 (b), BR 3301 (c), BR 3302 (d), BR 3299 (e) e a mistura de estirpes (f), sendo todas as estirpes comparadas com a população nativa (Controle, sem inoculação e adubação). \*Significativo a 10%; \*\*Significativo a 5%; \*\*\*Significativo a 1%.

Diferente das demais inoculações, a UFLA 03-84 (BR 3302) apresentou seu valor máximo de atividade da nitrogenase já aos 20 DAE. Após este período a atividade da nitrogenase decresceu de forma constante aos 30, 40, 50 DAE e por fim cessou aos 60 DAE (Figura 7, d). A inoculação com a BR 3299 (Figura 8, e) mostra atividade aos 30 DAE, com queda aos 40 DAE, e o máximo de atividade aos 50 DAE. Entre as inoculações foi a única estirpe com máximo aos 50 DAE, similar a atuação da população nativa. Na população nativa foi detectada atividade da nitrogenase começando somente aos 30 DAE, mantendo-se aos 40 DAE e aumentando aos 50 DAE, quando atingiu o valor máximo, e aos 60 DAE o final da atividade, assim como em todas as inoculações.

A similaridade da atividade da nitrogenase da BR 3299 e da população nativa, com início aos 30 DAE e o pico máximo aos 50 DAE indica o sinergismo da BR 3299 com a

população do solo; o que é também observado na diferença de nodulação que está estirpe apresentou nos ensaios em substrato e em solo. Desta forma a BR 3299 pode ter favorecido a nodulação com a população nativa do solo, logo sua atividade ocorre concomitante a atividade da nitrogenase da população nativa.

Os trabalhos com o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) são mais constantes. Diáz-Leal et al. (2012) estudando a regulação da FBN em *Phaseolus vulgaris* inoculado, observaram aos 21 DAS (dias após a semeadura) a atividade da nitrogenase, com aumento aos 28 DAS, que foi o máximo da atividade, seguido por queda aos 35, 42 e 49 DAS. Também com *Phaseolus vulgaris* inoculado, Almeida et al. (2013) observaram baixa atividade da nitrogenase aos 20 DAE e o maior valor da atividade da nitrogenase aos 35 DAE, seguido de queda e redução constante aos 45 e 55 DAE. Já Brito et al. (2009), estudando *Phaseolus vulgaris* inoculado, alcançou o máximo da atividade da nitrogenase aos 38 DAS e queda drástica logo depois. Assim como em feijão-caupi, a atividade da nitrogenase se concentrou no período de 20 a 40 DAE, exceto para o feijão-caupi que teve máxima atividade da nitrogenase aos 50 DAE com a inoculação da BR 3299 (Figura 7, e).

Avaliando a média geral de tempo independente do tratamento e para o tratamento independente do tempo no ensaio de eficiência simbiótica em função do ciclo fenológico (Tabela 6), nota-se resposta similar para o tempo de 30 a 60 DAE na variável número de nódulos, e na massa de nódulos a melhor resposta foi aos 60 DAE. Para a raiz e parte aérea a melhor resposta foi aos 60 DAE, conforme esperado para estas variáveis. A atividade da nitrogenase apresentou máximo valor aos 30 DAE.

Na avaliação do tratamento, independente do tempo, se observa que a inoculação com a BR 3262 possibilitou maiores número e massa de nódulos. Para a atividade da nitrogenase os maiores valores foram obtidos com a inoculação da BR 3267; enquanto para as variáveis massa de raiz e parte aérea não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Média em cada tempo de coleta e do tratamento das variáveis número e massa seca de nódulos; massa seca de raiz e da parte aérea e atividade da nitrogenase de feijão-caupi (BRS Guariba).

Tempo/ Tratamentos	Nº nódulos	MS nódulos	MS raiz	MS parte aérea	Atividade específica da nitrogenase (ARA)
Tempo (DAE)	Nº planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	-----g planta <sup>-1</sup> -----		nmol h <sup>-1</sup> mg nódulos <sup>-1</sup>
0	0d	0e	0g	0g	0c
10	21c	2e	0,08f	0,3f	0c
20	40b	12d	0,2e	1,2e	11b
30	51a	159c	0,6d	3,4d	26a
40	56a	181c	1,0c	4,5c	7b
50	53a	221b	1,6b	5,8b	6b
60	48a	296a	1,7a	8,7a	0c
<b>Tratamentos (Estirpes)</b>					
BR 3267	42ba	119ba	0,8a	3,6a	17a
BR 3262	50a	179a	0,8a	3,5a	10ba
INPA 03-11B(BR 3301)	30cb	103b	0,7a	3,3a	11cba
UFLA 03-84 (BR 3302)	36cba	97b	0,7a	3,6a	2c
BR 3299	38cba	130ba	0,7a	3,3a	2cb
Mistura de Estirpes	47a	146ba	0,7a	3,4a	7cba
População Nativa	27c	96b	0,7a	3,2a	1cb
CV%	22,20*	28,62*	4,66*	6,46*	71,39*

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott knott para o tempo e Tukey para os tratamentos, ambos a 5% de significância. \*Dados transformados com raiz quadrada (Y + 1,0).

Os resultados de quantificação da FBN baseados na abundância natural delta <sup>15</sup>N identificam que nas avaliações com 30, 40 e 50 DAE todas as estirpes apresentam diluição isotópica, quando comparadas às plantas de referência, inclusive a população nativa, que tem uma diluição similar às estirpes inoculadas (Tabela 7). As plantas usadas como referência (*Phaseolus vulgaris* não nodulante e *Eleusine indica*) apresentaram variação de aproximadamente 7 a 8 deltas, dentro da faixa de 5 a 10 deltas que Alves et al. (2003) identificaram como comum para os solos brasileiros.

Na avaliação feita aos 30 DAE as estirpes apresentam diluição isotópica com variação entre as mesmas de cerca de 4 a 5 deltas (Tabela 7). Aos 40 DAE também foi observada diluição isotópica, quando comparada as plantas de referência. Neste período a inoculação com a estirpe BR 3299 proporcionou diluição superior à inoculação com a INPA 03-11B/BR 3301 (Tabela 7). E aos 50 DAE os tratamentos apresentam diluição isotópica, comparando com as plantas de referência, e neste período a inoculação com a BR 3299 proporcionou em valores absolutos a maior diluição isotópica, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 8).

**Tabela 7.** Desdobramento do tratamento dentro de cada tempo de coleta, quanto as variáveis delta  $\delta^{15}\text{N}$  (‰), porcentagem de nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio acumulado na parte aérea e nitrogênio derivado da FBN na parte aérea de feijão-caupi (BRS Guariba).

Tratamento	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ndfa(%) <sup>1</sup>	N acumulado parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )	N derivado FBN parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )
30 dias após a emergência				
BR 3267	5,32cba	22a	131a	28a
BR 3262	4,16a	35a	171a	59a
INPA 03-11B (BR 3301)	5,02cba	25a	136a	31a
UFLA 03-84 (BR 3302)	4,57ba	30a	183a	55a
BR 3299	4,27a	33a	159a	51a
Mistura de Estirpes	4,67ba	29a	169a	47a
População Nativa	4,56ba	30a	149a	43a
Planta de Referência $\delta^{15}\text{N}$ (‰)				
Feijão não nodulante NORH 54 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) 7,25bc				
Pé-de-galinha ( <i>Eleusine indica</i> ) 8,10c				
40 dias após a emergência				
BR 3267	4,47ba	41a	164a	67a
BR 3262	3,97ba	46a	196a	88a
INPA 03-11B (BR 3301)	6,00dcb	26a	153a	39a
UFLA 03-84 (BR 3302)	5,33cba	33a	190a	59a
BR 3299	3,20a	53a	143a	73a
Mistura de Estirpes	3,95ba	46a	152a	69a
População Nativa	4,84cba	37a	121a	45a
Planta de Referência $\delta^{15}\text{N}$ (‰)				
Feijão não nodulante NORH 54 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) 8,73d				
Pé-de-galinha ( <i>Eleusine indica</i> ) 7,48dc				
50 dias após a emergência				
BR 3267	4,63ba	32a	184a	58a
BR 3262	3,89a	40a	188a	74a
INPA 03-11B (BR 3301)	3,85a	40a	162a	57a
UFLA 03-84 (BR 3302)	5,43ba	23a	176a	40a
BR 3299	3,67a	42a	150a	63a
Mistura de Estirpes	4,86ba	29a	135a	40a
População Nativa	3,71a	42a	109a	45a
Planta de Referência $\delta^{15}\text{N}$ (‰)				
Feijão não nodulante NORH 54 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) 7,54b				
Pé-de-galinha ( <i>Eleusine indica</i> ) 7,52b				
CV%	8,92*	16,73*	13,96*	17,05*

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*Dados transformados com raiz quadrada ( $Y + 1,0$ ). Valor  $B_{pa} = -1,66\%$

$$^1\%Ndfa = [(\delta^{15}\text{N} \text{ feijão não nodulante} - \delta^{15}\text{N} \text{ planta fixadora}) / (\delta^{15}\text{N} \text{ feijão não nodulante} - (-1,66))] \times 100$$

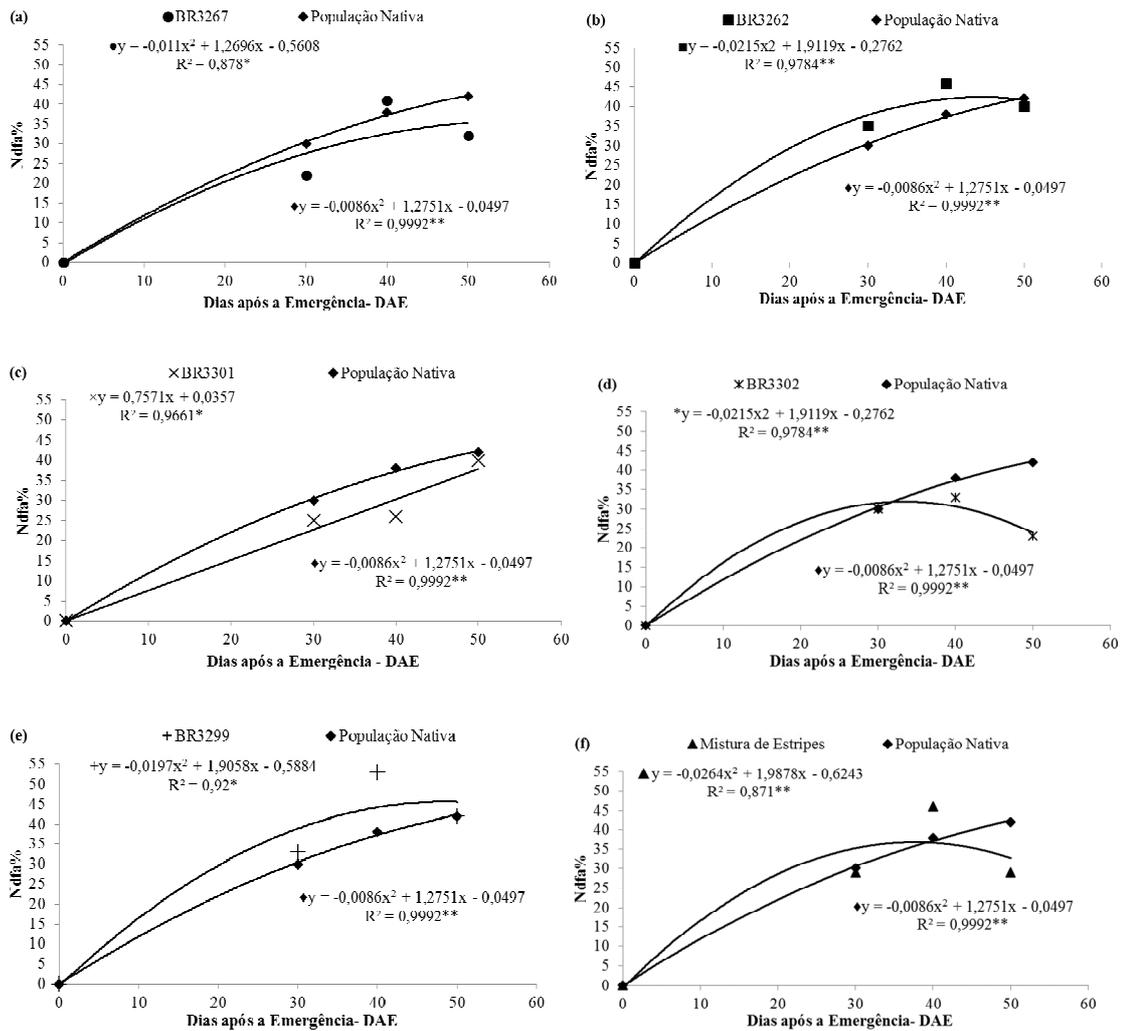
Os resultados com a quantificação da FBN (%Ndfa) mostraram que a melhor época para a sua avaliação é entre 40 e 50 DAE, sendo que após este período a %Ndfa tende a reduzir, como mostram as equações de regressão, todas com padrão quadrático, onde a %Ndfa reduziu após os 40 DAE, exceto para a inoculação com a INPA 03-11B (BR 3301), que têm

um aumento linear %Ndfa até os 50 DAE (Figura 8). Brito et al. (2009) observaram para a abundância natural delta  $^{15}\text{N}$  que a %Ndfa aos 47 DAE em feijão-caupi, também em vasos, foi bem acima do valor encontrado aos 31 DAE e muito próximo dos valores para as avaliações com 58, 68 e 78 DAE. Estudos a campo usando a abundância natural delta  $^{15}\text{N}$  têm quantificado a %Ndfa em feijão-caupi aos 46 DAE (BELANE & DAKORA, 2009; 2010); porém é evidente que o ciclo da cultivar utilizada em cada estudo pode alterar o período ideal para a avaliação.

A variação no ciclo dos diferentes genótipos de feijão-caupi é um fato que pode mudar o período de máxima simbiose. Como por exemplo, na África do Sul Belane et al. (2011) avaliaram a quantificação da FBN com a abundância natural delta  $^{15}\text{N}$  em 32 genótipos de feijão-caupi, aos 76 DAE, entretanto estes genótipos completaram seu ciclo produtivo com 164 DAE. No Brasil, em geral, as cultivares de feijão-caupi tem ciclos de 60 a no máximo 90 DAE, para de aproveitar o pequeno intervalo da safra (na região Centro-Oeste) e também o curto período de chuvas (na região Nordeste).

Na avaliação do nitrogênio derivado da FBN, a BR 3262 apresentou os maiores valores absolutos nos três períodos (30, 40 e 50 DAE), porém sem diferença entre os tratamentos (Tabela 7). Aos 40 DAE o nitrogênio derivado da FBN ( $88 \text{ mg planta}^{-1}$ ) proporcionado pela estirpe BR 3262 foi aproximadamente o dobro do encontrado para as plantas não inoculadas (população nativa), que obtiveram  $45 \text{ mg planta}^{-1}$  do nitrogênio derivado da FBN (Tabela 7).

Quanto aos valores de %Ndfa não houve diferença entre os tratamentos nas avaliações com 30, 40 e 50 DAE, indicando que as estirpes inoculadas assim como a população nativa têm %Ndfa similar. Também é notório que independente da época de avaliação não existe diferença entre os tratamentos, porém há diferença entre as épocas. A avaliação aos 50 DAE foi similar a dos 40 DAE, porém está foi superior à avaliação realizada aos 30 DAE (Tabela 8). Porém, em valores absolutos, a BR 3262 proporcionou o maior valor ( $35 \text{ %Ndfa}$ ) aos 30 DAE; enquanto que aos 40 DAE a BR 3299 apresentou o maior valor, com  $53 \text{ %Ndfa}$ . Também aos 50 DAE a BR 3299 e a população nativa ( $42 \text{ %Ndfa}$ ) apresentaram os maiores valores absolutos (Tabela 7).



**Figura 8.** Média da quantificação da FBN (%Ndfa) pela abundância natural  $\delta^{15}\text{N}$  de feijão-caupi (BRS Guariba) inoculada com a estirpe BR 3267 (a), BR 3262 (b), INPA 03-11B/BR 3301 (c), UFLA 03-84/BR 3302 (d), BR 3299 (e) e a mistura de estirpes (f), sendo todas as estirpes comparadas com a população nativa (Controle, sem inoculação e adubação). \*\*\*Significativo a 1%; \*\*Significativo a 5% e \*Significativo a 10%.

Os valores de nitrogênio total acumulado na planta não mostraram diferenças entre os tratamentos aos 30, 40 e 50 DAE (Tabela 7), confirmando que independente da época de avaliação (Tabela 8) também não há diferença entre os tratamentos. Porém, quanto ao nitrogênio derivado da FBN, mesmo sem diferença entre os tratamentos em cada época de avaliação (Tabela 7) é possível agora notar (Tabela 8) que na média das épocas de avaliação a inoculação com a BR 3262 proporcionou acúmulo de N derivado da FBN ( $74 \text{ mg planta}^{-1}$ ), com valor superior ao acumulado pela inoculação com a INPA 03-11B (BR 3301) e a nodulação pela população nativa. E, assim como Ndfa(%), o nitrogênio acumulado derivado da FBN, na média dos tratamentos, foi maior aos 40 DAE e similar a avaliação aos 50 DAE, porém superior a avaliação aos 30 DAE (Tabela 8).

De acordo com Brito et al. (2009), em estudo em vasos, a massa da parte aérea das plantas de feijão-caupi coletadas aos 40 DAS não apresentou resposta ao aumento da dose de nitrogênio aplicado, sendo possível observar que o nitrogênio acumulado na parte aérea não

respondeu de forma linear ao aumento da dose de N. Mesmo na maior dose de N aplicada na cultura (160 kg ha<sup>-1</sup> de N), que correspondeu a cerca de 60% do nitrogênio proveniente na planta, que conseqüentemente reduziu o N proveniente da fixação biológica. Ao passo que a quantidade de nitrogênio na planta proveniente do solo não foi influenciada pelas doses de N (BRITO et al., 2009). Em outro ensaio Brito et al. (2011), também em vasos, observaram que no início do ciclo (24 DAS) o feijão-caupi apresentava cerca de 45% do nitrogênio derivado do solo, 15% do fertilizante e 40% da fixação biológica; entretanto aos 47 DAS, o nitrogênio proveniente da FBN passou para mais de 80%. Ambos os trabalhos (BRITO et al., 2009; 2011) constataram que a fixação simbiótica forneceu a maior parte do N acumulado nas plantas de feijão-caupi, seguida, em ordem decrescente, pelo solo e o fertilizante. A planta de feijão-caupi faz uso da FBN conforme a eficiência da simbiose, no início da nodulação ou com simbiose de baixa eficiência a planta tende a assimilar mais nitrogênio do solo; por outro lado, com a nodulação estável ou simbiose eficiente a planta assimilará mais nitrogênio proveniente da fixação biológica.

**Tabela 8.** Média dos tratamentos nos três tempos de coleta (30, 40 e 50 DAE) e média dos tempos de coleta das variáveis  $\delta^{15}\text{N}$  (‰), porcentagem de nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio acumulado na parte aérea e nitrogênio derivado da FBN na parte aérea de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba).

Tratamento/ Tempo	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ndfa(%) <sup>1</sup>	N acumulado parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )	N derivado FBN parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )
Tratamento (Estirpes)				
BR 3267	4,80a	31a	160a	51ba
BR 3262	4,01a	40a	185a	74a
INPA 03-11B (BR 3301)	4,95a	30a	150a	42b
UFLA 03-84 (BR 3302)	5,11a	29a	183a	51ba
BR 3299	3,72a	43a	151a	62ba
Mistura de Estirpes	4,49a	35a	152a	52ba
População Nativa	4,37a	36a	126a	44b
Planta de Referência $\delta^{15}\text{N}$ (‰)				
Feijão não nodulante NORH 54 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	7,84b			
Pé-de-galinha ( <i>Eleusine indica</i> )	7,70b			
Tempo (DAE)				
30	5,32a	29b	157a	45b
40	5,33a	40a	160a	63a
50	5,01a	35ba	158a	54ba
CV%	8,92*	16,73*	13,96*	17,05*

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey, a 5% de significância. \*Dados transformados com raiz quadrada ( $Y + 1,0$ ). Valor  $B_{pa} = -1,66\%$

<sup>1</sup>%Ndfa =  $[(\delta^{15}\text{N}_{\text{feijão não nodulante}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{planta fixadora}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{feijão não nodulante}} - (-1,66))] \times 100$

A maior taxa de fixação Ndfa(%) e acúmulo de nitrogênio via simbiótica em valores absolutos na média global aos 40 DAE (Tabela 8) podem ser atribuídas ao mecanismo “N-feedback” (ALMEIDA et al., 2000; SCHULZE, 2004; FISCHINGER et al., 2006). O qual consiste da remobilização de N das folhas inferiores durante a senescência foliar, portanto as 50 DAE este mecanismo reduz as taxas de FBN, fato que foi evidenciado em feijão-comum (FISCHINGER et al., 2006). Porém os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  mostram diluição isotópica similar, inclusive com diluição maior aos 50 DAE em valores absolutos, e está maior taxa de

fixação aos 40 DAE também pode ser atribuída ao maior delta  $^{15}\text{N}$  das plantas de referências aos 40 DAE.

O nitrogênio acumulado na planta, no caso o delta  $^{15}\text{N}$  tende a manter-se na planta durante o seu ciclo de vida. No processo de senescência foliar o N é remobilizado para os órgãos reprodutivos; porém as plantas de feijão-caupi cultivadas em vasos não atingiram a produção de vagens, o mesmo para o ensaio em campo. Assim pouco N é remobilizado para os órgãos reprodutivos, logo este nitrogênio é perdido na senescência foliar, assim como ao final do ciclo da planta. Portanto, em campo o nitrogênio proveniente da FBN tende a se manter na planta seja nas folhas ou nos órgãos reprodutivos, e a avaliação da quantificação da FBN pela abundância natural de delta  $^{15}\text{N}$  aos 50 DAE é a técnica mais recomendada.

As respostas da quantificação da FBN (%Ndfa) sustentam os indicativos da atividade da nitrogenase, desde que entendido como um efeito postergado. Uma vez que a atividade identificada aos 20 DAE, provavelmente, corresponde à fixação acumulada (%Ndfa) aos 30 DAE e assim por diante, período este compreendido entre a absorção, assimilação e translocação para a parte aérea. Assim as estirpes BR 3267 e BR 3262 proporcionam máxima %Ndfa aos 30 e 40 DAE, respectivamente; desta forma a BR 3262 apresenta queda de 6%Ndfa entre 40 e 50 DAE. Já a BR 3267 apresentou queda de 9%Ndfa, ainda que a diferença seja pouco expressiva ela refletiu exatamente o comportamento da atividade da nitrogenase, em que a BR 3262 se manteve constante entre 30 e 40 DAE, enquanto que a BR 3267 apresentou queda aos 40 DAE.

A inoculação com a BR 3302, que mostrou máximo da nitrogenase com 20 DAE e na avaliação com 30 DAE uma fixação de 30% Ndfa, mostrou que ao avaliar aos 40 DAE a fixação aumenta apenas para 33% Ndfa. A INPA 03-11B (BR 3301), que teve apenas um pico aos 30 DAE, proporcionou 25% Ndfa na avaliação aos 30 DAE e aos 40 DAE aumentou somente para 26% Ndfa. A nodulação com a população nativa não apresentou atividade da nitrogenase aos 20 DAE, porém, manteve picos constantes entre 30, 40 e 50 DAE, o que proporcionou FBN crescente com 30, 37 e 42 % Ndfa, respectivamente. E a inoculação com a BR 3299, que apresentou os maiores valores de %Ndfa aos 40 e 50 DAE, também revelou os máximos da nitrogenase com 30, 40 e 50 DAE.

Na primeira parte deste capítulo, na tabela 2, os dados indicavam que a máxima eficiência nodular encontrada foi de 34%. Na Tabela 8, com a quantificação da FBN (%Ndfa) aos 30 DAE, observa-se a fixação biológica máxima de 35%. Como exemplo, a Tabela 2 indica que para a mistura de estirpes a razão nodular era de 4,9 mg nódulos  $\text{mg}^{-1}$  N. , Neste caso, avaliando a Tabela 8, para a mistura de estirpes acumular 47 mg planta $^{-1}$  de N derivado da FBN na parte aérea foram necessários 137,66 mg de nódulos, logo uma razão próximo de 3 mg nódulos  $\text{mg}^{-1}$  N fixado. Já a BR 3262 obteve 267 mg de nódulos, o que proporcionou a fixação de 59 mg planta $^{-1}$  de N derivado da FBN, conseqüentemente uma razão nodular de 4,5; enquanto que na Tabela 2 a razão nodular foi de 4,8. Em casa de vegetação (vasos de Leonard) o crescimento da planta é menor do que em solo natural, o que faz com que o acúmulo de nitrogênio seja menor, proporcionando razão nodular maior. Mesmo assim existe similaridade entre os valores, o que torna a razão nodular em casa de vegetação como variável útil.

### 3.6 CONCLUSÕES

Em condições controladas e estéreis de casa de vegetação as plantas de feijão-caupi inoculadas com as estirpes de rizóbios (BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B/BR 3301, UFLA 03-84/BR 3302 e a BR 3299) apresentam características de nodulação similar.

A inoculação das plantas com o consórcio das estirpes, assim como a mistura de estirpes respondeu de forma satisfatória em casa de vegetação, podendo ser testado em solo e a campo.

As estirpes INPA 03-11B (BR 3301) e a UFLA 03-84 (BR 3302) não mostram existir antagonismo quando inoculadas juntas, assim como também quando consorciadas com a BR 3262.

A variável razão nodular mostrou-se uma ferramenta eficiente para avaliação do desempenho das estirpes inoculadas em condições controladas.

A inoculação com a BR 3299 proporcionou resposta em condições de solo diferente da sob condições de substrato, com a melhor resposta no material de solo.

A nodulação pelas estirpes nativas estabelecidas no material de solo foi capaz de nodular o feijão-caupi de forma similar às estirpes inoculadas, porém a inoculação promoveu aceleração inicial da nodulação.

Independente da inoculação a massa seca da parte aérea respondeu de forma similar quanto as avaliações durante o ciclo fenológico.

A atividade da nitrogenase tem seu início aos 20 DAE, com os maiores valores entre 30 a 50 DAE. E mesmo com a nodulação já aos 10 DAE, nesta fase ainda não há atividade expressiva da nitrogenase e aos 60 DAE se observa o final da atividade da nitrogenase.

Em valores absolutos, a inoculação com a BR 3267 e a BR 3301 proporcionou as maiores atividades da nitrogenase, em ambas aos 30 DAE. A inoculação com a BR 3262 e a mistura de estirpes proporcionou três picos de atividade da nitrogenase, aos 30, 40 e 50 DAE.

A nodulação com a população nativa apresentou atraso inicial na nodulação, consequentemente a atividade da nitrogenase começa somente aos 30 DAE. Aos 40 DAE a nodulação com a população nativa mostrou apenas cerca da metade do N derivado da FBN proporcionado pela inoculação com a BR 3262.

Não foi observada diferença estatística na %Ndfa, no nitrogênio acumulado na planta e no nitrogênio derivado da FBN entre as plantas inoculadas com as estirpes (BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B/BR 3301, UFLA 03-84/BR 3302, BR 3299) e a mistura de estirpes e as plantas noduladas pelas estirpes nativas, nas avaliações aos 30, 40 e 50 DAE.

Na média geral, a inoculação com a BR 3262 proporcionou o maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea e também a maior quantidade de nitrogênio derivado da FBN.

## **4 CAPÍTULO II**

### **VARIAÇÃO DA RESPOSTA DO FEIJÃO-CAUPI A INOCULAÇÃO EM CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DISTINTAS**

#### 4.1 RESUMO

O cultivo do feijão-caupi está concentrado nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, porém a região Centro-Oeste vem aumentando a área cultivada com feijão-caupi, especialmente no estado do Mato Grosso e a região Sudeste, apesar de sua tímida produção, tem vastas áreas que poderiam ser utilizadas para o cultivo do feijão-caupi, que se beneficia da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), que tem sua eficiência aumentada com uso do inoculante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta do feijão-caupi a inoculação com estirpes de rizóbios em condições de campo, em áreas com ambientes de Cerrado e Mata Atlântica. Foram realizados dois experimentos, um na safra 2010/2011 (Sinop-MT) e o outro na entre safra de 2012 (Vila Pavão-ES). Utilizou-se delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições, inoculando as estirpes (BR 3267; BR 3262, INPA 03-11B/BR 3301, UFLA 03-84/BR 3302, BR 3299) e a mistura das estirpes e dois controles (adubado com 70 kg N ha<sup>-1</sup> e sem inoculação; sem adubação e com inoculação). A população nativa do solo proporcionou mais de 100 mg de nódulos na área em ambiente de Cerrado, por outro lado na Mata Atlântica os tratamentos apresentaram nodulação abaixo de 100 mg. No ambiente de Cerrado a inoculação com a mistura de estirpes proporcionou a maior produtividade (1609 kg ha<sup>-1</sup>), enquanto que no ambiente de Mata Atlântica a inoculação com a estirpe BR 3267 promoveu o maior rendimento de grãos (1322 kg ha<sup>-1</sup>).

**Palavras-chave:** Rizóbios. Inoculante. Centro-Oeste.

## 4.2 ABSTRACT

The cultivation of cowpea is concentrated in the North and Northeast of Brazil, but the Midwest has increased the area cultivated with cowpea, especially in the state of Mato Grosso and the Southeast region, despite their timid production, it has vast areas that could be used for the cultivation of cowpea, which benefits from the Biological Nitrogen Fixation (BNF), which has its increased efficiency with use of inoculant. The objective of this study was to evaluate the response of cowpea inoculation with strains of rhizobia in the field, in the area of Cerrado and Atlantic Forest. Two experiments were conducted, one in the 2010/2011 season in the Cerrado and the other in between harvest in 2012 in the Atlantic Forest area. We used a completely randomized block case, four replications, inoculating strains (BR 3267; BR 3262; INPA 03-11B/BR 3301; UFLA 03-84/BR 3302, BR 3299 and the mixture of strains together) and two controls (fertilized with 70 kg N ha<sup>-1</sup> and without inoculation; unfertilized and inoculation). Field in the native soil population provided more than 100 mg of nodules in the Cerrado area, on the other hand in the Atlantic Forest treatments showed a nodulation below 100 mg. Cerrado inoculation with a mixture of strains gave the highest yield (1609 kg ha<sup>-1</sup>), while in the Atlantic Forest inoculation with strain BR 3267 promoted the highest grain yield (1322 kg ha<sup>-1</sup>).

**Key words:** Rhizobia. Inoculant. Midwest.

### 4.3 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna Unguiculata* W. L) é cultivado principalmente por agricultores de base familiar, concentrados nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde ocupa cerca de 55 mil e 1,3 milhão de hectares, respectivamente (FREIRE FILHO, 2011). Conseqüentemente, os resultados de pesquisas para a lavoura são oriundos de trabalhos concentrados nestas regiões. No entanto a região Centro-Oeste vem aumentando a área cultivada com feijão-caupi, especialmente no estado do Mato Grosso. A região Sudeste, apesar de sua tímida produção, tem vastas áreas que poderiam ser utilizadas para o cultivo do feijão-caupi, em situações como no plantio ou reforma do canavial, no plantio ou após a poda do café e em áreas que não são mais apropriadas ao feijão-comum.

O feijão-caupi se beneficia da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), que tem sua eficiência aumentada com uso do inoculante, que é o produto tecnológico da FBN, já bastante difundido na cultura da soja. Para a cultura do feijão-caupi são recomendadas junto ao MAPA quatro estirpes para a produção de inoculantes, registradas como: SEMIA 6461, SEMIA 6462, SEMIA 6463 e SEMIA 6464. A recomendação destas estirpes foi oriunda de trabalhos localizados na região Nordeste, como a BR 3267= SEMIA 6462 (MARTINS et al., 2003); Norte, como a BR 3262= SEMIA 6464 (ZILLI et al., 2006); e na região Sudeste dos trabalhos de Lacerda et al. (2004) e Soares et al. (2006), que culminaram na recomendação das estirpes UFLA 03-84= BR 3302 (SEMIA 6461) e INPA 03-11B= BR 3301 (SEMIA 6463).

Após a recomendação destas estirpes pelo MAPA, diversos estudos mostraram os benefícios da inoculação. Porém em virtude da representatividade na cultura nas regiões Norte e Nordeste, os trabalhos ficaram concentrados nestas regiões, como por exemplo, na região Nordeste (MARTINS et al., 2003; ZILLI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; FERREIRA et al., 2013; ALCANTARA et al., 2014; MARINHO et al., 2014) e na região Norte (ZILLI et al., 2009; CHAGAS JÚNIOR et al., 2010; GUALTER et al., 2011; SILVA NETO et al., 2013). Assim, até o momento, não existem resultados de avaliações do desempenho das estirpes recomendadas pelo MAPA na região Centro-Oeste. O que justifica trabalhos que avaliem o desempenho destas cepas nas condições edafoclimáticas dessa região, mas que também comparem, no mesmo estudo, a resposta de outra região.

A resposta da inoculação com as estirpes recomendadas é mutável, não existe uma unanimidade da melhor estirpe, independente do trabalho. Os fatores edafoclimáticos de cada região são incluídos entre os fatores responsáveis por esta variação. Da mesma forma, a presença de uma população nativa de rizóbios estabelecida no solo, que tem sido apontada como fator preponderante para a falta de resposta com a inoculação (THIES et al., 1991; SOARES et al., 2014), principalmente porque o feijão-caupi é uma planta promiscua a nodulação com diferentes bactérias do grupo rizóbio. Por outro lado, os estudos conduzidos com a inoculação do feijão-caupi foram fundamentais para apoiar o efeito positivo da inoculação na lavoura, levando a comercialização de aproximadamente 150 mil doses de inoculantes no ano de 2012 (ANPII- Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculante), principalmente na região Centro-Oeste.

Nos solos da região Centro-Oeste já foi constatada uma população de *Bradyrhizobium* estabelecida capaz de nodular soja (MENDES et al., 2004). Este fato influencia diretamente na introdução das quatro estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para feijão-caupi, pois como mostrado por Zilli et al. (2011), em casa de vegetação, as estirpes recomendadas para a soja nodularam o feijão-caupi.

Assim, estratégias biotecnológicas devem ser utilizadas para contrapor a presença da população nativa de rizóbios estabelecida no solo e as condições edafoclimáticas adversas,

como por exemplo, a mistura de estirpes na inoculação, também usada na cana-de açúcar para aumentar a eficiência da FBN (SCHULTZ et al., 2012). Outro ponto importante, é que, como as cultivares são recomendadas por região, as estirpes indicadas pelo MAPA para o feijão-caupi podem apresentar respostas diferentes em virtude das condições edafoclimáticas da região. Portanto torna-se necessário avaliar o desempenho da estirpe em função de características de clima e solo de cada região.

O trabalho objetivou avaliar a resposta do feijão-caupi a inoculação com estirpes de rizóbios, individuais e em mistura, em condições edafoclimáticas do ambiente de Cerrado na região Centro-Oeste, comparando os resultados com as condições do ambiente de Mata Atlântica na região Sudeste.

#### 4.4 MATERIAL E METODOS

Foram conduzidos dois experimentos em condições edafoclimáticas distintas, um em área de Cerrado na região Centro-Oeste, no período da safra e com população rizobiana do solo estabelecida, e o outro em área de Mata Atlântica na região Sudeste, no período da entre safra e em local sem histórico de inoculação, como forma de mostrar a diferença de competitividade e conseqüentemente de desempenho das estirpes rizobianas testadas.

O primeiro experimento, em área com ambiente de Cerrado, foi conduzido na safra 2010/2011 e a área tem histórico de inoculação em soja nos últimos dez anos. O experimento foi instalado no campo área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril (Figura 9), em Sinop- MT, com manejo em sistema de plantio direto, sem irrigação. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico (SANTOS et al., 2006) e a área tem elevação de 368 m, e está localizada nas coordenadas 11° 51' 29" S e 55° 36' 1,6" O. O clima da região é do tipo Aw, segundo a classificação de Köppen, com médias de temperaturas em torno de 25°C. Nos meses de junho a setembro é a estação da seca, enquanto que dezembro a março é a estação úmida; o período de outubro a novembro e de abril a maio é considerado de transição, entre seca-úmida e úmida-seca, respectivamente.



**Figura 9.** Experimento de feijão-caupi na área de Cerrado (Sinop-MT) no campo experimental da Embrapa Agrossilvipastoril.

O segundo ensaio foi instalado em área com o ambiente de Mata Atlântica sem histórico de inoculação. Foi conduzido em 2012 na área experimental do Centro Integrado de Educação Rural- CEIER (Figura 10), no município de Vila Pavão-ES. O preparo do solo para semeadura foi feito com aração, gradagem e sulcamento, sendo utilizada irrigação no primeiro mês do experimento (100 mm). O solo foi classificado como Latossolo Amarelo Distrófico (SANTOS et al., 2006), e a área se localiza em elevação de 179 m, nas coordenadas 18° 37' 54" S e 40° 36' 39" O. O clima da região é do tipo Aw, segundo a classificação de Köppen, com médias de temperaturas em torno de 23°C. Nos meses de maio, junho, agosto e setembro é a estação da seca, enquanto que novembro a janeiro é a estação úmida; o período de fevereiro a abril e nos meses de julho e outubro é considerado de transição, parcialmente seca.



**Figura 10.** Experimento na área com ambiente de Mata Atlântica (Vila Pavão-ES) no CEIER/ES.

Para ambos os experimentos foi avaliada a população de rizóbios no solo, pela técnica do número mais provável (NMP), com a infecção em plantas de feijão-caupi (BRS Guariba). As plantas foram cultivadas em vasos de Leonard com substrato de areia: vermiculita (2:1) esterilizado em autoclave. Semanalmente cada vaso recebeu 250 mL da solução nutritiva de Norris (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994) e as plantas foram coletadas aos 35 DAE. O inóculo preparado, a partir da diluição seriada de amostras de cada classe de solo foi feito de acordo com metodologia de Andrade & Hamakawa (1994). Para a estimativa do número de células bacterianas capaz de nodular o feijão-caupi utilizou-se a tabela de número mais provável (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994) para a obtenção do fator NMP.

A análise de fertilidade do solo antes do plantio na área foi realizada em amostra composta, em cinco pontos de coleta (amostra simples) em zig zag na profundidade de 0 a 20 cm para os dois experimentos, conforme a metodologia da Embrapa (CLAESSEN, 1997). Os resultados são apresentados na Tabela 9, assim como, a análise granulométrica, os dados médios de precipitação e temperatura durante os meses de condução dos experimentos.

**Tabela 9.** Análise da fertilidade, textura do solo e precipitação pluvial dos Experimentos na área de Cerrado (Sinop-MT) e em Mata Atlântica (Vila Pavão-ES).

pH	Al	Ca	Mg	M.O.	P	K	Textura			<sup>1</sup> Precipitação/ Temperatura
							Areia	Silte	Argila	
H <sub>2</sub> O	---cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ---			g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	-----g kg <sup>-1</sup> -----				
Cerrado (Sinop- MT)										Dez
5,2	0,17	1,88	0,40	34,9	6,7	72	750	10	240	Precipitação (mm)
Temperatura média compensada (média mensal em °C)										Jan
Mata Atlântica (Vila Pavão- ES)										Fev
6,5	0,0	3,29	1,40	21,4	10,6	210	730	10	260	Precipitação (mm)
Temperatura média compensada (média mensal em °C)										Jun
										Jul
										Ago
										21
										21
										21

<sup>1</sup>Dados de precipitação de acordo com INMET. M. O. (matéria orgânica).

Nos dois experimentos de campo foram testadas as estirpes recomendadas pelo MAPA para inoculantes comerciais, quais sejam a BR 3267, BR 3262, INPA 03-11 (BR 3301) e a UFLA 03-84 (BR 3302); uma quinta estirpe (BR 3299) em processo de recomendação, e mais um tratamento com as cinco estirpes juntas denominado de mistura foram também inseridos. Além destes, o tratamento sem inoculação e sem N (população nativa) e o tratamento sem

inoculação e com a dose de 70 kg N ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia (45% de N), que é o recomendado para experimentos de campo (BRASIL, 2011). A adubação no tratamento com a dose de N foi feita no plantio e no início da floração (aproximadamente 20-25 dias após a emergência das plantas), na proporção de ¼ do total de N na primeira aplicação e o restante na segunda. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com 4 (quatro) repetições. Cada parcela com tamanho de 24 m<sup>2</sup> (4 m x 6 m) contendo 8 (oito) linhas de plantio e com distância de 1,5 metros entre parcelas.

Os inoculantes utilizados em ambos os experimentos apresentaram concentração da ordem de 10<sup>9</sup> Ufc g<sup>-1</sup>, sendo aplicado no experimento na área em ambiente de Cerrado o inoculante com veículo polimérico IPC 2.2 (SILVA JÚNIOR et al., 2012) e na área em ambiente de Mata Atlântica inoculante com veículo turfoso. Nos dois experimentos a densidade de células rizobianas por semente na inoculação foi de 1,2 x 10<sup>6</sup> Ufc semente<sup>-1</sup> e a população de plantas da cultivar BRS Guariba com densidade de 180.000 plantas ha<sup>-1</sup>.

As variáveis analisadas foram: massa seca dos nódulos (mg planta<sup>-1</sup>), massa seca de raiz (g planta<sup>-1</sup>), massa seca da parte aérea (g planta<sup>-1</sup>), acúmulo de nitrogênio na parte aérea-ANPA (mg planta<sup>-1</sup>), produtividade de grãos secos (13% de umidade), acúmulo de nitrogênio nos grãos (kg/ha), eficiência relativa da parte aérea - EfRPA (%), eficiência relativa do nódulo - EfRN (%) e razão nodular- RN (mg nódulo/ mg nitrogênio). A nodulação foi avaliada a partir de cinco plantas coletadas 30-35 dias após a emergência. A massa dos nódulos secos e a matéria seca foram avaliadas após secagem em estufa de circulação forçada a 65°C até massa constante. Os teores de nitrogênio total na parte aérea e no grão foram determinados pelo método Kjeldhal (LIAO, 1981).

Sendo que:

$$\text{ANPA} = \text{MPAS} \times \text{TNPA}/100$$

$$\text{EfRPA} (\%) = [(\text{MPAS}_{\text{tratamento inoculado}} / \text{MPAS}_{\text{tratamento positivo}}) \times 100]$$

$$\text{EfRN} (\%) = (\text{NAPA}_{\text{tratamento inoculado}} / \text{MSN}) \times 100$$

$$\text{RN} = 1 / (\text{NAPA}_{\text{tratamento inoculado}} / \text{MSN})$$

Os dados foram analisados através do programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008), sendo realizada a análise de variância pelo teste F, a 5% de probabilidade e comparação das médias através do teste de teste T de Student (LSD), ao nível de probabilidade de 0,05.

## 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios realizados em campo os resultados de nodulação confirmaram que na área em ambiente de Cerrado, comumente cultivada com soja, existe uma população estabelecida de rizóbios no solo (MENDES et al., 2004), que é capaz de nodular o feijão-caupi (ZILLI et al., 2011), pois foi obtido mais de 100 mg de nódulos no tratamento sem inoculação (população nativa). Por outro lado, em área em ambiente de Mata Atlântica, sem histórico de inoculação, todos os tratamentos apresentaram uma nodulação abaixo de 100 mg (Tabela 10). Fato este confirmado pela técnica do número mais provável (NMP), onde na área de cerrado o solo apresentava uma alta população de rizóbios capaz de nodular o feijão-caupi com  $3,4 \times 10^6$  rizóbios/g de solo, enquanto que na área em ambiente de Mata Atlântica, sem histórico de inoculação pelo NMP a densidade do solo era de apenas  $2,4 \times 10^2$  rizóbios/g de solo. Possivelmente na área em ambiente de Mata Atlântica a densidade de rizóbios do solo capaz de nodular o feijão-caupi refere-se à população nativa do solo, enquanto que na área de em ambiente Cerrado está densidade foi alterada pelos anos seguidos de inoculação da soja.

Na área em ambiente de Cerrado a inoculação com a BR 3299 proporcionou a maior massa de nódulos, que foi superior a os controles sem inoculação (população nativa) e adubado ( com N-  $70 \text{ kg ha}^{-1}$ ). A segunda maior nodulação foi com a estirpe BR 3267, seguida da mistura de estirpes em valores absolutos (Tabela 10). Já na área em ambiente de Mata Atlântica a maior nodulação foi obtida com a mistura de estirpes, seguida da BR 3299, BR 3267 e BR 3262, onde estas foram superiores a nodulação do controle adubado (com N-  $70 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Corroborando com Gualter et al. (2011), que também constatou que a BR 3299 apresentou maior massa de nódulos secos na região de Pré-Amazônia maranhense.

**Tabela 10.** Massa de nódulos secos e de raiz seca de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba).

Tratamento	Nódulos secos ( $\text{mg planta}^{-1}$ )		Raiz seca ( $\text{mg planta}^{-1}$ )	
	-----35 dias após a emergência-----			
	Área de cerrado	Área de Mata Atlântica	Área de cerrado	Área de Mata Atlântica
População Nativa	130Ba	28BAa	522BAa	751BAa
C/N- $70 \text{ kg ha}^{-1}$	149Ba	2Bb	593Aa	776BAa
BR 3267	221BAa	83Aa	423Bb	789Aa
BR 3262	176BAa	73Aa	568BAa	547Ba
INPA 03-11B (BR 3301)	145BAa	28BAb	438BAb	682BAa
UFLA 03-84 (BR 3302)	176BAa	49BAb	458BAa	625BAa
BR 3299	279Aa	86Aa	474BAa	757BAa
Mistura de Estirpes	207BAa	92Aa	494BAa	718BAa
CV%	22,79*	59,47*	10,94*	19,43

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si, enquanto que letras minúsculas na linha não diferem entre si, pelo teste T de Student (LSD), a 5% de probabilidade. \*Dados transformados com raiz quadrada ( $Y + 1,0$ ).

Na área em ambiente de Mata Atlântica onde foi conduzido o experimento é incomum a presença do nitrogênio mineral, diferente do ambiente de Cerrado, conseqüentemente a população nativa foi sensível a presença do nitrogênio mineral, pois a nodulação da população nativa sem o nitrogênio mineral foi de 28 mg, enquanto na presença passou para 1,8mg (Tabela 10), provocando a inibição da nodulação (SOARES et al., 2014). Outro fato

observado é que a inoculação da estirpe INPA 03-11B (BR 3301) proporcionou a menor nodulação em valores absolutos em ambos os experimentos. Ao contrário dos resultados obtidos por Soares et al. (2006), ao avaliarem a eficiência agrônômica e a diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões-MG, que obtiveram com a estirpe INPA 03-11B (BR 3301) a maior nodulação das plantas de feijão-caupi. Assim como em Costa et al. (2011), em Bom Jesus, Piauí, que também obtiveram em valores absolutos a maior nodulação proporcionada por esta estirpe.

Zilli et al. (2009) testaram exatamente estas cinco estirpes, sem a mistura, em experimentos conduzidos em área de Cerrado em Roraima, mostrando que apenas a estirpe BR 3262, no ano de 2005, proporcionou massa de nódulos superior ao controle, enquanto em 2006 não houve diferença entre os tratamentos. Ao passo que, Chagas Júnior et al. (2010) em Gurupi, TO, testaram todas as estirpes recomendadas e obtiveram as maiores massas de nódulos com as estirpes UFLA 03-84 (BR 3302), INPA 03-11 (BR 3301) e a BR 3262. Isto mostra que o desempenho das estirpes pode mudar de região para região, enfatizando a importância de estudos que avaliem o desempenho das estirpes em cada região.

Exemplo na variação da resposta com a inoculação das estirpes recomendadas está no trabalho de Marinho et al. (2014), onde três das quatro cultivares estudadas obtiveram uma nodulação similar entre as plantas inoculadas com as estirpes recomendadas e as não inoculadas para a localidade de Mandacaru (Juazeiro-BA), enquanto que na localidade de Bebedouro (Petrolina, PE) três destas quatro cultivares mostram diferenças na nodulação.

Com relação à massa de raiz, no experimento na área em ambiente de Cerrado o tratamento adubado apresentou a maior massa de raiz, mas foi superior somente ao tratamento inoculado com a BR 3267. Entretanto no experimento na área em ambiente de Mata Atlântica a maior massa de raiz foi obtida com a inoculação da BR 3267, que foi superior a BR 3262 (Tabela 10). Ainda nota-se que todos os tratamentos do experimento da área em ambiente de Mata Atlântica apresentaram massa de raiz em valores absolutos acima do experimento da área em ambiente de Cerrado, exceto na inoculação com a BR 3262.

Na massa da parte aérea, não há diferença estatística entre os tratamentos em ambos os experimentos, mas fica evidente que nos dois casos a maior massa da parte aérea em valores absolutos foi obtida com o tratamento adubado com nitrogênio (Tabela 11). Corroborando com Costa et al. (2011), onde as estirpes INPA 03-11B (BR 3301), UFLA 3-84 (BR 3302) e a BR 3267 foram similares ao controle negativo e as duas últimas estirpes foram inferiores ao controle positivo (com N- 70 kg ha<sup>-1</sup>). Borges et al. (2012) também obtiveram massa da parte aérea similar nas plantas não inoculadas comparado com as inoculadas e utilizando as estirpes recomendadas. Assim como, Ferreira et al. (2013) observaram que a testemunha (sem inoculação) proporcionou massa da parte aérea similar a inoculação com a estirpe BR 3262. Porém, Zilli et al. (2009) testaram estas mesmas cinco estirpes e observaram que a estirpe BR 3262 proporcionou massa da parte aérea seca significativamente superior ao controle e a estirpe BR 3299 na área de cerrado em 2005 e na média geral de dois anos, já a estirpe BR 3262 proporcionou massa seca da parte aérea superior ao controle.

Para o acúmulo de nitrogênio na parte aérea, no experimento na área em ambiente de Cerrado também não foi observada diferença entre os tratamentos, mas assim como na parte aérea o maior acúmulo em valores absolutos foi obtido com tratamento adubado, enquanto que na área em ambiente de Mata Atlântica, o tratamento adubado foi superior à inoculação com a BR 3262 (Tabela 11). Tanto para a massa da parte aérea, quanto para o acúmulo de nitrogênio na parte aérea todos os tratamentos da área de Mata Atlântica foram superiores estatisticamente ao da área de Cerrado, fato este, que é justificado pela época de realização do experimento, que foi em meses com temperaturas mais baixas (Tabela 9), que estimula o crescimento vegetativo da planta e conseqüentemente acúmulo de nitrogênio (Tabela 11).

**Tabela 11.** Massa da parte aérea seca (caule, ramos e folhas) e nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba).

Tratamento	Parte aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )		N acumulado parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )	
	-----35 dias após a emergência-----			
	Área de Cerrado	Área de Mata Atlântica	Área de Cerrado	Área de Mata Atlântica
População Nativa	3,9Ab	6,9Aa	146 Ab	283 BAa
C/N- 70 kg ha <sup>-1</sup>	4,4Ab	7,7Aa	162 Ab	331 Aa
BR 3267	3,2Ab	7,3Aa	117 Ab	300 BAa
BR 3262	4,3Ab	6,0Aa	152 Ab	231 Ba
INPA 03-11B (BR 3301)	3,9 Ab	6,8 Aa	139 Ab	286 BAa
UFLA 03-84 (BR 3302)	3,5 Ab	6,8 Aa	119 Ab	277 BAa
BR 3299	3,5 Ab	6,7 Aa	132 Ab	266 BAa
Mistura de Estirpes	4,3 Ab	7,0 Aa	146 Ab	287 BAa
CV%	22,43	19,12	22,61	18,50

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si, enquanto que letras minúsculas na linha não diferem entre si, pelo teste T de Student (LSD), a 5% de probabilidade.

O crescimento radicular pode ser usado para explicar a constante massa da parte aérea dos tratamentos independente da nodulação. No experimento na área de Mata Atlântica o controle sem inoculação (população nativa) obteve baixa nodulação, ao passo que a BR 3262 obteve o dobro de nodulação, porém o controle (população nativa) apresentou massa da parte aérea numericamente acima da BR 3262, que pode ter relação com a massa de raiz, pois o tratamento com a BR 3262 proporcionou a menor massa de raiz entre todos os tratamentos. Assim a planta tenderia a compensar a falta de nodulação com o crescimento de raiz, adquirindo nitrogênio na solução do solo.

A produtividade na cultura do feijão-caupi é o parâmetro mais importante a ser avaliado, em função da finalidade de produção de grãos da cultura. No experimento em área de Cerrado a inoculação com a mistura de estirpes proporcionou a maior produtividade, sendo superior à os controles sem inoculação (população nativa) e adubado (com N-- 70 kg ha<sup>-1</sup>), enquanto que a inoculação com a BR 3262 e a INPA 03-11B (BR 3301) foram superiores somente ao controle sem inoculação (Tabela 12). Estes resultados comprovam que nestas áreas com alta população nativa de rizóbios, a inoculação com a mistura de estirpes pode ser uma estratégia de competição para aumentar a eficiência da FBN. Tecnologia que está sendo usada para a cana de açúcar (SCHULTZ et al., 2012). Também conforme Saraiva et al. (2008) que encontraram para a inoculação com o consórcio das estirpes UFRPE – NFB 6156 + NFB 700 o maior rendimento de grãos de feijão-caupi.

A estirpe INPA 03-11B (BR 3301), que apresentou a segunda maior produtividade na área de Cerrado, comprova os resultados de outros trabalhos (COSTA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2010; LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006), que mostraram a eficiência simbiótica da cepa INPA 03 11B (BR 3301) quanto ao rendimento de grãos. Por outro lado, Chagas Júnior et al. (2010) avaliaram as mesmas cinco estirpes deste estudo no Cerrado de Gurupi, TO, e observaram que a estirpe UFLA 03-84 (BR 3302) proporcionou os melhores resultados para as três cultivares de feijão-caupi, nos três experimentos, semelhante ao tratamento adubado com nitrogênio. A BR 3262 apresentou a terceira maior produtividade, e foi recentemente recomendada para a inoculação do feijão-caupi, com resultados expressivos de produtividade, chegando a rendimento de grãos superior a 2300 kg

ha<sup>-1</sup>, em estudo em condições de campo em área de Cerrado da região Norte (ZILLI et al., 2009).

**Tabela 12.** Rendimento de grãos e nitrogênio acumulado nos grãos de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba).

Tratamento	Rendimento de grãos (kg ha <sup>-1</sup> )		N acumulado nos grãos (kg ha <sup>-1</sup> )	
	-----70 dias após a emergência-----			
	Área de Cerrado	Área de Mata Atlântica	Área de Cerrado	Área de Mata Atlântica
População Nativa	1145Ca	750Ba	44Ba	30Ba
C/N- 70 kg ha <sup>-1</sup>	1221CBa	1150Aa	46Ba	46Aa
BR 3267	1375CBAAa	1322Aa	52BAa	53Aa
BR 3262	1442BAa	1119Ab	53BAa	46Aa
INPA 03-11B (BR 3301)	1458BAa	1039Aa	53BAa	42Aa
UFLA 03-84 (BR 3302)	1318CBAAa	1077Aa	49Ba	42Aa
BR 3299	1427CBAAa	1235Aa	52BAa	49Aa
Mistura de Estirpes	1609Aa	1241Aa	61Aa	48Aa
CV%	14,69	17,49	15,78	17,83

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si, enquanto que letras minúsculas na linha não diferem entre si, pelo teste T de Student (LSD), a 5% de probabilidade.

Marinho et al. (2014) observaram em estudo na localidade de Mandacaru (Juazeiro-BA), que a UFLA03-84 (BR 3302) proporcionou o maior rendimento de grãos em valores absolutos em duas cultivares, a BR 3299 em uma e a BR 3267 em outra; enquanto que na localidade de Bebedouro (Petrolina, PE), a BR 3262 proporcionou o maior rendimento em duas variedades, a INPA03-11B (BR 3301) em uma e a BR 3267 em outra. Resumidamente uma estirpe pode ser melhor que a outra quando muda à localidade ou a variedade, desta forma dificultando a recomendação específica de uma determinada estirpe para a inoculação.

No ensaio na área em ambiente de Mata Atlântica, todos os tratamentos inoculados e o tratamento adubado (com N- 70 kg ha<sup>-1</sup>) foram superiores ao controle sem inoculação (população nativa), tendo a maior produtividade com a inoculação com a BR 3267, seguida da mistura de estirpes e da BR 3299 (Tabela 12). Nesta área com baixa população de rizóbios nativos nota-se que a inoculação com a estirpe BR 3267 promoveu uma simbiose eficiente, possibilitando rendimento de grãos em valores absolutos acima da mistura de estirpes, que neste caso indica, que a inoculação com a mistura de estirpes pode ser uma estratégia válida para as áreas de alta densidade de rizóbios estabelecida no solo.

Na comparação dos tratamentos quanto ao rendimento de grãos entre os experimentos, todos os tratamentos da área em ambiente de Cerrado em valores absolutos foram maiores que os da área em ambiente de Mata Atlântica, porém apenas o tratamento inoculado com a BR 3262 foi superior estatisticamente (Tabela 12). Com relação ao nitrogênio acumulado nos grãos, na área em ambiente de Cerrado a mistura apresentou o maior acúmulo, sendo superior à os controles sem inoculação (População nativa) e o adubado (C/N 70 kg ha<sup>-1</sup>), com também a UFLA 03-84 (BR 3302) (Tabela 12). Já na área em ambiente de Mata Atlântica, o tratamento controle sem inoculação ficou abaixo dos demais e o maior valor para o acúmulo de N foi obtido na inoculação com a BR 3267, seguido da BR 3299 e da mistura de estirpes (Tabela 12).

No experimento em área em ambiente de Mata Atlântica observa-se que a nodulação promovida pelas estirpes nativas não foi capaz de promover simbiose eficiente, tendo rendimento de grãos abaixo de 1000 kg ha<sup>-1</sup>. Quando comparado com o rendimento

proporcionado com a inoculação da BR 3267, o controle sem inoculação (população nativa) obteve um rendimento de mais 500 kg ha<sup>-1</sup> abaixo (Tabela 12). Na área em ambiente de Cerrado mesmo o tratamento sem inoculação (população nativa) obtendo uma alta produtividade, tem-se que todos os tratamentos inoculados apresentaram, em valores absolutos, produtividade acima dos controles sem inoculação (população nativa) e o tratamento adubado (com N- 70 kg ha<sup>-1</sup>).

É importante salientar que na área em ambiente de Cerrado o nitrogênio não é um fator limitante, pois mesmo com adição do nitrogênio mineral, o acréscimo foi de cerca de 70 kg ha<sup>-1</sup>, ao passo que na área em ambiente de Mata Atlântica o acréscimo chegou a 400 kg ha<sup>-1</sup> (Tabela 12). O que sugere que na área em ambiente de Cerrado a população nativa promove uma simbiose mais eficiente que na área em ambiente de Mata Atlântica. Porém, em ambas as condições a inoculação mostrou ser uma prática agrícola fundamental para o aumento da produção de grãos, sem o uso de adubo mineral nitrogenado.

Com relação ao nitrogênio acumulado nos grãos, na área em ambiente de Cerrado a mistura apresentou o maior acúmulo, sendo superior aos controles sem inoculação e o adubado, com também a UFLA 03-84/BR 3302 (Tabela 13). Já na área em ambiente de Mata Atlântica, o tratamento controle sem inoculação ficou abaixo dos demais e o maior acúmulo foi obtido com o tratamento adubado, seguido da BR 3299 e a mistura de estirpes (Tabela 12).

**Tabela 13.** Eficiência relativa da parte aérea e eficiência relativa do nódulo de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba).

Tratamento	Efi. Relativa da parte aérea (%)		Efi. relativa do nódulo(%)	
	Área de Cerrado	Área de Mata Atlântica	Área de Cerrado	Área de Mata Atlântica
	-----35 dias após a emergência-----			
População Nativa	89Aa	89Aa	143Aa	4451CBAa
C/N- 70 kg ha <sup>-1</sup>	100Aa	100Aa	171Aa	12968Aa
BR 3267	72Aa	94Aa	66Ca	1938CBAa
BR 3262	98Aa	77Ab	164BAa	1146Ca
INPA 03-11B (BR 3301)	88Aa	87Aa	105CBAa	13770BAa
UFLA 03-84 (BR 3302)	79Aa	88Aa	96CBAa	1542CBa
BR 3299	79Aa	86Aa	70CBa	1032Ca
Mistura de Estirpes	96Aa	91Aa	91CBAa	483Ca
CV%	22,43	9,68*	24,14*	84,25*

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si, enquanto que letras minúsculas na linha não diferem entre si, pelo teste T de Student (LSD), a 5% de probabilidade. \*Dados transformados para raiz quadrada (Y + 1,0).

Os tratamentos não diferiram quanto à eficiência relativa da parte aérea, em ambos os experimentos (Tabela 13). O mesmo foi observado por Gualter et al. (2011), em que as estirpes INPA 03-11B (BR 3301) mais a BR 3262 e a BR 3299 não diferiram dos controles adubado e sem inoculação quanto a eficiência relativa. Na área em ambiente de Cerrado se destacaram a BR 3262 (98%) e a mistura de estirpes (96%), que atingiram uma eficiência próxima aos 100% do controle positivo (com N- 70 kg ha<sup>-1</sup>), enquanto que na área em ambiente de Mata Atlântica se destacou a BR 3267 com 94% e, mais uma vez, a mistura de estirpes com 91% (Tabela 14). Na comparação entre experimentos, a estirpe BR 3267 obteve em valores absolutos a menor eficiência no experimento em área em ambiente de Cerrado (72%) e a maior na área em ambiente de Mata Atlântica (94%), ao passo que a BR 3262, que obteve a maior eficiência na área de Cerrado (98%), obteve a menor na área em ambiente de

Mata Atlântica (77%). Zilli et al. (2009), em estudo em área de cerrado e mata alterada em Roraima, observaram que para a efetividade da FBN em relação a parte aérea, apenas as estirpes BR 3267 e BR 3262 apresentaram valores relativos superiores a 100%.

E ambos os experimentos o controle sem inoculação (população nativa) obteve a mesma eficiência em valores absolutos (Tabela 13), mesmo com as plantas do ensaio na área em ambiente de Cerrado tendo uma alta nodulação em comparação com área em ambiente de Mata Atlântica. Estes dados mostram que a avaliação da eficiência relativa da parte aérea pode levar a interpretação enganosa, pois considera o crescimento parte aérea em função dos benefícios da simbiose e, conforme mostrado, o crescimento radicular pode alterar esta relação, com a absorção do nitrogênio que já existe no solo e que é, desta forma, também assimilado pela planta.

Também no estudo de Gualter et al. (2011), as estirpes INPA 03-11B (BR 3301) mais a BR 3262 e a BR 3299 não diferiram dos controles adubado e sem inoculação quanto a eficiência relativa. Zilli et al. (2009) observaram que na efetividade na FBN em relação a parte aérea, apenas as estirpes BR 3267 e BR 3262 apresentaram valores relativos superiores a 100%. Os autores observaram que a estirpe BR 3267 foi significativamente superior à estirpe BR 3299 e o valor obtido com a BR 3262 foi superior a todas as estirpes, exceto para a BR 3267.

Os parâmetros eficiência dos nódulos e razão nodular (Tabelas 13 e 14), usados anteriormente em casa de vegetação, não se mostraram adequados no campo, pois levaram a interpretação de que todo o nitrogênio na planta é proveniente da nodulação. Como pode ser visto pelo tratamento nitrogenado, que mostra alta eficiência relativa dos nódulos e baixa razão nodular, isso porque no campo este tratamento acaba sendo nodulado por estirpes nativas, assim se obtêm uma relação direta, considerando que o nitrogênio obtido seja destes nódulos. Este fato não pode ser comprovado e o mais provável é que este nitrogênio não seja oriundo da FBN e sim da adubação.

**Tabela 14.** Razão nodular de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba).

Tratamento	Razão nodular (mg/mg)	
	-----35 dias após a emergência-----	
	Área de Cerrado	Área de Mata Atlântica
População Nativa	0,8Ab	0,1BAa
C/N- 70 kg ha <sup>-1</sup>	0,9Ab	0,01Aa
BR 3267	1,6CBa	0,3BAa
BR 3262	1,2BAa	0,3BAa
INPA 03-11B (BR 3301)	1,1BAb	0,1BAa
UFLA 03-84 (BR 3302)	1,5CBAb	0,2BAa
BR 3299	2,4Ca	0,3Ba
Mistura de Estirpes	1,5CBaa	0,3Ba
CV%	13,16*	8,55*

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si, enquanto que letras minúsculas na linha não diferem entre si, pelo teste T de Student (LSD), a 5% de probabilidade. \*Dados transformados para raiz quadrada (Y + 1,0).

Uma eficiência de 89% no tratamento sem inoculação (população nativa) em ambos os experimentos, pode ser devido ao crescimento radicular e conseqüentemente a maior absorção de nutrientes. Assim a eficiência relativa da parte aérea não pode ser associada somente ao efeito favorável da estirpe usada na inoculação. Apesar do desenvolvimento vegetativo das plantas estar ligado ao aporte de nitrogênio, esse nutriente pode estar no solo originado de outras fontes, sendo absorvido pelas raízes e assimilado pela planta.

## 4.6 CONCLUSÕES

A nodulação foi influenciada pela população de rizóbios estabelecida no solo; pois em ambas as áreas as maiores nodulações foram obtidas com a inoculação da mistura de estirpes, BR 3267 e a BR 3299. No entanto, no ensaio em área em ambiente de Cerrado estas estirpes proporcionaram valores acima de 200 mg, enquanto que no ensaio na área em ambiente de Mata Atlântica estes foram inferiores a 100 mg.

No ambiente de Cerrado, com alta população de rizóbios estabelecida no solo da área de estudo, a inoculação com a mistura de estirpes proporcionou o maior rendimento de grãos ( $1609 \text{ kg ha}^{-1}$ ), inclusive superior ao tratamento que recebeu a dose de  $70 \text{ kg ha}^{-1}$  de nitrogênio. Esse resultado aponta que está pode ser uma estratégia de inoculação para estas áreas.

Para a área em ambiente de Mata Atlântica, com baixa população de rizóbios estabelecida no solo, a inoculação com a estirpe BR 3267 proporcionou o maior rendimento de grãos ( $1322 \text{ kg ha}^{-1}$ ), seguida da mistura de estirpes ( $1241 \text{ kg ha}^{-1}$ ), ambas sendo superiores ao controle (população nativa). Porém neste ambiente de baixa competitividade a inoculação com a estirpe individual mostrou-se eficiente e suficiente.

## **5 CAPÍTULO III**

### **QUANTIFICAÇÃO DA FBN NA CULTURA DO FEIJÃO-CAUPI EM CAMPO NA SAFRINHA NO CENTRO-OESTE**

## 5.1 RESUMO

Estudos têm quantificado a FBN em feijão-caupi utilizando a técnica da abundância natural do isótopo de nitrogênio  $^{15}\text{N}$ , no Brasil os estudos que avaliaram a contribuição da FBN utilizando a técnica da abundância natural do isótopo de nitrogênio  $^{15}\text{N}$ , observaram que a inoculação possibilitou a entrada de quase todo o nitrogênio exportado, porém ainda os trabalhos são tímidos e insuficientes para estabelecer um padrão para a cultura, principalmente se tratando da região Centro-Oeste, onde a cultura está em crescimento. Desta forma o objetivo deste trabalho foi quantificar a FBN em campo na cultura do feijão-caupi no período de safrinha da região Centro-Oeste. Foram realizados dois experimentos na safrinha em 2013, em Sinop e Primavera do Leste, ambos no Mato Grosso. Foi utilizado delineamento de blocos ao caso, com quatro repetições, sendo as sementes inoculadas com as estirpes BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B (BR 3301), UFLA 03-84 (BR 33302), e BR 3299; a mistura das cinco estirpes; e dois controles (adubado com  $70 \text{ kg N ha}^{-1}$  e sem inoculação; e sem adubação e inoculação). Foram utilizadas duas plantas de referência (feijão não nodulante e o pé de galinha nome científico) para a quantificação da FBN, sendo a primeira plantada na mesma data do feijão-caupi e a segunda se encontrava na área de forma espontânea. As plantas não inoculadas apresentaram alta nodulação, devido a população nativa estabelecida no solo em ambos os ensaios; porém, a massa da parte aérea aos 50 DAE proporcionada pela população nativa ficou abaixo das estirpes inoculadas nos dois experimentos. Nos dois ensaios todas as plantas inoculadas apresentaram diluição isotópica, quando comparadas as plantas de referência, pela técnica da abundância natural de delta  $^{15}\text{N}$ . A inoculação com a estirpe BR 3262 na safrinha no Mato Grosso proporcionou um rendimento de grãos superior ao controle (população nativa) e a inoculação com a estirpe BR 3299 em Primavera do Leste. Já em Sinop a inoculação com esta estirpe obteve a maior produtividade, sendo superior a inoculação com a BR 3267, a BR 3301 e a BR 3302. A estirpe BR 3262 também proporcionou o maior acúmulo de nitrogênio entre as estirpes inoculadas, em ambos os experimentos. A estirpe BR 3262 contribuiu para a entrada de nitrogênio no sistema via FBN superior a proporcionada pelo controle (população nativa) nos dois ensaios, em Sinop e Primavera do Leste, proporcionando  $64$  e  $71 \text{ kg ha}^{-1}$  de N fixado, respectivamente.

**Palavras-chave:** Abundância Natural  $^{15}\text{N}$ . Contribuição da FBN. Estirpes.

## 5.2 ABSTRACT

Studies have quantified the BNF in cowpea using the technique of natural abundance of  $^{15}\text{N}$  nitrogen isotope, in Brazil studies evaluating the contribution of BNF using the technique of natural abundance of  $^{15}\text{N}$  nitrogen isotope, observed that inoculation possibilited entry nearly all nitrogen exported, even though the works are timid and insufficient to establish a standard for the culture, especially when dealing in the Midwest region, where the crop is growing. Thus the aim of this study was to quantify in BNF field in the cowpea culture in the off-season period of the Midwest. The objective of this study was to quantify BNF field in cowpea crop in the off-season period of the Midwest. Two experiments were performed in the off-season in 2013, one in Sinop-MT and the other in Primavera do Leste-MT. We used a completely randomized block case, four replications, with the seeds inoculated with strains BR 3267; BR 3262; INPA 03-11B (BR 3301); UFLA 03-84 (BR 33302); BR 3299; the mixture of the five strains together, and two controls (fertilized with  $70 \text{ kg N ha}^{-1}$  and without inoculation; without fertilization and inoculation). Were used two of the reference plants (beans not nodulating and foot of hen) for the quantification of FBN, the first planted on the same date of cowpea and the second was in the area spontaneously. The non-inoculated plants showed high nodulation, the native population established in the soil in both trials, but the shoot mass at 50 DAE provided by the native population was below the strains inoculated in both experiments. In both trials all inoculated plant showed isotopic dilution, compared the reference plants for the natural abundance of  $^{15}\text{N}$  delta. Inoculation with the BR 3262 strain in the second crop in Mato Grosso provided a yield higher than the control grains (native population), inoculation with strain BR 3299 in Primavera do Leste, while in Sinop inoculation with this strain had the highest productivity, being superior inoculation with BR 3267, INPA 03-11B (BR 3301) and UFLA 03-84 (BR 33302). BR 3262 strain also resulted in the highest accumulation of nitrogen between the strains inoculated in both experiments. Since the BR 3262 strain contributed to a nitrogen entering the system via the top FBN provided by the control (native population) in both tests in Sinop-MT and Primavera do Leste-MT, providing  $64$  and  $71 \text{ kg ha}^{-1}$  of N fixed respectively.

**Key words:**  $^{15}\text{N}$  natural abundance. Contribution of BNF. Strains.

### 5.3 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão-caupi está em processo de expansão para o cerrado da região Centro-Oeste do Brasil, sendo cultivada com maior ênfase no estado do Mato Grosso. O feijão-caupi está sendo plantado nestas áreas do Cerrado com cultivo tecnificado na safrinha com o plantio direto, sendo cultivado nos meses de fevereiro, março, abril e maio, logo após a saída do milho ou da soja (ZILLI et al., 2011), substituindo áreas que seriam de milho, algodão ou da própria soja de safrinha. Esta cultura vem sendo plantada como a primeira cultura na reforma de pastagens. Hoje, o uso de inoculantes de rizóbios na cultura do feijão-caupi é difundido como tecnologia relevante no ambiente de Cerrado do Centro-Oeste; porém é possível estimar que mais de 50% da área cultivada ainda não faz uso dessa prática. Junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Mapa (BRASIL, 2011) existem quatro estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para produção de inoculantes comerciais para feijão-caupi: UFLA 03-84= BR 3302 (SEMIA 6461), INPA 03-11B= BR 3301 (SEMIA 6463), BR 3267 (SEMIA 6462) e BR 3262 (SEMIA 6464); sendo que as estirpes BR 3267 e BR 3262 são as mais comercializadas pelas indústrias.

No estado do Mato Grosso a cultura do feijão-caupi tem mais de 150.000 ha plantados (BONCHILA, comunicação pessoal), confirmando a informação de que o estado do Mato Grosso tem plantado toda a sua segunda safra de feijão com feijão-caupi, o que correspondeu na safra de 2011/2012 a 152,1 mil ha plantados (CONAB). Estas lavouras são conduzidas com diferentes patamares tecnológicos, quanto ao uso de adubos, pesticidas, maquinários, irrigação, cultivares e inoculantes, gerando diferentes níveis de produtividade, que variam de 200 kg ha<sup>-1</sup> até 2000 kg ha<sup>-1</sup> de grãos de feijão-caupi (SILVA JÚNIOR, 2012).

Entre as razões para o avanço do cultivo de feijão-caupi no Cerrado destacam-se a baixa exigência hídrica (BERTINE et al., 2009), a precocidade, a baixa exigência nutricional comparada a outras culturas (SAMPAIO & BRASIL, 2009), o baixo custo de produção e o aumento da demanda do mercado consumidor. A cultura exige entre 250 e 500 mm de água para completar o ciclo, que varia de 60 a 80 dias após a emergência (EMBRAPA, 2003), sendo que no Cerrado da região Centro-Oeste a precipitação varia de 800 a 2000 mm anuais.

Baseado em dados econômicos obtidos de produtores estima-se que custo de produção da cultura no Centro-Oeste está em torno de R\$ 700,00 a R\$ 800,00 por hectare. Levando em consideração a produtividade média de 1000 kg ha<sup>-1</sup> (20 sacas por hectare) e o preço de venda em média de R\$ 100,00 por saca, culminaria em saldo superior a R\$ 1000,00 por hectare. Hoje o feijão-caupi é comercializado como grãos e sementes, com variação de preço de R\$ 40,00 a R\$ 200,00 por saca. Em muitos casos, se têm grãos sendo comercializados como sementes, em função da demanda, porém, a variação do preço também depende, em muito, da qualidade e da variedade da semente. Esta evolução na qualidade das sementes faz com que o feijão-caupi já tenha alcançado as primeiras vendas para exportação.

Poucos são os estudos avaliando a quantificação da FBN em feijão-caupi em campo no Brasil (BODDEY et al., 1990; FREITAS et al., 2012; ALCANTARA et al., 2014). Os próprios trabalhos de seleção de estirpes não mensuram a contribuição da FBN na cultura (MARTINS et al., 2003; LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; ZILLI et al., 2006). Porém estima-se que a contribuição da FBN na cultura está na ordem de US\$ 13 milhões, somente para a região Nordeste brasileira (RUMJANEK et al., 2005).

Alguns estudos têm quantificado a FBN em feijão-caupi utilizando a técnica da abundância natural do isótopo de nitrogênio <sup>15</sup>N, principalmente no continente africano (BELANE & DAKORA 2010; 2011; BELANE et al., 2011; 2014). No Brasil, Silva Júnior (2012) e Alcantara et al. (2014) avaliaram a contribuição da FBN utilizando a técnica da

abundância natural do isótopo de nitrogênio  $^{15}\text{N}$ , onde Silva Júnior (2012) observou que a inoculação possibilitou a entrada de quase todo o nitrogênio exportado, tendo a estirpe BR 3262 fixado 80% do N exportado. Brito et al. (2009), também utilizando a abundância natural delta  $^{15}\text{N}$  em vasos, observaram que a partir dos 31 dias o feijão-caupi já tinha atingindo valor de FBN acima dos 70%. Com nitrogênio marcado, em campo e no semi-árido, FREITAS et al. (2012) observaram que uma variedade de feijão-caupi obteve aos 80 dias 79% do nitrogênio oriundo da fixação biológica, o que correspondeu a entrada no sistema de 45 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio por via simbiótica. Entretanto, Boddey et al. (1990), no primeiro estudo que quantificou a FBN em feijão-caupi fazendo uso de nitrogênio marcado no Brasil, em ensaio em Brasília observaram que aproximadamente 70% no N da cultura era oriundo da FBN, enquanto que no ensaio do Rio de Janeiro apenas 30% foi devido a FBN.

A estabilização da cultura do feijão-caupi no Centro-Oeste depende da sua crescente produtividade com o menor custo de produção, para tal a FBN deve contribuir com a entrada de nitrogênio necessária para a produção da cultura, ou seja, sem balanço negativo de nitrogênio no sistema. Assim o objetivo deste trabalho foi quantificar a FBN em condições de campo na cultura do feijão-caupi no período de safrinha da região Centro-Oeste, para que se possa estimar a contribuição da simbiose e a resposta da FBN a inoculação.

## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos no período da safrinha no ambiente de Cerrado na região Centro-Oeste, no Estado de Mato Grosso, um em área comumente cultivada com soja nos últimos dez anos, em Sinop, e o outro em Primavera do Leste, em área que ficou oito anos com pastagem, seguida do plantio da soja na última safra 2012/2013.

O ensaio na área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril (Figura 11), em Sinop-MT, foi instalado em um Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico (SANTOS et al., 2006), com manejo sem uso de irrigação, e em área com elevação de 373 m, localizada nas coordenadas 11° 51' 54" S e 55° 36' 1,8" O.



**Figura 11.** Experimento de feijão-caupi (30 DAE) no período da safrinha na área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril (Sinop-MT).

O outro ensaio e foi realizado na fazenda “Iberê”, em Primavera do Leste-MT (Figura 12), foi instalado em um Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico (SANTOS et al., 2006), com manejo sem uso de irrigação, e em área com elevação de 579 m, localizada nas coordenadas 15° 17' 65" S e 54° 11' 3,7" O.



**Figura 12.** Experimento de feijão-caupi (30 DAE) no período da safrinha na fazenda “Iberê” (Primavera do Leste- MT).

A análise de fertilidade do solo antes do plantio na área foi realizada em amostra composta, em cinco pontos de coleta (amostra simples) em zig zag na profundidade de 0 a 20 cm para os dois experimentos, conforme a metodologia da Embrapa (CLAESSEN, 1997). Os resultados são apresentados na Tabela 15, assim como os dados de granulometria e precipitação ocorrida durante os meses de condução dos experimentos.

**Tabela 15.** Análise da fertilidade e granulometria do solo e precipitação pluvial da camada de 0-20 cm nas áreas dos experimentos na safrinha, em Sinop-MT e Primavera do Leste-MT.

pH	Al	Ca	Mg	M.O.	P	K	Textura			<sup>1</sup> Precipitação/ Temperatura				
							Areia	Silte	Argila	Mar	Abr	Mai		
H <sub>2</sub> O	---cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ---			g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	-----g kg <sup>-1</sup> -----								
Sinop-MT														
5,2	0,18	1,15	0,54	33,6	10,2	80	740	10	250	270	210	1		
Temperatura média compensada (média mensal em °C)												30	31	32
Primavera do Leste-MT														
5,0	0,42	0,90	0,63	24,5	5,7	35	790	10	200	260	100	1		
Temperatura média compensada (média mensal em °C)												30	30	31

<sup>1</sup>Dados de precipitação de acordo com INMET. M. O. (matéria orgânica).

Para ambos os experimentos foi avaliada a população de rizóbios no solo pela técnica do número mais provável (NMP), com a infecção em plantas de feijão-caupi (BRS guariba). As plantas foram cultivadas em vasos de Leonard com substrato de areia: vermiculita (2:1) esterilizado em autoclave. Semanalmente cada vaso recebeu 250 mL da solução nutritiva de

Norris (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994) e as plantas foram coletadas aos 35 DAE. O inóculo foi preparado a partir da diluição seriada de amostras de solo cada área e de acordo com metodologia de Andrade & Hamakawa (1994). Para a estimativa do número de células bacterianas capaz de nodular o feijão-caupi utilizou-se a tabela de número mais provável (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994) para a obtenção do fator NMP.

Os dois experimentos seguiram o mesmo modelo, sendo testadas as estirpes recomendadas pelo MAPA para inoculantes comerciais: BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B (BR 3301), UFLA 03-84 (BR 33302), uma quinta estirpe BR 3299, em processo de recomendação, e mais um tratamento com as cinco estirpes juntas denominado de mistura. Foram incluídos os tratamentos sem inoculante e sem N (testemunha absoluta) e a testemunha com a dose de N (70 kg ureia ha<sup>-1</sup>) recomendada para a cultura. A adubação nitrogenada foi feita no plantio e no início da floração (aproximadamente 20-25 dias após a emergência das plantas), na proporção de ¼ do total de N na primeira administração e o restante na segunda. A fonte de N utilizada foi a uréia (45% de N).

O delineamento foi em blocos ao acaso, com 4 repetições, com parcelas contendo 8 linhas de plantio tendo cada parcela 4x6 metros (com distância de 1,5 metros entre parcelas). Nos ensaios foram plantadas no mesmo momento do experimento sementes de feijão não nodulante- NORH 54 (*Phaseolus vulgaris*), para serem usadas como plantas de referência para estimar o <sup>15</sup>N no solo, o que é necessário para a quantificação da FBN pela técnica da abundância natural do <sup>15</sup>N. Também foram coletadas como referência plantas da gramínea pé-de-galinha (*Eleusine indica*), que ocorria na área de forma espontânea.

As variáveis analisadas foram: massa seca dos nódulos (mg planta<sup>-1</sup>), matéria seca da parte aérea (mg planta<sup>-1</sup>), N-total na parte aérea, abundância natural de <sup>15</sup>N, N-total nos grãos, produtividade de grãos secos (13% de umidade), acúmulo de nitrogênio nos grãos (kg ha<sup>-1</sup>) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea- ANPA (mg planta<sup>-1</sup>). A nodulação foi avaliada a partir de cinco plantas coletadas 30-35 dias após a emergência, a massa dos nódulos secos e a matéria seca foram analisadas após secagem em estufa de circulação forçada a 65°C até massa constante. Determinaram-se, também, os teores de N total na parte aérea e no grão pelo método Kjeldahl (LIAO, 1981).

Para a quantificação da FBN as plantas foram coletadas aos 50 DAE, secas a 65°C em estufa de circulação forçada até massa constante, moídas e analisadas quanto à abundância natural do isótopo <sup>15</sup>N (OKITO et al., 2004) por espectrômetro de massa de razão isotópica, modelo Delta Plus (Finnigan MAT, Bremen, Germany) no “Laboratório John Day de Isótopos Estáveis” da Embrapa Agrobiologia.

A composição do isótopo <sup>15</sup>N foi mensurada através da diferença do número de átomos de <sup>15</sup>N para <sup>14</sup>N, usando a atmosfera como padrão de acordo (JUNK e SVEC 1958; MARIOTTI et al., 1981):

$$\delta^{15}\text{N} (\%) = \frac{[^{15}\text{N}/^{14}\text{N}]_{\text{amostra}} - [^{15}\text{N}/^{14}\text{N}]_{\text{padrão}}}{[^{15}\text{N}/^{14}\text{N}]_{\text{padrão}}} \times 1000$$

Para o cálculo da estimativa da FBN por meio da abundância natural utilizou-se a seguinte expressão %Ndfa de SHEARER e KOHL (1986):

$$\% \text{Ndfa} = 100 \frac{100 ((\delta^{15}\text{N ref}) - (\delta^{15}\text{N planta fixadora}))}{(\delta^{15}\text{N ref} - B_{\text{pa}})}$$

$^{15}\text{N}_{\text{ref}}$  – Valor de  $\delta^{15}\text{N}$  do solo obtido através de plantas não fixadoras (referência), sendo utilizadas como plantas de referência o feijão não nodulante NORH 54 (*Phaseolus vulgaris*) e o pé-de-galinha (*Eleusine indica*).

$\delta^{15}\text{N}$  planta fixadora – Valor de  $\delta^{15}\text{N}$  da planta fixadora de  $\text{N}_2$  (feijão-caupi);

$\text{B}_{\text{pa}}$  – Valor do  $\delta^{15}\text{N}$  do nitrogênio derivado da FBN, sendo o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  da parte aérea da leguminosa crescida totalmente dependente da FBN.

Para este trabalho foi usado o valor  $\text{B}_{\text{pa}}$  de  $\delta^{15}\text{N}$  para a parte aérea de feijão-caupi presente na literatura de -1,66‰ (BODDEY et al., 2000).

Também foi estimada a quantidade de nitrogênio na parte aérea oriunda da FBN, de acordo com SHEARER E KOHL 1986; MASKEY et al., 2001:

**N derivado FBN na parte aérea (mg planta<sup>-1</sup>)** = (%Ndfa / 100) x N acumulado massa seca parte aérea).

**N fixado kg ha<sup>-1</sup>** = N derivado FBN (kg planta<sup>-1</sup>) x população plantas ha<sup>-1</sup>(180.000)

Os dados foram analisados no programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008), com análise de variância pelo teste F, a 5% de probabilidade e a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de 0,05.

## 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação com as estirpes no ensaio em Sinop-MT apresentou massa de nódulos similar entre si e não havendo diferença com a nodulação proporcionada pela população nativa, assim como também observado para a variável massa da parte aérea aos 35 DAE (Tabela 16). Como esperado as plantas que não tiveram as sementes inoculadas no plantio obtiveram alta nodulação com a população estabelecida, pois a área apresentava alta densidade de rizóbios capaz de nodular o feijão-caupi, identificada pela técnica do número mais provável NMP, que resultou em densidade de  $3,4 \times 10^7$  rizóbios/ g solo. Possivelmente os 10 anos consecutivos de cultivo de soja na área foram responsáveis pela estabilização da alta população no solo, proporcionada pela inoculação da soja durante estes anos, mas também é possível que parte seja da própria população nativa da área.

**Tabela 16.** Massa seca de nódulos e massa seca da parte aérea (caule, ramos e folhas) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 35 dias após emergência na safrinha/2013 em duas localidades do Mato Grosso (Sinop e Primavera do Leste).

Tratamento	Nódulos secos (mg planta <sup>-1</sup> )		Parte aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )	
	Sinop	Primavera do Leste	Sinop	Primavera do Leste
População Nativa	205A	224BA	2,3A	5,1A
C/N- 70 kg ha <sup>-1</sup>	159A	109C	2,3A	4,6A
BR 3267	153A	207BA	2,3A	4,4A
BR 3262	283A	199BA	2,3A	4,1A
INPA 03-11B (BR 3301)	230A	252A	3,1A	4,6A
UFLA 03-84 (BR 3302)	148A	215BA	2,0A	4,5A
BR 3299	191A	148CB	2,3A	4,9A
Mistura de Estirpes	206A	217A	2,2A	3,8A
CV%	27,06*	*13,95	11,07*	19,20

Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste T de Student (LSD), a 5% de probabilidade. \*Dados transformados para raiz quadrada (Y + 1,0).

No ensaio em Primavera do Leste-MT a maior nodulação foi obtida pela estirpe INPA 03-11B (BR 3301) e a mistura de estirpes, que foram superiores a nodulação das plantas que não foram inoculadas e receberam adubação nitrogenada, assim como também a nodulação da BR 3299 (Tabela 16). Semelhante ao observado na área anterior, mesmo o plantio do feijão-caupi sendo realizado em uma área com apenas o último cultivo de soja (safra 2012/2013), posterior a 8 (oito) anos de pastagem, a população de rizóbios do solo capaz de nodular feijão-caupi pela técnica do NMP apresentou densidade de  $3,4 \times 10^4$  rizóbios/ g solo. Nesta área o feijão-caupi foi plantado logo após a saída da soja, que foi inoculada. Assim, neste caso, a maior parte da população presente provavelmente foi oriunda da inoculação da soja.

A possível presença das estirpes usadas no inoculante da soja na população do solo, pela inoculação da soja nas áreas de estudo, corrobora resultados de Zilli et al. (2013), que no cerrado de Roraima concluíram que o número de cultivos de soja inoculada eleva a densidade de rizóbios no solo. Em casa de vegetação Zilli et al. (2011) observaram que as estirpes recomendadas para soja obtiveram número de nódulos similar as estirpes recomendadas para

feijão-caupi, indicando a capacidade destas em nodular feijão-caupi. Porém, as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (CPAC 7 e CPAC 15) e a estirpe de *B. elkanii* BR 29, quando avaliada a eficiência nodular, ficaram abaixo das estirpes recomendadas para o caupi (BR 3262 e BR 3267), mas a estirpe de *B. elkanii* SEMIA 587 foi similar às estirpes de feijão-caupi.

No trabalho de Chagas Júnior et al. (2010), em área de Cerrado em Tocantins, é possível observar que, nas três cultivares testadas, a nodulação proporcionada pela testemunha (população nativa) foi baixa. Possivelmente nestas áreas de expansão da fronteira agrícola no Cerrado ainda não se tenha uma alta população de rizóbios, oriunda da inoculação da soja ou mesmo já estabelecida no solo. Por outro lado, em ensaio em área de Cerrado em Roraima (fronteira agrícola mais antiga), Zilli et al. (2009) apontam que o controle (população nativa) no ensaio de 2006 proporcionou a nodulação similar as estirpes recomendadas.

Não foi observada diferença na massa da parte aérea aos 35 DAE, tanto em Sinop-MT quanto em Primavera do Leste-MT (Tabela 16). Este fato é comum em feijão-caupi, como já evidenciado em outros trabalhos (ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; BORGES et al., 2012; FERREIRA et al., 2013), em avaliações realizadas por volta de 35 DAE. Como mostrado no Capítulo I a curva de crescimento vegetativo do feijão-caupi pouco alterou ao longo do ciclo, quando comparada às plantas inoculadas com o controle sem inoculação. Assim, como confirmado no Capítulo I pela quantificação da FBN aos 30 DAE a simbiose não está em sua máxima eficiência, para suprir a planta com maior demanda de nitrogênio.

Contudo, aos 50 DAE em Sinop-MT, mesmo com a alta nodulação proporcionada pela população nativa esta não se refletiu em massa da parte aérea, sendo em valores absolutos a menor massa da parte aérea (Tabela 17). A estirpe BR 3262 proporcionou a maior massa de nódulos em valores absolutos, conseqüentemente possibilitou a maior massa da parte aérea (50 DAE), sendo esta superior estatisticamente ao valor de massa da parte aérea das plantas noduladas pela população nativa, a BR 3267, a BR 3302 e a BR 3299 (Tabela 17). Assim como observado em Sinop-MT, aos 50 DAE, a massa da parte aérea da população nativa foi a menor em Primavera do Leste-MT, sendo inferior a massa proporcionada pela inoculação com a BR 3299, que foi a maior massa da parte aérea entre todos os tratamentos (Tabela 17).

O maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea em Sinop-MT foi proporcionado pela inoculação com as estirpes BR 3262, INPA 03-11B (BR 3301) e a mistura de estirpes, que foram superiores ao nitrogênio acumulado pela nodulação com a população nativa e a BR 3267. Em Primavera do Leste-MT, mesmo com a alta nodulação da população nativa, o acúmulo de nitrogênio total na parte aérea foi inferior aos demais tratamentos com 50 DAE (Tabela 17). Um fato interessante é que em valores absolutos, no experimento de Sinop-MT a inoculação com a BR 3267 apresentou o menor acúmulo de nitrogênio entre as estirpes inoculadas; em contraponto, no experimento em Primavera do Leste-MT, a BR 3267 proporcionou o maior acúmulo de nitrogênio total na parte aérea (Tabela 17). Como a inoculação foi realizada com o mesmo lote de produção do inoculante, a estirpe estava nas mesmas condições nos dois ensaios.

A estirpe com a melhor eficiência simbiótica pode ser considerada como a que possibilita o maior acúmulo de nitrogênio na planta. Porém, as respostas dos estudos nem sempre são conclusivas, como por exemplo, na região Nordeste (Piauí) com a mesma cultivar (BR 17 Gurguéia), Almeida et al. (2010) não encontraram diferença entre as estirpes recomendadas na inoculação; assim como no experimento de Costa et al. (2011). Enquanto no estudo de Ferreira et al. (2013) a inoculação com a estirpe BR 3267 possibilitou acúmulo de nitrogênio nas plantas de feijão-caupi superior a inoculação com a BR 3262. Contudo, pode-se ressaltar, que em valores absolutos no ensaio de Almeida et al. (2010), o maior acúmulo de nitrogênio nas plantas foi possibilitado pela inoculação com a INPA 03-11B (BR 3301). Portanto, em consonância com a literatura e os dados deste ensaio, pode se afirmar que as

estirpes BR 3262, BR 3267 e INPA 03-11B (BR 3301) apresentam em campo maior capacidade de acúmulo de nitrogênio na planta de feijão-caupi.

**Tabela 17.** Massa seca da parte aérea (caule, ramos e folhas) e nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 50 dias após emergência na safrinha/2013 em duas localidades do Mato Grosso (Sinop e Primavera do Leste).

Tratamento	Parte aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )		N acumulado na parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )	
	Sinop	Primavera do Leste	Sinop	Primavera do Leste
População Nativa	8,7D	15,3C	321B	512B
C/N- 70 kg ha <sup>-1</sup>	10,9DCBA	18,3CBA	445BA	730A
BR 3267	9,0DC	19,3BA	346B	803A
BR 3262	13,7A	18,0CBA	607A	742A
INPA 03-11B (BR 3301)	11,8CBA	18,1CBA	527A	737A
UFLA 03-84 (BR 3302)	9,7DCB	19,6BA	431BA	749A
BR 3299	10,0DCB	20,8A	467BA	797A
Mistura de Estirpes	12,1BA	16,2CB	510A	705A
CV%	8,89*	14,50	12,65*	9,59*

Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste T de Student (LSD), a 5% de probabilidade. \*Dados transformados para raiz quadrada (Y + 1,0).

Diante dos resultados fica claro que as estirpes recomendadas têm maior capacidade de fornecer nitrogênio para a planta e, conseqüentemente, aumentar seu crescimento vegetativo comparado às plantas que são noduladas pela população nativa do solo. Porém, os resultados de quantificação da FBN, usando a abundância natural delta <sup>15</sup>N indicam que a população nativa proporciona uma diluição isotópica similar à inoculação com as estirpes recomendadas (Tabelas 18 e 19).

Alguns trabalhos que usaram a abundância natural delta <sup>15</sup>N para quantificar a FBN em feijão-caupi a campo mostraram que diversos genótipos, mesmo sem inoculação (nodulados pela população nativa do solo) proporcionaram diluição isotópica, com valores de delta <sup>15</sup>N próximos de zero. No estudo de Belane et al. (2011), na África do Sul, dos 32 genótipos estudados em 2005, 28 apresentaram valores delta <sup>15</sup>N abaixo de 1,0, e as plantas de referência valor de 5,03 delta <sup>15</sup>N. Em outro estudo Belane & Dakora (2010), em Ghana, encontrou que dos 30 genótipos 26 apresentaram valores delta <sup>15</sup>N abaixo de 1,0 e as plantas de referência mostraram 7,12 delta <sup>15</sup>N. Entretanto, nestes estudos os solos provavelmente são pobres em nitrogênio, exigindo que a entrada de N na planta seja praticamente toda originada da FBN. Apesar de que no trabalho de Belane & Dakora (2010) não foi informado o teor de N do solo, enquanto Belane et al. (2011) relata valor de 1,3 mg/kg de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato) e de 2,8 mg/kg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (amônio), que são as formas mais absorvidas pelas espécies vegetais (WILLIAMS & MILLER, 2001); em comparação, solos brasileiros, Poletto et al. (2008) observaram ao longo do período experimental no Rio Grande do Sul em um Argissolo Vermelho distrófico típico, valores médios de 10 mg kg<sup>-1</sup> tanto para NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como para NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Na avaliação da quantificação da FBN pela abundância natural delta <sup>15</sup>N em Sinop-MT (Tabela 18), todas as estirpes inoculadas apresentaram diluição isotópica, quando comparadas as plantas de referência, inclusive as plantas noduladas pela população nativa; onde já tinha sido observado a alta nodulação agora observa-se a maior diluição isotópica. Neste ensaio as plantas de referência apresentaram variação nos valores de delta, com o feijão não nodulante NORH 54 (*Phaseolus vulgaris*) com valor de 5,20‰, enquanto que o pé-de-

galinha (*Eleusine indica*) obteve 3,86‰, proveniente da exploração do solo, refletindo a influência das raízes de cada espécie (leguminosa/ gramínea). No estudo de Belane & Dakoro (2009), em Ghana no ensaio realizado em 2005, esta variação aconteceu nas plantas de referência mesmo entre duas gramíneas (arroz e milho), com valores de +5.12‰ e +3.57‰, respectivamente. Entretanto, o feijão não nodulante é a planta de referência mais adequada para quantificar a FBN em feijão-caupi, em virtude da similaridade do sistema radicular e do seu ciclo e, principalmente, da sua incapacidade de realizar FBN, diferente das gramíneas, onde alguns estudos mostram esta capacidade.

A inoculação com as estirpes em Sinop-MT não apresentou diferenças quanto a %Ndfa entre si (Tabela 18), com os maiores valores para as estirpes BR 3262, INPA 03-11B (BR 3301), BR 3299 e a mistura de estirpes, todas com 59% Ndfa. Porém, foram estatisticamente similares ao obtido pela população nativa (63% Ndfa), mas estas proporcionaram FBN superior as plantas que receberam adubação nitrogenada (39% Ndfa).

**Tabela 18.** Delta  $\delta^{15}\text{N}$  (‰), nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio derivado da FBN na parte aérea e nitrogênio fixado ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 50 dias após a emergência na safrinha/2013 em Sinop-MT.

Tratamento	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ndfa(%) <sup>1</sup>	N derivado FBN parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ )	Contribuição da FBN ( $\text{kg ha}^{-1}$ )
-----50 dias após a emergência-----				
População Nativa	0,88a	63a	199dcb	36dcb
BR 3267	1,25a	57a	188dc	34dc
BR 3262	1,11a	59a	356a	64a
INPA 03-11B (BR 3301)	1,13a	59a	321ba	57ba
UFLA 03-84 (BR 3302)	1,32a	56a	245dcba	44dcba
BR 3299	1,15a	59a	272cba	49cba
Mistura de Estirpes	1,40a	55a	272cba	49cba
Planta de Referência $\delta^{15}\text{N}$ (‰)				
Feijão não nodulante NORH 54 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	5,20c			
Pé-de-galinha ( <i>Eleusine indica</i> )	3,86cb			
CV%	20,57	11,05*	16,40*	16,10*

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste T de Student (LSD), a 5% de probabilidade. \*Dados transformados para raiz quadrada ( $Y + 1,0$ ). Valor  $B_{pa} = -1,66\%$

<sup>1</sup>%Ndfa =  $[(\delta^{15}\text{N} \text{ feijão não nodulante} - \delta^{15}\text{N} \text{ planta fixadora}) / (\delta^{15}\text{N} \text{ feijão não nodulante} - (-1,66))] \times 100$

A inoculação com a BR 3262, que proporcionou a maior produtividade do feijão-caupi, possibilitou o maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea derivado da FBN, sendo superior ao proporcionado pela nodulação da população nativa com e sem adubo nitrogenado, assim como também a inoculação com a BR 3267 em Sinop-MT (Tabela 18).

A contribuição da FBN ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) em Sinop-MT, para a densidade populacional de 180.000 plantas  $\text{ha}^{-1}$ , mostra que a inoculação pode proporcionar entrada no sistema de até 64  $\text{kg ha}^{-1}$ , como na BR 3262, que foi superior a contribuição da estirpe BR 3267 (34  $\text{kg ha}^{-1}$ ), a população nativa sem adubo nitrogenado (36  $\text{kg ha}^{-1}$ ) e com adubo nitrogenado (27  $\text{kg ha}^{-1}$ ).

A inoculação com a BR 3301, que possibilitou a segunda maior nodulação e acúmulo total de nitrogênio, mesmo sem alta produtividade, foi responsável em valores absolutos pelo segundo maior acúmulo de N derivado da FBN (321  $\text{mg planta}^{-1}$ ). conseqüentemente resultou na segunda maior entrada de N no sistema com 57  $\text{kg ha}^{-1}$  em Sinop-MT (Tabela 18).

No ensaio em Primavera do Leste o delta  $^{15}\text{N}$  indicou que houve diluição isotópica em todas as plantas de feijão-caupi, quando comparadas às plantas de referência. Porém existe diferença entres os tratamentos, sendo a inoculação com as estirpes INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302) superiores a inoculação com a BR 3299 e a nodulação das plantas que receberam adubação nitrogenada e não foram inoculadas (Tabela 19).

Diferente de Sinop-MT, as plantas de referência no ensaio em Primavera do Leste-MT apresentaram valores de delta elevados, com valor para feijão não nodulante NORH 54 (*Phaseolus vulgaris*) de 9,09‰ e para o pé-de-galinha (*Eleusine indica*) de 6,13‰, ambos dentro da faixa de 5 a 10 deltas indicados para solos brasileiros (ALVES et al., 2003). Para minimizar esta variação e obter valores mais precisos, Belane & Dakoro (2010) utilizaram quatro plantas de referência (milho, sorgo, milho e uma planta espontânea de folha larga), usando o valor médio destas plantas de +7,12‰; valor este próximo da média obtida no ensaio de Primavera do Leste-MT, que foi de +7,61‰. Porém, neste ensaio, foi usado como planta referência o delta do feijão não nodulante, pela similaridade com a planta em estudo (feijão-caupi).

**Tabela 19.** Delta  $\delta^{15}\text{N}$  (‰), nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio derivado da FBN na parte aérea e nitrogênio fixado ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 50 dias após a emergência na safrinha/2013 em Primavera do Leste-MT.

Tratamento	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ndfa(%) <sup>1</sup>	N derivado FBN parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ )	Contribuição da FBN ( $\text{kg ha}^{-1}$ )
-----50 dias após a emergência-----				
População Nativa	3,33ba	53a	269c	48c
BR 3267	3,62cba	51ba	411a	74a
BR 3262	3,34ba	53a	393ba	71ba
INPA 03-11B (BR 3301)	3,16a	55a	406a	73a
UFLA 03-84 (BR 3302)	3,09a	55a	415a	75a
BR 3299	4,46cb	43cb	342cba	61cba
Mistura de Estirpes	3,40ba	52ba	370cba	67cba
Planta de Referência $\delta^{15}\text{N}$ (‰)				
Feijão não nodulante NORH 54 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	9,09e			
Pé-de-galinha ( <i>Eleusine indica</i> )	6,13d			
CV%	7,96*	14,02	10,32*	10,18*

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste T de Student (LSD), a 5% de probabilidade. \*Dados transformados para raiz quadrada ( $Y + 1,0$ ). Valor  $B_{pa} = -1,66\%$

<sup>1</sup>%Ndfa =  $[(\delta^{15}\text{N} \text{ feijão não nodulante} - \delta^{15}\text{N} \text{ planta fixadora}) / (\delta^{15}\text{N} \text{ feijão não nodulante} - (-1,66))] \times 100$

Diferente dos resultados apresnetados no Capítulo I (Tabela 5), a planta de referência pé de galinha apresentou valores de delta distantes do feijão não nodulante, pois em campo esta especie já esta estabelecida. Já no ensaio no Capítulo I, no experimento em vasos, as plantas espontâneas germinaram junto com o feijão não nodulante, que foi plantado no vaso e que foi novamente plantado em campo. Assim na falta do feijão não nodulante plantado na mesma época da especie em estudo, a planta de referência pé de galinha presente de forma espontânea na área, pode ser um opção, apesar de provavelmente substimar o potencial de FBN da leguminosa em estudo.

Quanto à porcentagem da FBN (%Ndfa), as estirpes INPA 03-11B (BR 3301), UFLA 03-84 (BR 3302), BR 3262 e a população nativa foram superiores ao valor de %Ndfa das plantas que receberam adubação nitrogenada e das plantas inoculadas com a BR 3299 (Tabela

19). Ao contrário do experimento anterior, onde a BR 3299 estava entre as estirpes com maiores valores de FBN, tendo obtido 59 %Ndfa, neste experimento ela obteve 43% Ndfa. Já as plantas adubadas com nitrogênio mostraram valores similares, com 39% Ndfa no experimento em Sinop-MT e 40 % Ndfa em Primavera do Leste-MT.

Ao avaliar o acúmulo de nitrogênio derivado da FBN, a BR 3267, diferente do observado em Sinop-MT, junto com a INPA 03-11B (BR 3301) e a UFLA 03-84 (BR 3302) mostrou resultado superior ao acúmulo proporcionado pela nodulação com a população nativa, com e sem adubo nitrogenado (Tabela 19). No experimento em Sinop-MT a BR 3267 contribuiu com acúmulo de N derivado de FBN de apenas 188 mg planta<sup>-1</sup> e em Primavera do Leste-MT observa-se o dobro deste valor, com 411 mg planta<sup>-1</sup>.

Em Primavera do Leste-MT, a inoculação proporcionou entrada no sistema de mais de 70 kg ha<sup>-1</sup> com as estirpes UFLA 03-84 (BR 3302), BR 3267, INPA 03-11B (BR 3301) e a BR 3262 (Tabela 19); porém somente a inoculação com as estirpes UFLA 03-84 (BR 3302), BR 3267, INPA 03-11B (BR 3301) foi superior a contribuição da FBN das plantas noduladas pela população nativa, que proporcionou entrada no sistema de 48 kg ha<sup>-1</sup>, próximo do encontrado no experimento em Sinop-MT (36 kg ha<sup>-1</sup>).

O nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa) em ambos os experimentos (Sinop-MT e Primavera do Leste-MT) proporcionado pela nodulação da população nativa foi similar as estirpes recomendadas. O que corrobora Alcantara et al. (2014), onde com a mesma cultivar deste estudo (BRS Guariba), em Teresina, PI, o controle obteve 69 %Ndfa, também usando a abundância natural <sup>15</sup>N. O que foi praticamente o mesmo valor obtido com a inoculação das estirpes recomendadas: BR 3262, BR 3267, BR 3299 e INPA 03-11B (BR 3301), que corresponderam a 69; 67; 69,5 e 55,5 %Ndfa, respectivamente. Assim como Boddey et al. (1990) com a técnica da diluição isotópica com <sup>15</sup>N marcado também não encontrou diferença entre o N derivado da FBN nas plantas de feijão-caupi inoculada com a estirpe de *Bradyrhizobium* spp. BR 53 e não inoculada.

Este novo cenário na evolução da FBN em feijão-caupi no Brasil, mostrando que a proporção de N na planta via FBN é similar nas plantas inoculadas e não inoculadas (população nativa), traz a seguinte questão - se a proporção de N nas plantas é próxima, o que estaria levando as plantas inoculadas a crescerem e acumular mais nitrogênio. Para esta pergunta são propostas duas hipóteses: a primeira relacionada à eficiência simbiótica das estirpes, a segunda quanto ao potencial das estirpes recomendadas atuarem também como promotoras de crescimento.

A hipótese de eficiência simbiótica está ligada a capacidade fotossintética da planta e a diferenças no gasto de energia. As bactérias nativas do solo no ambiente de Cerrado na região Centro-Oeste, em alta densidade, podem fornecer nitrogênio para a planta na mesma proporção das estirpes recomendadas, porém tem maior gasto de energia para a planta, funcionando assim como dreno dos fotoassimilados e limitando o crescimento da planta. Pois, a taxa de fixação simbiótica de N é proporcional a taxa fotossintética do vegetal (SCHULZE, 2004); como Kaschuk et al. (2012) mostraram em soja que os bacteróides funcionam como dreno para planta o que sinalizaria para planta demanda de aumento da taxa fotossintética. No caso do feijão-caupi, os bacteróides com baixa eficiência simbiótica podem funcionar como dreno acima da capacidade fotossintética da planta. Entretanto, Belane & Dakora (2010: 2011) observaram genótipos de feijão-caupi com altas taxas fotossintéticas, que apresentaram maior biomassa da parte aérea e proporcionaram maior N fixado por via simbiótica na parte aérea, portanto neste caso provavelmente os bacteróides tinham alta eficiência simbiótica.

Ainda dentro da primeira hipótese de eficiência simbiótica ligada a taxa fotossintética, pode se supor que a planta de feijão-caupi ao perceber (sinalização bioquímica) que a simbiose é eficiente tende a aumentar sua taxa fotossintética, tanto para suprir os bacteróides, quanto para ter nitrogênio suficiente para o crescimento. Então sim, este dreno (bacteroide)

estimula o aumento da taxa fotossintética conforme sugerido por Kaschuk et al. (2009; 2012). O que corresponde ao observado por Belane & Dakora (2011), onde os genótipos que mais fixaram nitrogênio via simbiótica, também foram os que apresentaram a maior quantidade de carbono fixado. Porém, no mesmo estudo de Belane & Dakora (2011), os genótipos com maior quantidade de carbono fixada, obtiveram maior quantidade de N total acumulado. Levando a inferir que a planta equilibra fisiologicamente a entrada de nitrogênio do solo (mineral e orgânico) e a via fixação biológica; assim a proporção de N na planta proveniente da FBN é similar entre o proporcionado por uma simbiose eficiente e não eficiente. Contudo, o aumento da taxa fotossintética faz com que a quantidade de N via FBN seja maior na planta, assim como também do N derivado do solo.

O alto custo energético da FBN é estimado em 6 a 12 g de C g<sup>-1</sup> N fixado (PIMENTEL, 1998), chegando os nódulos a consumir 13 a 28% dos fotossintatos totais de leguminosas (VANCE & HEICHEL, 1991). A fixação do CO<sub>2</sub> fornece especialmente malato e succinato para os bacteróides (PRELL & POOLE, 2006) e para a própria assimilação do nitrogênio o oxalo acetato; assim uma baixa taxa fixação de CO<sub>2</sub> reduz a assimilação e transporte de N para a parte aérea (FISCHINGER & SCHULZE et al., 2010). Porém esta alta taxa fotossintética é tornada ainda maior com a sinalização dos bacteróides como dreno, que pode desregular a relação entre o CO<sub>2</sub> usado para o crescimento vegetal e o CO<sub>2</sub> para fornecimento aos bacteróides com baixa eficiência simbiótica na assimilação do nitrogênio.

A segunda hipótese é que estas estirpes recomendadas para feijão-caupi foram selecionadas anteriormente sem a avaliação da quantificação da FBN, e que a seleção foi baseada em aumento de crescimento vegetativo e principalmente na produção de grãos. Neste processo de seleção, junto com a FBN estas estirpes estariam atuando como rizobactérias promotoras de crescimento, o que já foi mostrado em feijão-caupi (SILVA et al., 2006a; ARAUJO et al., 2012; COSTA et al., 2013), e também efeitos sinérgicos e associações com outros microorganismos do solo que aumentam o aproveitamento dos nutrientes do solo (SILVA et al., 2006b; LIMA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012).

Quanto a produção de grãos e o acúmulo de nitrogênio, que são consequências do desenvolvimento da planta e estão relacionados aos aspectos já apontados, no ensaio em Sinop-MT, quando comparado o acúmulo de nitrogênio nos grãos observa-se que a estirpe BR 3262 proporcionou o maior acúmulo, com 58 kg ha<sup>-1</sup>, sendo superior a inoculação com a UFLA 03-84/BR 3302 (Tabela 20). Enquanto que em Primavera do Leste-MT, a inoculação com a mistura de estirpes proporcionou o maior acúmulo de N nos grãos, com 55 kg ha<sup>-1</sup>, sendo superior ao valor obtido pela inoculação com a BR 3299 e a nodulação com a população nativa (Tabela 20).

Em estudo no Piauí, Ferreira et al. (2013) também encontraram o maior acúmulo de nitrogênio nos grãos com a inoculação da estirpe BR 3262, que foi superior ao valor para a inoculação das estirpes INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302). Já Almeida et al. (2010) observaram que apenas a inoculação com a UFLA 03-84 (BR 3302) proporcionou acúmulo de nitrogênio nos grãos inferior a inoculação com as demais estirpes recomendadas. Também no estudo de Costa et al. (2011) a estirpe UFLA 03-84 (BR 3302) proporcionou o menor acúmulo de nitrogênio nos grãos, sendo inferior a inoculação com a INPA 03-11B (BR 3301). Desta forma, nota-se que a UFLA 03-84 (BR 3302), aparentemente, tem menor capacidade de favorecer acúmulo de nitrogênio nos grãos, enquanto que a BR 3262 tem maior capacidade, como mostra o ensaio em Sinop-MT, corroborando Ferreira et al. (2013).

**Tabela 20.** Nitrogênio acumulado nos grãos e produtividade de grãos secos de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 75 dias após emergência na safrinha/2013 em duas localidades do Mato Grosso (Sinop e Primavera do Leste).

Tratamento	N acumulado grãos (kg ha <sup>-1</sup> )		Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )	
	-----75 DAE-----			
	Sinop	Primavera do Leste	Sinop	Primavera do Leste
População Nativa	35BA	44C	856BA	1215CB
C/N- 70 kg ha <sup>-1</sup>	40BA	52CBA	1012BA	1392CBA
BR 3267	27BA	48CBA	660B	1374CBA
BR 3262	58A	55A	1434A	1501A
INPA 03-11B (BR 3301)	26BA	53CBA	683B	1507A
UFLA 03-84 (BR 3302)	25B	47CBA	662B	1312CBA
BR 3299	52BA	43C	1021BA	1138C
Mistura de Estirpes	44BA	54BA	1119BA	1438BA
CV%	27,26*	14,19	25,01*	14,00

Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste T de Student (LSD), a 5% de probabilidade. \*Dados transformados para raiz quadrada (Y + 1,0).

A inoculação com a BR 3262, que proporcionou os maiores valores de nodulação, biomassa e acúmulo de nitrogênio em Sinop-MT, também resultou na maior produtividade, com valor de 1.434 kg ha<sup>-1</sup>, superior a inoculação com a BR 3267, INPA 03-11B (BR 3301) e a UFLA 03-84/BR 3302 (Tabela 20). Nota-se que a inoculação com as estirpes BR 3267 e a UFLA 03-84 (BR 3302), que apresentaram valores de produtividade bem abaixo, aproximadamente 660 kg ha<sup>-1</sup>, sendo inclusive menores que a produtividade com a nodulação pela população nativa, também conduziu aos menores valores de massa seca de nódulos. Por outro lado, a INPA 03-11B (BR 3301), que também apresentou baixa produtividade (683 kg ha<sup>-1</sup>), proporcionou a segunda maior nodulação e acumulação de nitrogênio na parte aérea; porém não se refletiu em aumento da produtividade, e a produtividade foi menor que o controle sem inoculação (População nativa).

Em estudo recente Marinho et al. (2014), com quatro cultivares de feijão-caupi (BRS Punjante, BRS Tapaihum, BRS Carijó e BRS Acauã) em duas localidades da região Nordeste (Mandacaru, Juazeiro-BA e Bebedouro, Petrolina-PE) com as mesmas cinco estirpes deste estudo, observou que entre as estirpes inoculadas a BR 3267 na mesma cultivar (BRS Punjante) proporcionou o maior rendimento na localidade de Mandacaru, Juazeiro-BA. Já em Bebedouro, Petrolina-PE, ela propiciou o menor rendimento, inclusive similar ao controle sem inoculação, como aconteceu no ensaio em Sinop-MT. No mesmo estudo de Marinho et al. (2014), a UFLA 03-84 (BR 3302) proporcionou o maior rendimento de grãos com as cultivares BRS Punjante BRS e BRS Carijó, na localidade de Mandacaru, Juazeiro-BA, diferindo do obtido em Sinop-MT.

Em Sinop-MT a inoculação com a mistura de estirpes proporcionou a segunda maior produtividade (1.119 kg ha<sup>-1</sup>) e assim como a BR 3299 (1.021 kg ha<sup>-1</sup>) apresentaram rendimento de grãos similar às plantas que receberam a adubação nitrogenada (1.012 kg ha<sup>-1</sup>). Ainda, quando comparadas ao controle sem inoculação (população nativa) proporcionaram aproximadamente 260 e 160 kg ha<sup>-1</sup> a mais, respectivamente.

No ensaio realizado em Sinop-MT, no segundo mês de condução do experimento (abril) passou por uma precipitação de 210 mm, enquanto que em Primavera do Leste, manteve dentro da normalidade de 100 mm, possivelmente essa condição adversa afetou o

desempenho das plantas e, conseqüentemente, da simbiose. Nesse caso, a BR 3262, que se mostrou com a melhor eficiência simbiótica, foi capaz de superar estas condições desfavoráveis. O mesmo para a BR 3299, o que têm relação direta com seu possível potencial de sinergismo com outras bactérias do solo. A mistura de estirpes, que é uma pratica usada para superar estas condições, mostrou-se favorável e a produtividade obtida foi acima dos 1.000 kg ha<sup>-1</sup>.

O desempenho da estirpe BR 3262, seguida da BR 3299, corrobora estudo de Zilli et al. (2006), onde em ambiente de Cerrado em Roraima em 2005, a inoculação com a BR 3262 foi superior as estirpes recomendadas (BR 3267; INPA 3-11B/BR 3301 e UFLA 3-84/BR 3302), a exceção da inoculação com a BR 3299. Também em Ferreira et al. (2013), a inoculação com a BR 3262 no Piauí possibilitou maior produtividade, superior ao rendimento do controle e da inoculação com as estirpes INPA 3-11B (BR 3301) e UFLA 3-84 (BR 3302). A inoculação com a BR 3299, no ensaio realizado por Gualter et al. (2011), também resultou nos maiores rendimentos de grãos na região da Pré- Amazônia.

No ensaio conduzido em Primavera do Leste (MT) o maior rendimento foi obtido com a inoculação da INPA 03-11B (BR 3301) e a BR 3262, ambas com cerca de 1.500 kg ha<sup>-1</sup>, onde estas estirpes proporcionaram produtividade superior à obtida com a inoculação da BR 3299 e as plantas noduladas pelas estirpes nativas (Tabela 20). A terceira maior produtividade foi obtida com a mistura de estirpes, com 1.438 kg ha<sup>-1</sup>, que comparada as outras estirpes foi à única inoculação que, em valores absolutos, foi superior ao valor de produtividade das plantas que receberam a adubação nitrogenada (1.392 kg ha<sup>-1</sup>).

Em Sinop-MT, a inoculação com a INPA 03-11B (BR 3301) proporcionou um rendimento de grãos inferior ao obtido com a estirpe BR 3262, enquanto que em Primavera do Leste-MT ela obteve a maior produtividade. Marinho et al. (2014) observou que a INPA 03-11B (BR 3301) proporcionou o menor rendimento de grãos com as cultivares BRS Punjante, BRS Tapaihum e BRS Acauã na localidade de Mandacaru, Juazeiro-BA. Porém na localidade de Bebedouro, Petrolina-PE, a estirpe INPA 03-11B (BR 3301) proporcionou o maior rendimento de grãos nas cultivares BRS Tapaihum e BRS Acauã.

Em Primavera do Leste-MT, mais uma vez nota-se resposta do rendimento de grãos para a inoculação com a BR 3262, assim como nos estudos em outras regiões (ZILLI et al., 2009; FERREIRA et al., 2013). O maior rendimento de grãos proporcionado pela inoculação com a BR 3301, corrobora com o ensaio de Almeida et al. (2010), onde está estirpe apresentou a maior produtividade com cerca de 1.950 kg ha<sup>-1</sup>, que inclusive foi superior ao obtido na inoculação com a estirpe UFLA 03-84 (BR 3302) de 1360 kg ha<sup>-1</sup>.

Apesar de não se tratar de um balanço de nitrogênio propriamente dito, a inoculação com as estirpes BR 3262 e INPA 03-11B (BR 3301), no ensaio em Sinop-MT, possibilitou as maiores entradas de nitrogênio com a FBN ,de 64 e 57 kg ha<sup>-1</sup> de N, respectivamente (Tabela 19), tendo saída pela colheita dos grãos de 58 e 26 kg ha<sup>-1</sup> de N (Tabela 20), assim têm-se o saldo positivo de 6 e 31 kg ha<sup>-1</sup> de N, respectivamente. Enquanto que o controle (população nativa) sem inoculação gerou saldo de apenas 1,0 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Em Primavera do Leste-MT, a entrada de nitrogênio no sistema foi mais expressiva, com as maiores entradas originadas pela inoculação com as estirpes BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302), que corresponderam a contribuição de 74, 71, 73 e 75kg ha<sup>-1</sup>de N, respectivamente ( Tabela 19). Com uma saída de 48, 55, 53 e 47 kg ha<sup>-1</sup> de N (Tabela 21), a inoculação com estas estirpes gerou saldo positivo de aproximadamente 25, 15, 20 e 25 kg ha<sup>-1</sup> de N, respectivamente. Ao passo que o controle (população nativa) sem inoculação gerou saldo de apenas 4,0 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Observa-se que mesmo com as taxas de fixação de nitrogênio (%Ndfa) similares para as estirpes recomendadas pelo MAPA, em ambos os experimentos (Sinop-MT e Primavera do

Leste-MT), as plantas sem inoculação mostraram balanço de nitrogênio praticamente nulo. Desta forma, práticas agrícolas de adubação, alteração na densidade de plantas e o próprio melhoramento genético, considerando a eficiência da FBN, podem aumentar a produtividade da cultura do feijão-caupi, conseqüentemente, aumentando a exportação de nitrogênio nos grãos, o que levaria, provavelmente, a um saldo negativo de nitrogênio no sistema sem a inoculação.

## 5.6 CONCLUSÕES

A inoculação com a estirpe BR 3262 na safrinha no Mato Grosso, em Primavera do Leste proporcionou um rendimento de grãos superior ao controle (população nativa), a inoculação com a estirpe BR 3299; enquanto que em Sinop a inoculação com esta estirpe obteve a maior produtividade, sendo superior a inoculação com as estirpes BR 3267, INPA 03-11B (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302).

Os maiores acúmulos de nitrogênio nos grãos, entre as estirpes inoculadas foram proporcionados pela inoculação com a estirpe BR 3262, em ambos os experimentos na safrinha no Mato Grosso, sendo o valor superior ao proporcionado pela estirpe UFLA 03-84 (BR 3302), em Sinop, e a BR 3299 e ao controle (população nativa) em Primavera do Leste.

A inoculação com a BR 3262 contribuiu para a entrada de nitrogênio no sistema via FBN superior a proporcionada pelo controle (população nativa) nos dois ensaios, Sinop-MT e Primavera do Leste-MT, com contribuição de 64 e 71 kg ha<sup>-1</sup> de N fixado, respectivamente.

A inoculação em Primavera do Leste, independente da estirpe, permitiu balanço positivo de nitrogênio no sistema, com saldo de nitrogênio de aproximadamente 20 kg ha<sup>-1</sup>.

A inoculação com a INPA 03-11B (BR 3301) proporcionou rendimento de grãos inferior à inoculação com a BR 3262 em Sinop, ao passo que, em Primavera do Leste, ela resultou na maior produtividade, superior a proporcionada pela estirpe BR 3299 e o controle (população nativa).

Apesar na alta nodulação proporcionada pela população nativa presente no solo, está resultou em rendimento de grãos abaixo do obtido com a inoculação, mesmo tendo está população nativa uma taxa de FBN similar ao observado nas estirpes inoculadas.

## **6 CAPÍTULO IV**

### **RESPOSTA DO FEIJÃO-CAUPI À INOCULAÇÃO COM DIFERENTES DENSIDADES RIZOBIANAS<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Capítulo foi publicado na forma de artigo na revista PAB (Pesquisa Agropecuária Brasileira).  
Pesq. agropec. bras., Brasília, v.49, n.10, p.804-812, out. 2014.  
DOI: 10.1590/S0100-204X2014001000007

## 6.1 RESUMO

Nos últimos anos o feijão-caupi vem sendo intensamente pesquisado destacando-se estudos voltados ao melhoramento genético, ao manejo da cultura e a fixação biológica de nitrogênio (FBN), este novo processo de desenvolvimento da cultura é devido em grande parte ao seu potencial no agronegócio, assim a FBN torna-se fundamental com fornecimento de N para uma demanda maior, exigindo respostas cada vez mais com a inoculação do feijão-caupi, que tem alcançando mais de 150 mil doses de inoculantes comercializados para a cultura no ano de 2012. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta da cultura do feijão-caupi a diferentes densidades de células rizobianas aplicadas na semente em condições de campo. Foram conduzidos quatro experimentos, dois na região Norte (área já cultivada e área de primeiro cultivo), um na região Centro-Oeste e um na região Sudeste. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com quatro repetições. Os tratamentos foram compostos pelas densidades de células da estirpe BR 3267 ou da estirpe BR 3262 (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 e 2,4 x10<sup>6</sup> UFC por semente), mais o tratamento sem inoculação e com adição de fertilizante nitrogenado (70 kg ha<sup>-1</sup> de N). Foram analisadas as variáveis massa seca dos nódulos, matéria seca da parte aérea e rendimento de grãos secos (13% de umidade) nos quatro experimentos; número de nódulos nos dois ensaios da região Norte (área já cultivada e área de primeiro cultivo) e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos foram avaliados nos experimentos da região Sudeste e Centro-Oeste. A nodulação dos experimentos foi avaliada a partir da coleta de cinco plantas consecutivamente aos 30-35 dias após a emergência na segunda linha. A nodulação na cultura do feijão-caupi respondeu positivamente ao aumento da densidade de células de rizóbios aplicadas nas sementes. Houve aumento linear da nodulação das plantas com o aumento da densidade da inoculação, porém sem resposta na biomassa da parte aérea. O maior rendimento de grãos ocorre na densidade de pelo menos 1,2 x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) por semente.

**Palavras-chave:** *Bradyrhizobium*. *Vigna unguiculata*. Inoculante.

## 6.2 ABSTRACT

In recent years the cowpea has been intensely researched highlighting studies related to genetic improvement, to crop management and biological nitrogen fixation (BNF), this new development process culture of is largely due to its potential in agribusiness, so the BNF is fundamental to supply N to a higher demand, demanding answers increasingly with the inoculation of cowpea, which has reached more than 150 one thousand inoculants doses marketed for culture in 2012. The objective of this study was to evaluate the crop response of cowpea in the different densities of rhizobial cells applied in the seed under field conditions. Four experiments were conducted, two in the region north (area already cultivated area and first crop), one in the region Midwest and the region Southeast. The experimental design was a randomized block with four replications. The treatments consisted of cell densities of strain BR 3267 or of strain BR 3262 (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 and 2,4 x10<sup>6</sup> UFC seed), more treatment without inoculation and with the addition of nitrogen fertilizer (70 kg ha<sup>-1</sup>of N). Were analyzed the variables dry mass of nodules, dry weight of shoots and dry grain yield (13% of moisture) us four experiments; number of nodules in the two trials in the North region (area already cultivated area and first crop) and nitrogen accumulation in shoots and grains were evaluated in the experiments of the region Southeast and Midwest. The nodulation of the experiments was evaluated from the collect of five plants consecutive to 30-35 days after emergence in the second row. The nodulation in the culture of cowpea responded positively to increased cell density of rhizobia applied to the seeds. There was a linear increase in nodulation of plants with increasing density of inoculation, but no response in shoot biomass. The highest grain yield occurs at a density of at least 1.2 x 10<sup>6</sup> colony forming units UFC per seed.

**Key words:***Bradyrhizobium. Vigna unguiculata.*Inoculant.

### 6.3 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão-caupi na região Norte e Nordeste do Brasil tem sido caracterizada como uma cultura de baixo aporte tecnológico o que tem resultado em produtividade de grãos inferior a 400 kg ha<sup>-1</sup> (FREIRE FILHO, 2011). Contudo, nos últimos anos tem sido observada grande expansão da cultura também para o Cerrado da região Centro-Oeste, especialmente para o Estado do Mato Grosso. Nestas áreas o feijão-caupi é cultivado na safrinha com o rendimento de grãos ao redor de 1000 kg ha<sup>-1</sup> (FILGUEIRAS et al., 2009).

Nos últimos anos o feijão-caupi vem sendo intensamente pesquisado destacando-se estudos voltados ao melhoramento genético, ao manejo da cultura e a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Este novo processo de desenvolvimento da cultura é devido em grande parte ao seu potencial no agronegócio. Para a FBN, vários trabalhos de seleção de estirpes (MARTINS et al., 2003; SOARES et al., 2006; ZILLI et al., 2009) e de novos veículos para formulação de inoculantes (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009; SILVA JÚNIOR et al., 2012; FERNANDES JÚNIOR et al., 2012) foram realizados e os seus resultados ajudaram na ampliação da área inoculada com feijão-caupi, alcançando mais de 150 mil doses de inoculantes comercializados para a cultura no ano de 2012 (ANPII- Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculante).

Atualmente quatro estirpes: UFLA 03-84 (SEMIA 6461); INPA 03-11B (SEMIA 6463), BR 3267 (SEMIA 6462) e BR 3262 (SEMIA 6464) são autorizadas para serem utilizadas em inoculantes para a cultura do feijão-caupi (BRASIL, 2011), estando disponíveis no mercado algumas marcas comerciais em veículo turfoso e líquido.

Os primeiros resultados significativos da inoculação do feijão-caupi surgiram com Martins et al. (2003), com a inoculação da cultivar IPA 206 com a estirpe BR 3267 que proporcionou uma produtividade de 693 kg ha<sup>-1</sup>, similar ao tratamento controle com fertilizante nitrogenado. No caso das estirpes INPA 03-11B e UFLA 03-84 quando testadas nas cultivares BR14-Mulato e BR08-Caldeirão proporcionaram rendimento de grãos de 950 e 1.340 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo a produção equivalente à adubação nitrogenada de 70 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N, na forma de uréia (LACERDA et al., 2004). A última estirpe recomendada, BR 3262, foi testada na safra agrícola de Roraima, inoculada em sementes de feijão-caupi cultivar BRS Mazagão, proporcionando rendimentos de grãos superiores a 2.000 kg ha<sup>-1</sup>, que foram cerca de 30% maior que o controle absoluto (ZILLI et al., 2009).

Porém nem sempre os resultados em campo da inoculação são positivos, como por exemplo, em Borges et al. (2012) onde a testemunha (sem inoculação) proporcionou rendimento de grãos superior a inoculação com as estirpes recomendadas, assim como em outros estudos que a testemunha também proporcionou um rendimento de grãos similar as estirpes recomendadas (CHAGAS JUNIOR et al., 2010; COSTA et al., 2011). Isto pode ocorrer em função da baixa fertilidade dos solos, variabilidade entre cultivares (MARINHO ET AL., 2014), baixa especificidade das bactérias nativas do solo para nodulação do feijão-caupi (MARTINS et al., 2003; SILVA et al., 2012), ou porque ainda não se estabeleceu a densidade de células rizobianas ideal a ser aplicada na semente, o que mostra a importância desta definição visando elevar a competitividade das estirpes do inoculante. De acordo com Silva et al. (2012) a densidade rizobiana ideal para a inoculação tende a contribuir para aumento de produtividade, assim como Krasova-Wade et al. (2006) constataram que o uso de uma densidade rizobiana elevada na inoculação é uma forma de aumentar a competitividade das estirpes inoculadas contra a população rizobiana nativa.

Thies et al. (1991) mostraram que a presença de uma população nativa de rizóbios do solo adequada para atender aos requisitos de fixação do N<sub>2</sub> da planta foi a principal razão das

culturas não responderem a inoculação. Enquanto que Soares et al. (2014) observaram que população nativa em estudo proporcionou uma massa da parte aérea similar ao controle com N-fertilizante. Porém, nem sempre a população nativa é eficiente, em Ghana, por exemplo, Pule-Meulenberg et al. (2010) observaram que genótipos de feijão-caupi não inoculado proporcionaram 100 mg de nódulos secos, que possibilitaram rendimentos de grãos diferentes, um genótipo com 252 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto que o outro chegou 686 kg ha<sup>-1</sup>. Já Belane & Dakora (2010) encontraram para plantas de feijão-caupi também não inoculada com 67 dias após o plantio (DAP) variação de 56,2% a 96,3% do nitrogênio oriundo da fixação biológica em função da cultivar. Evidenciando que a população nativa de rizóbios do solo apresenta uma eficiência muito variável, justificando a necessidade da inoculação com densidade ideal.

Silva et al. (2012) observaram que com a elevação da taxa de inóculo houve aumento da nodulação das plantas em condições de casa de vegetação. No entanto, para feijão-caupi ainda não se tem estabelecido uma dose ideal de inoculante para as sementes em condições de campo.

Para a cultura da soja, por outro lado, os resultados de pesquisas indicaram inicialmente densidade de  $0,3 \times 10^6$  UFC semente<sup>-1</sup>, posteriormente de  $0,6 \times 10^6$  UFC semente<sup>-1</sup> e atualmente é recomendada  $1,2 \times 10^6$  UFC semente<sup>-1</sup> (HUNGRIA et al., 2007). O aumento da densidade de células rizobianas por semente tem sido uma estratégia usada inclusive para minimizar os danos da aplicação de fungicidas no tratamento de sementes de soja (CAMPO et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar em condições de campo a resposta da cultura do feijão-caupi em função do aumento da densidade de células rizobianas inoculadas nas sementes.

## 6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados um conjunto de quatro experimentos de campo em condições distintas, um na região Sudeste (Seropédica- RJ), dois experimentos na região Norte (Boa Vista- RR) e outro na região Centro-Oeste (Sinop- MT).

O experimento na região Sudeste foi conduzido na área experimental da Embrapa Agrobiologia (22°45'S, 43°40'W e 26 m de elevação), na safra 2011/2012, em Argissolo Amarelo Distrófico (SANTOS et al., 2006). Os dois experimentos na região Norte foram instalados na área experimental Água Boa da Embrapa Roraima (02°15'00"N e 60°39'54"W), em um Latossolo Amarelo Distrófico (SANTOS et al., 2006), no ano de 2011. Onde as áreas se diferenciaram, pois, uma havia sido cultivada com soja nas últimas duas safras, portanto com população de rizóbios estabelecida, e a outra foi recém-aberta para o cultivo, portanto sem histórico de inoculação. Na região Centro-Oeste o experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril, em um Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico (SANTOS et al., 2006), em área com elevação de 368m (11°51'29"S e 55°36'1,6"W), na safra 2010/2011.

Em todos os experimentos foi utilizada a cultivar BRS Guariba, recomendada para uso em âmbito nacional (FREIRE FILHO, 2011). Quanto a estirpe utilizada na inoculação, na região Norte foi utilizada a estirpe a *Bradyrhizobium* sp. BR 3262 (SEMIA 6464) em veículo turfoso, recomendada para a região (ZILLI et al., 2009), e nas regiões Sudeste e Centro-Oeste foi utilizada a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (SEMIA 6462) em veículo polimérico IPC 2.2 (SILVA JÚNIOR et al., 2012; FERNANDES JÚNIOR et al., 2012), que já proporcionara resultados favoráveis na região Sudeste (SILVA JÚNIOR et al., 2012) e está em teste na região Centro-Oeste.

No experimento na região Sudeste os tratamentos consistiam na inoculação de sementes contendo as concentrações: 0, 0,3, 0,6, 1,2, 1,5 e 2,4 x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) por semente. Para os dois experimentos na região Norte as sementes foram inoculadas com 0, 0,3, 0,6, 1,2, e 2,4 x10<sup>6</sup> UFC por semente. Para a região Centro-Oeste os tratamentos foram otimizados, com a inoculação das sementes com 0, 0,9, 1,2 e 1,5 x10<sup>6</sup> UFC por semente. Em todos os experimentos foi acrescido um tratamento com adubação nitrogenada na dose de 70 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia (45% de N), que é o recomendado para experimentos de campo (BRASIL, 2011), com aplicação na semeadura e no início da floração (aproximadamente 25-30 dias após a emergência das plantas), na proporção de ¼ do total de N na primeira aplicação e o restante na segunda.

A padronização da densidade de UFC por semente na inoculação foi baseada em inoculantes contendo uma ordem 10<sup>9</sup> UFC por grama de inoculante e 5.000 sementes de feijão-caupi por kg conforme recomendação (BRASIL, 2011). Assim, tem-se: Densidade (UFC por semente) = (quantidade de inoculante g ou mL × concentração do inoculante UFC) / número de sementes.

A análise de fertilidade do solo foi realizada em amostra composta, em cinco pontos de coletada (amostra simples) em zig e zag antes da semeadura, na profundidade de 0 a 20 cm, para os quatro experimentos, conforme a metodologia da Embrapa (CLAESSEN,1997), assim como, a análise granulométrica e os dados de precipitação ocorrida durante os meses de condução dos experimentos (Tabela 21).

**Tabela 21.** Análise química e granulométrica do solo da camada de 0 a 20 cm de profundidade dos experimentos conduzidos nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil.

Áreas	pH	Al	Ca	Mg	MO <sup>(3)</sup>	P	K	Granulometria do solo			Precipitação			
								Areia	Silte	Argila				
	H <sub>2</sub> O	-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>		-----g kg <sup>-1</sup> -----				-----mm-----		
Boa Vista- RR												Jul	Ago	Set
1ºcultivo <sup>(1)</sup>	5,4	0,0	0,9	0,30	10,8	26,2	11,7	840	10	150	375,3	308,5	200	
Cultivada <sup>(2)</sup>	5,6	0,0	1,4	0,29	11,7	38,1	31,2	840	10	150				
Sinop- MT												Dez	Jan	Fev
	5,2	0,17	1,88	0,40	34,9	6,71	72	750	10	240	150	390	140	
Seropédica- RJ												Out	Nov	Dez
	5,2	0,08	0,88	0,17	6,5	18,9	32	880	10	110	110	90	120	

<sup>(1)</sup>1º cultivo – área de primeiro cultivo. <sup>(2)</sup>Cultivada – área cultivada com soja. <sup>(3)</sup>MO (matéria orgânica).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com quatro repetições. Os tratamentos foram compostos pelas densidades de células da estirpe BR 3267 ou da estirpe BR 3262 (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 e 2.4 x10<sup>6</sup> UFC por semente), mais o tratamento sem inoculação e com adição de fertilizante nitrogenado (70 kg N ha<sup>-1</sup>). Cada parcela com tamanho de 24 m<sup>2</sup> (4 m x 6 m) conteve oito linhas de semeadura e com distância de 1.5 metros entre parcelas.

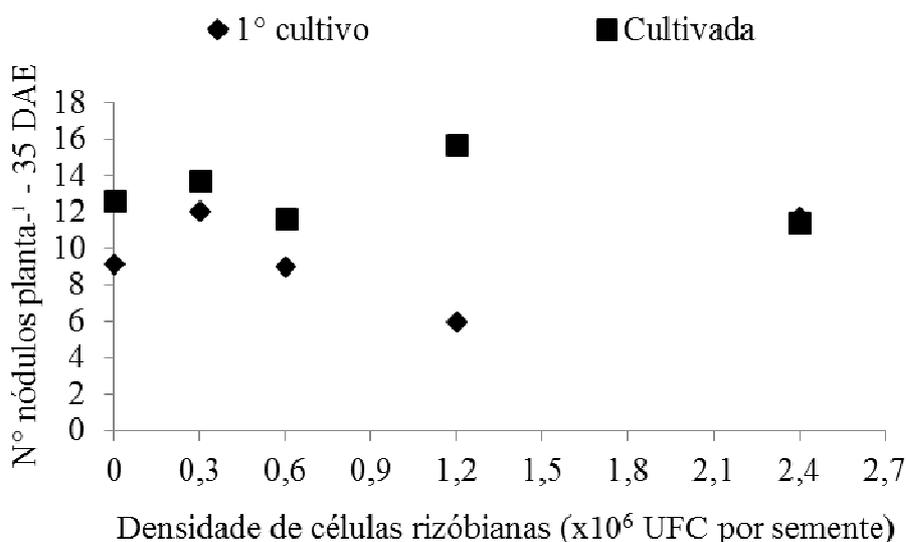
As variáveis analisadas foram: número de nódulos planta<sup>-1</sup> (apenas em Boa Vista-RR), massa seca dos nódulos (mg planta<sup>-1</sup>), matéria seca da parte aérea (mg planta<sup>-1</sup>), produtividade de grãos secos (13% de umidade), acúmulo de nitrogênio nos grãos (kg ha<sup>-1</sup>) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea- ANPA (mg planta<sup>-1</sup>); nos experimentos realizados na região Sudeste (Seropédica-RJ) e na região Centro-Oeste (Sinop-MT). A nodulação dos experimentos foi avaliada a partir de cinco plantas, a massa seca dos nódulos e a matéria seca foram analisadas, após secagem em estufa de circulação forçada com temperatura ajustada a 65°C até massa constante. Os teores de nitrogênio total na parte aérea e no grão foram analisados pelo método Kjeldhal (LIAO, 1981).

Os dados foram submetidos à análise de variância a 10% pelo teste F, com auxílio do programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008). Foram ajustadas equações de regressão linear, quadrática e cúbica significativas para as variáveis: número de nódulos, massa seca de nódulos e de parte aérea; acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos e rendimento de grãos secos em função do aumento da densidade de células rizobianas inoculadas nas sementes. Para a variável rendimento de grãos secos foi utilizado o teste t (LSD), a 5% de probabilidade após análise de variância, como o intuito de comparar a produtividade das plantas inoculadas com as que receberam a adubação nitrogenada.

## 6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois experimentos da região Norte foi mensurado o número de nódulos, mas em ambos os ensaios não foram ajustadas curvas de regressão significativas (Figura 13). O número de nódulos é um parâmetro com ampla variabilidade, sendo indicado nos estudos de FBN o uso da massa seca de nódulos, pois possibilita maior praticidade, menor variabilidade espacial e temporal, e principalmente apresenta a melhor correlação com o desempenho simbiótico (DÖBEREINER, 1966; BOHRER & HUNGRIA, 1998; HUNGRIA & BOHRER, 2000; SOUZA et al., 2008). E os próprios estudos de Hungria & Bohrer, 2000 e Souza et al., 2008, ressaltam que em solos com população estabelecida de rizóbio, entre o número de nódulos e massa seca de nódulos, somente um dos dois parâmetros é necessário de ser avaliado, sendo preferível optar pela massa seca de nódulos.

A nodulação no tratamento sem inoculação ( $0 \times 10^6$  UFC por semente) na área de primeiro cultivo é menor que na área já cultivada, conforme o esperado, porém os dois experimentos não apresentaram uma equação significativa (Figura 13). Na área de primeiro cultivo o maior número de nódulos é obtido com a inoculação com  $0.6$  e  $2.4 \times 10^6$  UFC por semente, enquanto que na área cultivada, a inoculação com  $1.2 \times 10^6$  UFC por semente proporcionou o maior número de nódulos.

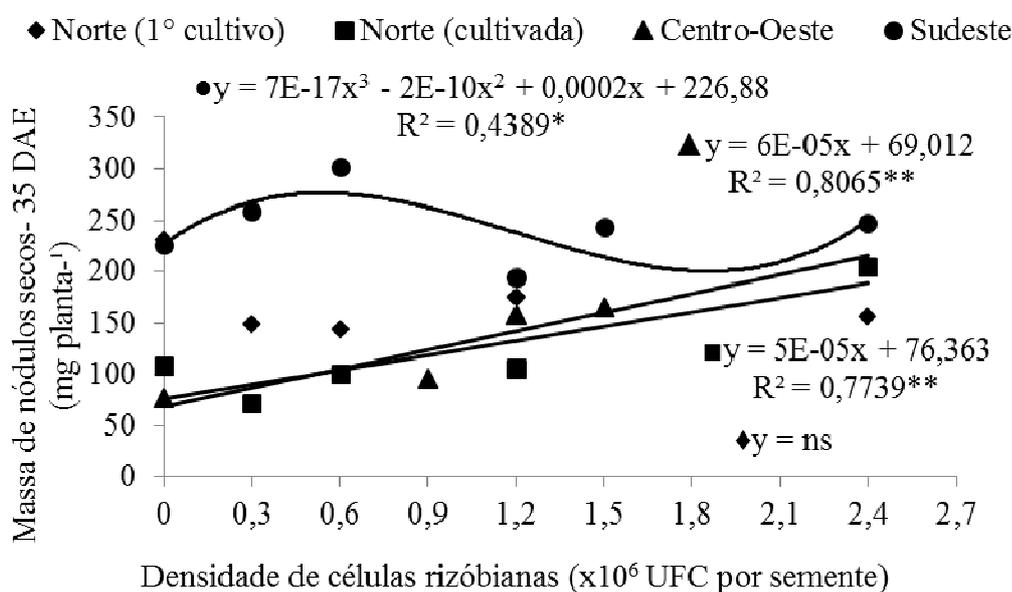


**Figura 13.** Número de nódulos por planta de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) “BRS Guariba”, 35 dias após emergência, em resposta a diferentes densidades de células rizóbicas aplicadas por semente na região Norte, em área de primeiro cultivo e em área já cultivada, ambas em Boa Vista- RR. <sup>ns</sup>Não significativo.

Foram encontradas equações de regressão significativas para a massa seca de nódulos em função do aumento da densidade de células de rizóbios aplicadas nas sementes (Figura 15), corroborando com Silva et al. (2012), exceto na área de primeiro cultivo da região Norte, que não se ajustou a nenhuma regressão, porém neste mesmo experimento a melhor resposta a inoculação para essa variável foi na densidade de  $1.2 \times 10^6$  UFC por semente (Figura 14). A área que já havia recebido cultivos anteriores da região Norte e o experimento no Centro-

Oeste responderam de forma linear ao aumento da densidade na inoculação, enquanto que o experimento no Sudeste respondeu de forma cúbica.

O experimento conduzido na região Sudeste, indicou uma alta nodulação no tratamento sem inoculante, com uma massa de nódulos acima de 200 mg planta<sup>-1</sup> (Figura 14), o que indica a presença de rizóbios já estabelecidos no solo. Mesmo nesta condição observou-se um aumento numérico da nodulação com a inoculação de até 0.6 x10<sup>6</sup> UFC semente<sup>-1</sup> chegando a um valor próximo a 300 mg planta<sup>-1</sup> (Figura 14). Após esta densidade, entretanto, houve uma aparente redução da nodulação das plantas e novo aumento na densidade de 2,4 x10<sup>6</sup> UFC semente<sup>-1</sup>, porém permanecendo todos os valores próximo de 200 mg planta<sup>-1</sup>. Desta forma, apesar dos dados terem se ajustado a uma regressão cúbica, está apresentando um baixo valor do R<sup>2</sup> (Figura 14).



**Figura 14.** Massa seca de nódulos por planta de feijão-caupi (BRS Guariba) em resposta a diferentes densidades de células rizobianas aplicadas por semente e em diferentes localidades no Brasil. Na região Norte, em área de primeiro cultivo e em área já cultivada, ambas em Boa Vista, RR; na região Centro-Oeste, em Sinop, MT; e, na região Sudeste, em Seropédica, RJ. \*\* e \*Significativo a 5 e 10% de probabilidade, respectivamente. <sup>ns</sup>Não significativo. Coeficientes de variação: na região Norte, em área já cultivada, de 21,49%; na região Centro-Oeste, de 17,86%; e, na região Sudeste, de 24,66%.

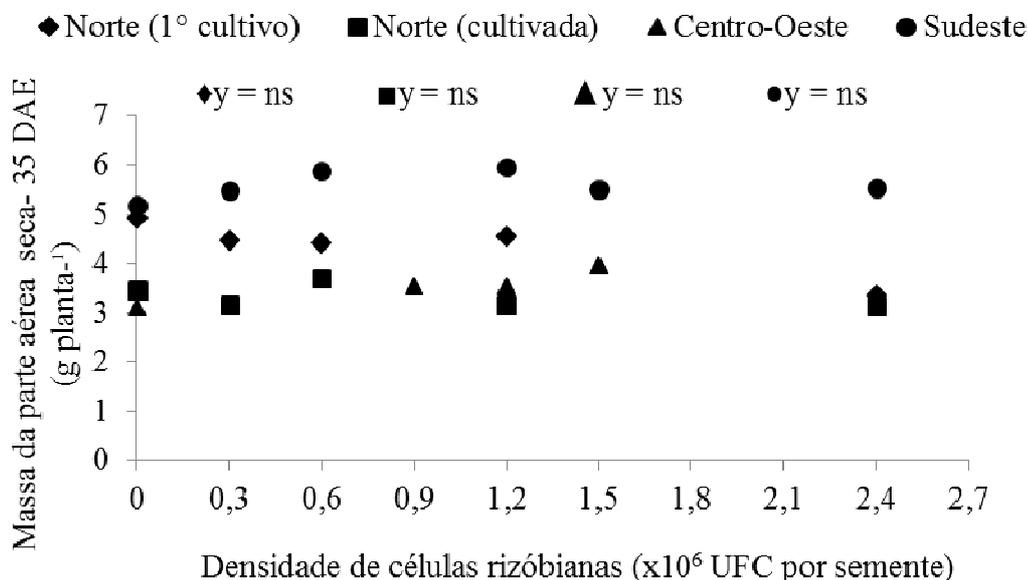
No experimento na região Norte, em área cultivada anteriormente com soja, houve correlação positiva entre a densidade de rizóbios e o aumento da nodulação, com comportamento linear para a nodulação na densidade 2,4 x10<sup>6</sup> UFC por semente (Figura 14). Por outro lado, na área recém cultivada todos os tratamentos apresentaram alta nodulação. Provavelmente está alta nodulação é consequência da população nativa, pois já foi observado em área nativa na região Norte a existência de uma população de rizóbios estabelecida capaz de nodular o feijão-caupi (ZILLI et al. 2013). Isto evidencia, assim como o observado no experimento da região Sudeste, que provavelmente a alta população de rizóbios do solo foi capaz de ocupar os sítios de nodulação disponíveis e o aumento da densidade não promoveu o aumento da nodulação. Na região Norte, Zilli et al. (2009) também obtiveram resultados similares para massa de nódulos ao avaliarem o inoculante com a estirpe BR 3262 na

densidade  $0,6 \times 10^6$  UFC por semente, em área de Cerrado na safra 2006 e de Mata alterada na safra de 2005 e 2006. Estes autores observaram que a massa de nódulos foi superior a 150 mg por planta, assim como em ambos experimentos do atual estudo em que a massa de nódulos foi superior a 100 mg por plantano tratamento sem inoculação.

A massa de nódulos do experimento no Centro-Oeste aumentou de forma linear em função da densidade na inoculação (Figura 14), obtendo com a inoculação de  $1,5 \times 10^6$  UFC por semente a maior massa de nódulos entre tratamentos. Estes dados corroboram Silva et al. (2012), que ao avaliarem em casa de vegetação a taxa de inóculo com a estirpe BR 3267 observaram que com o aumento da densidade rizobiana na inoculação havia incremento na nodulação, na FBN e no crescimento de plantas de feijão-caupi.

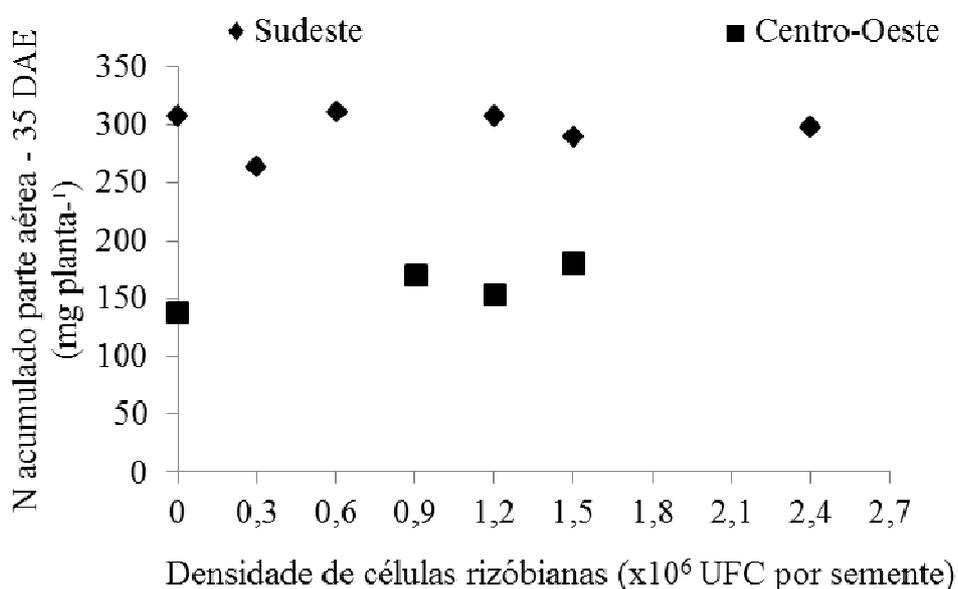
A densidade ideal na inoculação é uma ferramenta que pode reduzir a influência da população nativa de rizóbios do solo no momento da nodulação (Figura 14). Na região Centro-Oeste, os solos apresentam uma população de *Bradyrhizobium* estabelecida em função de cultivos com soja em anos anteriores (MENDES et al., 2004). Em casa de vegetação, Zilli et al. (2011) observaram que as estirpes recomendadas para soja também podem nodular o feijão-caupi, mas com eficiência variável, o que reduz os benefícios da FBN.

Não foram obtidas equações de regressão significativas quanto à massa da parte aérea em resposta ao aumento da densidade de rizóbios utilizado na inoculação de sementes (Figura 15). Costa et al. (2011) e Borges et al. (2012) observaram massa da parte aérea similar e até superior nas plantas não inoculadas comparado com a inoculação com as estirpes recomendadas. Porém o aumento da massa da parte aérea não significa diretamente aumento da produtividade. Ferreira et al. (2013) verificaram que a inoculação com a estirpe BR 3262 proporcionou uma massa da parte aérea similar a testemunha (sem inoculação), porém ao avaliarem o rendimento de grãos, observaram que a estirpe produziu o dobro da testemunha.



**Figura 15.** Massa seca da parte aérea por planta de feijão-caupi (BRS Guariba) em função de diferentes densidades de células rizobianas aplicadas por semente e em diferentes localidades no Brasil. Na região Norte, em área de primeiro cultivo e em área já cultivada, ambas em Boa Vista, RR; na região Centro-Oeste, em Sinop, MT; e, na região Sudeste, em Seropédica, RJ. <sup>ns</sup>Não significativo.

Nos dois experimentos das regiões Sudeste e Centro-Oeste, onde se avaliou o acúmulo de nitrogênio na parte aérea não foram encontradas equações de regressão significativas (Figura 16). O acúmulo de nitrogênio na parte aérea é uma variável que ajuda na discussão dos resultados, porém em feijão-caupi está reflete a diferença que já é encontrada na massa da parte aérea, pois geralmente em feijão-caupi o teor de N na parte aérea é similar, independente do tratamento, como já observado em vários trabalhos (ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; SILVA JÚNIOR et al., 2012). Sendo esta variável para feijão-caupi útil, desde que seja combinada com a avaliação da quantificação da FBN, que não é o caso deste trabalho. Alguns estudos com FBN em feijão-caupi, avaliaram a eficiência simbiótica na cultura sem analisar a variável acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ZILLI et al., 2009; CHAGAS JUNIOR et al., 2010; SILVA NETO et al., 2013).

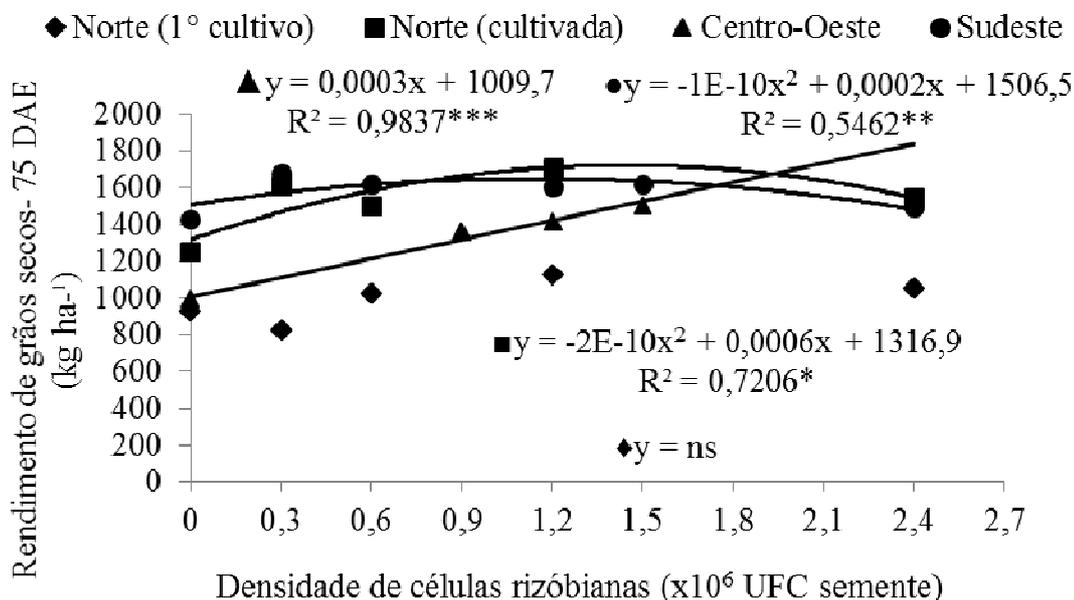


**Figura 16.** Nitrogênio acumulado na parte aérea por planta de feijão-caupi (BRS Guariba), 35 dias após emergência, em função de diferentes densidades de células rizóbicas aplicadas por semente nas regiões Sudeste (Seropédica, RJ) e Centro-Oeste (Sinop, MT).<sup>ns</sup>Não significativo.

Na região Sudeste e Norte (área anteriormente cultivada com soja) o rendimento de grãos respondeu de forma significativa ao aumento da densidade de rizóbios utilizados na inoculação (Figura 17). As equações quadráticas obtidas para ambos indicaram que o maior rendimento de grãos aconteceu quando a cultura foi inoculada com a densidade de rizóbios de  $1,2 \times 10^6$  Ufc por semente. Já no experimento da região Centro-Oeste o rendimento de grãos respondeu de forma linear ao aumento da densidade de rizóbios na inoculação.

Na região Sudeste e em ambas as áreas da região Norte, o rendimento de grãos com a inoculação na densidade de bactérias de  $1,2 \times 10^6$  UFC por semente ficou acima do proporcionado pela densidade de  $2,4 \times 10^6$  UFC por semente. Nas áreas da região Norte e Sudeste a inoculação com  $1,2 \times 10^6$  UFC por semente proporcionou maior rendimento de grãos que o tratamento sem inoculação. Por outro lado, o aumento do rendimento de grãos nos mesmos experimentos na densidade de  $2,4$  UFC por semente em comparação ao tratamento sem inoculação foi menor. Estes dados mostram que pode haver uma densidade máxima de células de rizóbios nas sementes que aumenta a nodulação e consequente a produção das

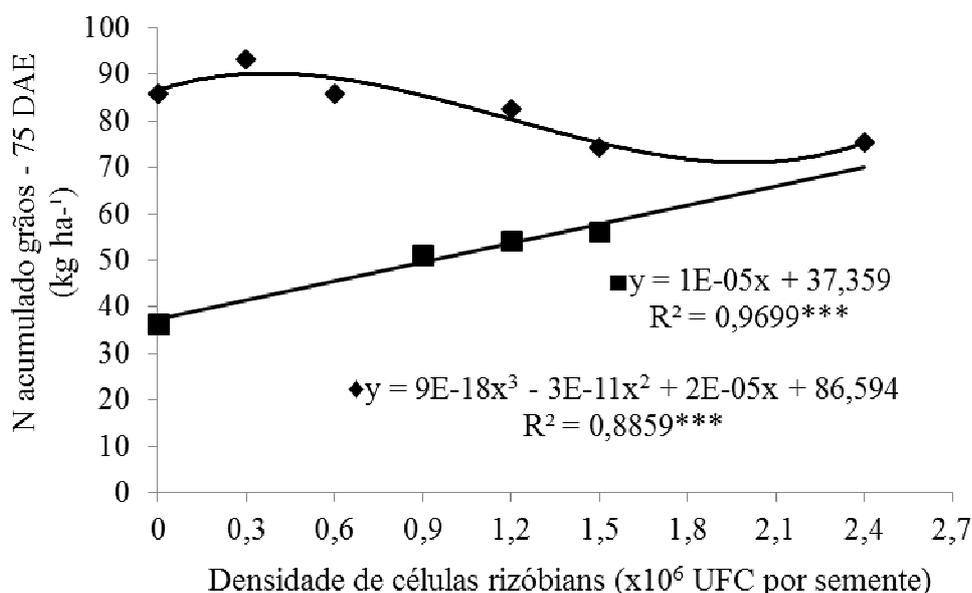
plantas, fato diferente do observado para a cultura da soja até o momento (CAMPO et al., 2010; SILVA et al., 2011).



**Figura 17.** Rendimento de grãos secos de feijão-caupi ('BRS Guariba) em função de diferentes densidades de células rizóbias aplicadas por semente e em diferentes localidades no Brasil. Na região Norte, em área de primeiro cultivo e em área já cultivada, ambas em Boa Vista, RR; na região Centro-Oeste, em Sinop, MT; e, na região Sudeste, em Seropédica, RJ. \*\*\*, \*\* e \*Significativo a 1, 5 e 10% de probabilidade, respectivamente. <sup>ns</sup>Não significativo. Coeficientes de variação: na região Norte, em área já cultivada, de 18,77%; na região Centro-Oeste, de 10,86%; e, na região Sudeste, de 9,06%.

O acúmulo de nitrogênio nos grãos respondeu de forma linear para o experimento na região Centro-Oeste e cúbica para ensaio da região Sudeste (Figura 18). Para a região Centro-Oeste a resposta seguiu o mesmo modelo que ocorreu com a produtividade (Figura 18). No experimento da região Sudeste, o acúmulo de nitrogênio respondendo de forma cúbica, indica um pequeno aumento seguido de uma queda e posterior tendência de aumento, como também foi observado na reposta da massa de nódulos como o aumento da densidade de células de rizóbios na inoculação.

A inoculação das sementes com uma densidade de células de rizóbios que não seja a ideal pode ser um dos motivos da falta de resposta do rendimento de grãos à inoculação com as estirpes recomendadas. Chagas Junior et al. (2010) observaram que para a cultivar Nova era (feijão-caupi), o tratamento sem inoculação proporcionou um rendimento de grãos superior a inoculação da estirpe BR 3262 e similar a INPA 3-11B e a BR 3267. Costa et al. (2011) também verificaram para a cultivar BR 17 Gurguéia, que o tratamento sem inoculação proporcionou um rendimento de grãos similar para as estirpes BR 3267 e a UFLA 3-84. E por sua vez Borges et al. (2012) com a cultivar Vinagre, observaram que o tratamento sem inoculação proporcionou um rendimento de grãos superior a inoculação com todas as estirpes recomendadas.



**Figura 18.** Nitrogênio acumulado nos grãos secos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) “BRS Guariba”, 75 dias após emergência, em função de diferentes densidades de células rizobianas aplicadas por semente nas regiões Sudeste (Seropédica, RJ) e Centro-Oeste (Sinop, MT). \*\*\*Significativo a 1% de probabilidade. Coeficientes de variação: na região Sudeste, de 5,61% e na região Centro-Oeste, de 12,77%.

O aumento da densidade de rizóbios na inoculação aumentou a produtividade no experimento no ensaio no Centro-Oeste, sendo o maior valor alcançado com a densidade de  $1,5 \times 10^6$  UFC por semente, com  $1.506 \text{ kg ha}^{-1}$ . Observou-se que o tratamento inoculado com  $1,5 \times 10^6$  UFC por semente proporcionou um aumento de  $144 \text{ kg ha}^{-1}$  comparado a densidade de  $0,9 \times 10^6$  UFC por semente, porém quando se comparou com a densidade de  $1,2 \times 10^6$  UFC por semente aumento correspondeu a apenas  $35 \text{ kg ha}^{-1}$ . Este aumento da produtividade em função do aumento da densidade de células aplicadas nas sementes corrobora dados de Campo et al. (2010), que ao avaliarem o aumento da dose de inoculação com inoculante líquido para soja, observaram que o aumento da densidade de rizóbios da inoculação de sementes proporcionou maior rendimento de grãos.

No geral, todos os tratamentos inoculados (independente da densidade de bactérias nas sementes) proporcionaram rendimento de grãos igual ao tratamento que recebeu adubação nitrogenada em três dos quatro experimentos (Tabela 22). Apenas na área de primeiro cultivo da região Norte observou-se que o tratamento com N proporcionou rendimento de grãos acima da inoculação com  $0,3 \times 10^6$  UFC por semente, mas estatisticamente igual para as demais densidades (Tabela 22).

**Tabela 22.** Rendimento de grãos secos em função da densidade de rizóbios na inoculação de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em resposta a adubação com 70 kg ha<sup>-1</sup> de N em experimentos da região Norte, Centro-Oeste e Sudeste.

Densidade (x10 <sup>6</sup> UFC por semente)	Rendimento de grãos (kg ha <sup>-1</sup> )			
	Sudeste	Norte 1 <sup>o</sup> cultivo <sup>(1)</sup>	Norte cultivada <sup>(2)</sup>	Centro-Oeste
0	1430b	929cb	1250b	994b
0,3	1683a	824c	1615ba	_( <sup>3</sup> )
0,6	1623ba	1027cba	1504ba	_( <sup>3</sup> )
0,9	_( <sup>3</sup> )	_( <sup>3</sup> )	_( <sup>3</sup> )	1362a
1,2	1608ba	1131ba	1705a	1471a
1,5	1624ba	_( <sup>3</sup> )	_( <sup>3</sup> )	1506a
2,4	1494ba	1052cba	1549ba	_( <sup>3</sup> )
Controle 70 kg N ha <sup>-1</sup>	1515ba	1283a	1595ba	1451a
CV%	9,51	17,16	17,85	13,61

Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste t (LSD), a 5% de probabilidade. <sup>(1)</sup>Área de primeiro cultivo. <sup>(2)</sup>Área com cultivo anterior de soja. <sup>(3)</sup>Densidade (UFC por semente) não testada no experimento da região.

Na área já cultivada da região Norte todos os tratamentos apresentaram produtividade acima de 1000 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto que na área de primeiro cultivo o tratamento não inoculado e o tratamento inoculado com 0,3 x10<sup>6</sup> UFC por semente apresentaram uma produtividade abaixo de 1000 kg ha<sup>-1</sup>. Isto indicou a necessidade da inoculação em áreas de primeiro cultivo e, mesmo em áreas já cultivadas com população de rizóbios estabelecida, verificou-se que a inoculação com 1,2 x10<sup>6</sup> por semente proporcionou produtividade de 455 kg ha<sup>-1</sup> acima do tratamento não inoculado. Silva et al. (2011) também observaram que ao dobrar a dose inoculada houve aumento no rendimento de grãos de soja acima de 250 kg ha<sup>-1</sup>.

O aumento da densidade de células rizobianas nas sementes possibilitou um aumento linear na massa de nódulos em dois experimentos (Centro-Oeste e na área cultivada da região Norte), como mostra a Figura 14. Isto pode ser uma estratégia para competir contra a população nativa do solo e maximizar o efeito da inoculação (KRASOVA-WADE et al., 2006; SILVA et al., 2012). Provavelmente nos outros dois experimentos (Sudeste e na área recém cultivada da região Norte) a presença da alta população nativa ou de uma população eficiente justifique a falta de resposta com o aumento da densidade na inoculação (THIES et al., 1991; SOARES et al., 2014). Como em áreas de plantio não existe uma avaliação prévia da população nativa de rizóbios no solo, a inoculação é a melhor ferramenta para garantir o suprimento de N via FBN e, conseqüentemente, o rendimento da cultura. Recomenda-se que em trabalhos posteriores de inoculação seja analisada a população nativa do solo da área em estudo, possibilitando gerar dados que relacionem o efeito da densidade de células rizobianas na inoculação com a população nativa de rizóbios do solo.

Em termos de rendimentos de grãos, o fato de dois experimentos, ambos da região Norte, apontar para uma queda nos valores após a densidade de 1,2 x10<sup>6</sup> UFC por semente pode ser um indicativo de uma máxima nodulação da planta, suficiente para suprir suas demandas de N, e a partir da qual a planta possuiria limitação fisiológica de uso da FBN (SCHULZE, 2004).

## **6.6 CONCLUSÕES**

A nodulação na cultura do feijão-caupi responde positivamente ao aumento da densidade de células de rizóbios aplicadas nas sementes.

Observa-se aumento linear da nodulação das plantas com o aumento da densidade da inoculação, porém sem resposta na biomassa da parte aérea.

A densidade de células de rizóbios nas sementes, capaz de proporcionar o maior rendimento de grãos do feijão-caupi deve ser de no mínimo  $1,2 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC) por sementes.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

As estirpes nativas estabelecidas no solo são capazes de nodular o feijão-caupi de forma similar às estirpes inoculadas; porém o rendimento de grãos é inferior ao proporcionado pela inoculação, mesmo tendo está população nativa uma taxa de FBN similar a das estirpes inoculadas.

A mistura de estirpes proporcionou o maior rendimento de grãos apenas no ensaio em Sinop-MT, porém não contribuiu para as plantas com maior acúmulo de nitrogênio derivado da FBN, em comparação a inoculação com as estirpes individuais.

A densidade de células de rizóbios nas sementes, capaz de competir com a população nativa estabelecida no solo e de proporcionar o maior rendimento de grãos do feijão-caupi deve ser de no mínimo  $1,2 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC) por sementes.

O benefício da inoculação com as estirpes recomendadas se concentra na maior disponibilidade de nitrogênio para planta, conseqüentemente maior crescimento vegetativo, com um provável menor consumo de fotoassimilados pelos bacteróides das estirpes recomendadas.

Em condições controladas e estéreis de casa de vegetação as plantas de feijão-caupi inoculadas com as estirpes de rizóbios (BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B/BR 3301, UFLA 03-84/BR 3302 e a BR 3299) apresentam características de nodulação similar. Nestas condições a variável razão nodular mostrou-se uma ferramenta eficiente para avaliação do desempenho das estirpes inoculadas.

A atividade da nitrogenase tem seu início aos 20 DAE, com os maiores picos entre 30 a 50 DAE. E mesmo com a nodulação ocorrendo já aos 10 DAE, nesta fase ainda não há atividade expressiva da nitrogenase, e aos 60 DAE tem fim a atividade da nitrogenase.

Em experimentos em vasos não foi observada diferença estatística na %Ndfa, no nitrogênio acumulado na planta e para o nitrogênio derivado da FBN, entre as plantas inoculadas com as estirpes (BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B/BR 3301, UFLA 03-84/BR 3302, BR 3299 e a mistura de estirpes) e as plantas noduladas pelas estirpes nativas, nas avaliações aos 30, 40 e 50 DAE. Porém, a melhor resposta para a avaliação da quantificação da FBN com a abundância natural delta  $^{15}\text{N}$  ocorreu entre 40 e 50 DAE.

No ensaio na área de ambiente de Cerrado, safra 2010/2011, com alta população de rizóbios estabelecida no solo, a inoculação com a mistura de estirpes proporcionou o maior rendimento de grãos ( $1609 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Já no ensaio na área em ambiente de Mata Atlântica, com baixa população de rizóbios estabelecida no solo, a inoculação com a estirpe BR 3267 proporcionou o maior rendimento de grãos ( $1322 \text{ kg ha}^{-1}$ ), seguida da mistura de estirpes ( $1241 \text{ kg ha}^{-1}$ ).

A inoculação com a estirpe BR 3262, no estudo na safrinha 2013 em Mato Grosso, proporcionou rendimento de grãos superior ao controle (população nativa) em Primavera do Leste; e em Sinop a inoculação com esta estirpe resultou no maior valor para a produtividade do feijão-caupi.

O maior acúmulo de nitrogênio nos grãos, entre as estirpes inoculadas foi proporcionado pela inoculação com a estirpe BR 3262, em ambos os experimentos na safrinha 2013, em Mato Grosso. Tendo está estirpe contribuído para uma entrada de nitrogênio no sistema via FBN superior a proporcionada pelo controle (população nativa) nos dois ensaios, em Sinop-MT e em Primavera do Leste-MT, proporcionando  $64$  e  $71 \text{ kg ha}^{-1}$  de N fixado, respectivamente.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível constatar que as estirpes recomendadas para feijão-caupi promovem aumento de rendimento de grãos, porém devem ser estudados outros benefícios, além da FBN, que estas estirpes proporcionam.

Os estudos até aqui indicam que estirpe BR 3262 têm maior capacidade de contribuir com a entrada de nitrogênio via FBN e rendimento de grãos em plantas de feijão-caupi, portanto pode ser indicada para a indústria de inoculantes, principalmente para ser usada em áreas de produção com maior intensidade tecnológica na região Centro-Oeste.

Nos experimentos avaliando o desempenho das estirpes para feijão-caupi deve ser avaliada a densidade de bactérias capazes de nodular o feijão-caupi no solo.

Em virtude do comportamento da planta de feijão-caupi, no ensaio em vasos, e dos fatores edafoclimáticos a campo, que influenciam na nodulação, a eficiência das estirpes deve ser medida a campo.

A simbiose dos genótipos de feijão-caupi e as estirpes atualmente selecionadas no Brasil estão ainda a quem do seu potencial, quanto a contribuição da FBN, que está em torno de 40 a 60 %Ndfa e bem distante do obtido com a cultura da soja. Entretanto está fixação de N é suficiente para manter balanço de nitrogênio positivo no sistema.

Nos estudos futuros de eficiência simbiótica das estirpes recomendadas e de outras candidatas à recomendação deverá ser considerado entre as variáveis a avaliação da taxa fotossintética da planta de feijão-caupi. Neste sentido o ideal seria avaliações conjunta em casa de vegetação na mesma data, com atividade de nitrogenase, quantificação da FBN e a taxa fotossintética.

Para uma próxima etapa de estudo, é necessário que no ensaio a campo de quantificação da FBN, seja avaliado a taxa fotossintética das plantas de feijão-caupi no período de 20, 30 e 40 dias após a emergência. Assim, seria a forma de testar a hipótese apresentada no capítulo III, que as plantas inoculadas aumentam sua taxa fotossintética, comparada as plantas noduladas pela população nativa.

A ênfase dada pela tese a região Centro-Oeste mostra sua importância no cultivo do feijão-caupi, desta forma futuros experimentos para a região devem ser programados junto à os próprios agricultores no período da safrinha, com o plantio entre final de fevereiro e início de março. E, ainda os experimentos devem ser de caráter multidisciplinar, integrando FBN, melhoramento genético e manejo fitossanitário, em função dos custos experimentais individualizados e da demora dos resultados. Este planejamento conjunto aumentaria a credibilidade da pesquisa juntos aos agricultores, que por consequência estreitaria a relação entre agricultor e o pesquisador, proporcionando aplicabilidade a os resultados obtidos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAMILLO, J. M.; DIAZ-LEAL, J. L.; SANCHEZ-MORAN, M. V.; PINEDA, M. Molecular analysis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant, Cell and Environment**, v.33, p.1828–1837, 2010.
- ALCANTARA, R. M. C. M. **Fixação biológica de nitrogênio em genótipos ancestrais de feijão-caupi**. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós- Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, 112f. 2011.
- ALCANTARA, R. M. C. M.; ARAÚJO, A. P.; XAVIER, G. R.; ROCHA, M. M.; RUMJANEK, N. G. Relações entre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a duração do ciclo de diferentes genótipos de cultivos de leguminosas de grãos. **Documentos 197 / Embrapa Meio-Norte**, 27p. 2009.
- ALCANTARA, R. M. C. M.; REIS, V. M. Metabolismo do Carbono nos Nódulos. **Documentos 253 / Embrapa Agrobiologia**, 27p. 2008.
- ALCANTARA, R. M. C. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; ROCHA, M. M.; CARVALHO, J. S. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. **Revista Ciência Agrônômica**, v.45, n.1, p.1-9, 2014.
- ALESANDRINI, F.; FRENO, P.; PUPPO, A.; HÉROUART, D. Isolation of a molecular marker of soybean nodule senescence. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 41, n.8, p.727-732, Aug. 2003a.
- ALESANDRINI, F.; MATHIS, R.; SYPE, G. V. de.; HÉROUART, D.; PUPPO, A. Possible roles for a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule development and senescence. **NewPhytologist**, v.158, n.1, p.131-138, 2003b.
- ALMEIDA, A. L. G.; ALCANTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S.A.; AZEVEDO NÓBREGA, J. C.; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L. Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Agrária**, v.5, n.3, p.364-369, 2010.
- ALMEIDA, F. F. D.; ARAÚJO, A. P.; ALVES, B. J. R. Seeds with high molybdenum concentration improved growth and nitrogen acquisition of rhizobium-inoculated and nitrogen-fertilized common bean plants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, p.367-378, 2013.
- ALMEIDA, J. P. F.; HARTWIG, U. A.; FREHNER, M.; NÖSBERGER, J.; LÜSCHER, A. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in white clover (*Trifolium repens*L.). **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.1289–1297, 2000.
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v.252, p.1-9, 2003.
- ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.41, n.3, p.449-456, 2006.
- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. 1994. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas, p.63-94. In: Hungria, M.; Araújo,

R.S. (Eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa-SPI, Brasília, Distrito Federal.

APPUNU, C.; DHAR, B. Symbiotic effectiveness of acid-tolerant *Bradyrhizobium* strains with soybean in low pH soil. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.10, p.842-845, 2006.

ARAÚJO, A. P.; PINA, B. D.; TEIXEIRA, M. G. Nitrogen and phosphorus in senescent leaves of field-grown common bean cultivars and their contribution to crop nutrient budget. **Field Crops Research**, v.127, p.35-43, 2012.

ARAÚJO, F. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SOUZA, M. R.; Inoculação do feijão-caupi com rizobactérias promotoras de crescimento e desempenho na produção de biomassa, **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v.17, p.53-58, 2012.

ARAÚJO, A.P. & TEIXEIRA, M.G. Ontogenetic variations on absorption and utilization of phosphorus in common bean cultivars under biological nitrogen fixation. **Plant and Soil**, v.225, p.1-10, 2000.

BELANE, A. K.; ASIWE, J.; DAKORA, F. D. Assessment of N<sub>2</sub> fixation in 32 cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) genotypes grown in the field at Taung in South Africa, using <sup>15</sup>N natural abundance. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.55, p.11450-11458, 2011.

BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Measurement of N<sub>2</sub> fixation in 30 cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes under field conditions in Ghana using <sup>15</sup>N natural abundance technique. **Symbiosis**, v.48, p.47-56, 2009.

BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Photosynthesis, symbiotic N and C accumulation in leaves of 30 nodulated cowpea genotypes grown in the field at Wa in the Guinea savanna of Ghana. **Field Crops Research**, v.124, p.279-287, 2011.

BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Symbiotic N<sub>2</sub> fixation in 30 field-grown cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes in the Upper West Region of Ghana measured using <sup>15</sup>N natural abundance. **Biology and Fertility of Soils**, v.46, p.191-198, 2010.

BELANE, A. K.; PULE-MEULENBERG, F.; MAKHUBEDU, T. I.; DAKORA, F. D. Nitrogen fixation and symbiosis-induced accumulation of mineral nutrients by cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Crop and Pasture Science**, v.65, p.250-258, 2014.

BERGESERSEN, F. J. Regulation of nitrogen fixation in infected cells of leguminous root nodules in relation to O<sub>2</sub> supply. **Plant and Soil**, v.191, p.189-203, 1997.

BERTINI, C. H. C. de M.; TEÓFILO, E. M.; DIAS, F. T. C. Divergência genética entre acessos de feijão-caupi do banco de germoplasma da UFC. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, n.1, p.99-105, 2009.

BIZARRO, M. F. Simbiose e Variabilidade de Estirpes de *Bradyrhizobium* Associadas á Cultura da Soja em Diferentes Manejos do Solo. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, UFRGS, 2008.

BODDEY R. M. Methods for the quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.6, p.209-266, 1987.

BODDEY R. M.; PEOPLES M. B.; PALMER B.; DART P. J. The use of <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.57, p.235-270, 2000.

- BODDEY R. M.; POLIDORO J. C.; RESENDE A. S.; ALVES B. J. R.; URQUIAGA S. Use of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique for the quantification of the contribution of  $\text{N}_2$  fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.889–895, 2001.
- BODDEY R. M.; URQUIAGA, S.; NEVES, M. C. P. Quantification of the contribution of  $\text{N}_2$  Fixation to field-grown grain legumes- A Strategy for the practical application of The  $^{15}\text{N}$  Isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**. v.22. n.5, p.649-655, 1990.
- BODDEY, L. H.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Avaliação da Fixação Biológica de  $\text{N}_2$  Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno: História, Teoria e Prática. 2007,43p. **Embrapa Agrobiologia-Documentos 245**.
- BODDEY, R. M.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, p.407-415, 1997.
- BOHRER, T.R.J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.937-952, 1998.
- BOLLARD, E.G. Transport in the xylem. **Annual Review of Plant Physiology**, v.11, p.141-166, 1960.
- 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**, v.25, n.1, p.37-44, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil, na forma dos Anexos I, II e III, desta Instrução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 25 mar. 2011. Seção 1, p.3-7.
- BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de  $^{15}\text{N}$ . **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.895-905, 2009.
- BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia, Campinas**, v.70, n.1, p.206-215, 2011.
- BURNS, R. H. The nitrogenase system from Azobacter: activation energy and divalent cation requirement. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.171, p.253-259, 1969.
- BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agrícola**. v.57, p.507-512, 2000.
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. In-furrow inoculation of soybean as alternative to fungicide and micronutrient seed treatment. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1103-1112, 2010.
- CAMPOS, B.C.; HUNGRIA, M. & TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de  $\text{N}_2$  por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.583-592, 2001.

- CAMPOS, F.L.; FREIRE FILHO, F.R.; LOPES, A.C. de A.; RIBEIRO, V.Q.; SILVA, R.Q.B. da; ROCHA, M. de M. Ciclo fenológico em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp): uma proposta de escala de desenvolvimento. **Revista Científica Rural**, v.5, p.110-116, 2000.
- CASTRO, C. M.; ALVES, B. J. R.; ALMEIDA, D. L.; RIBEIRO, R. L. D. Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.8, p.779-785, 2004.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, G. R.; CHAGAS, L. F. B. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO. **Revista Ciência Agrônômica**, v.41, n.4, p.709-714, 2010.
- CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J.L.; LI, Y.; WANG, E.T. *Rhizobium hainanenses* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.870-873, 1997.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.392-397, 1988.
- CLAESSEN, M.E.C. (Org.). **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. rev. atual. Rio de Janeiro: Embrapa-CNPS, 1997. 212p. (Embrapa-CNPS. Documentos, 1).
- COOPER, J. E. Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. **Adv. Bot. Res.** 41, p. 1-62, 2004.
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; MARTINS, L. V.; AMARAL, F. H. C.; MOREIRA, F. M. S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agrônômica**, v.42, n.1, p.1-7, 2011.
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.9, p.1275-1284, 2013.
- DAMASCENO e SILVA, K. J. Estatística da produção de feijão-caupi. Portal do agronegócio, 2009. Disponível em: <<http://www.portaldogronegocio.com.br/conteudo.php?id=34241>>. Acesso em 25 jun. 2011.
- DECHEN, A. R.; HAAG, H. P.; CARMELLO, Q. A. C. **Mecanismos de absorção e de translocação de micronutrientes**. In: Micronutrientes na agricultura. Ferreira, M.E.; Cruz, M.C.P. (ed.). POTAFOS/CNPq, Piracicaba. 1991, p.79-97.
- DIÁZ-LEAL, J. L.; VALDIVIESO, G. G.; FERNÁNDEZ, J.; PINEDA, M.; ALAMILLO, J. M. Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Experimental Botany**, v.63, n.11, p.4095-4106, 2012.
- DIÁZ-LEAL, J. L.; VALDIVIESO, G. G.; FERNÁNDEZ, J.; PINEDA, M.; ALAMILLO, J. M. Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Experimental Botany**, v.63, n.11, p.4095-4106, 2012.
- DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, v.210, p.850-852, 1966.

- DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N.B. Interrelações entre variedades e nutrição na nodulação e simbiose da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.2, p.475-487, 1967.
- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A.A. & GUZMÁN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.155-161, 1970.
- DUKE, S. H.; COLLINS, M. Role of potassium in legume dinitrogen fixation. In: MUNSON, R. D. (Ed.) Potassium in agriculture. Madison: **American Society of Agronomy**, p.443-465, 1985.
- DUPONT, L.; ALLOING, G.; PIERRE, O.; EL MSEHLI, S.; HOPKINS, J.; HÉROUART, D.; PIERRE, F. **The Legume Root Nodule: From Symbiotic Nitrogen Fixation to Senescence**. In: Senescence, NAGATA, T. (Ed.), 850p, 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/senescence/the-legume-root-nodule-from-symbiotic-nitrogen-fixation-to-senescence>.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008.
- FERREIRA, L. V. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; AGUIAR, F. L.; MOREIRA, F. M. S.; PACHECO, L. P. Biological Nitrogen Fixation in Production of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, Family Farming in Piauí, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v.5, n.4, p.153-160, 2013.
- FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F. A.; SILVA, J.F. **Manejo integrado de plantas daninhas na cultura do feijão de outono-inverno**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.17, n. 178, p.353-358, 1994.
- FILGUEIRAS, G. C.; SANTOS, M. A. S.; HOMMA, A. K. O.; REBELLO, F. K.; CRAVO, M. S. Aspectos Socioeconômicos. In: ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. (Org.). A Cultura do Feijão-Caupi na Amazônia Brasileira. Boa Vista: **Embrapa Roraima**, 2009, p.185-221.
- FISCHINGER, S.A.; DREVON, J.J.; CLAASSEN, N. & SCHULZE, J. Nitrogen from senescing lower leaves of common bean is re-translocated to nodules and might be involved in a N-feedback regulation of nitrogen fixation. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.987-995, 2006.
- FISCHINGER, S.A.; SCHULZE, J. The importance of nodule CO<sub>2</sub> fixation for the efficiency of symbiotic nitrogen fixation in pea at vegetative growth and during pod formation, **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.9, p.2281-2291, 2010.
- FISHER, M. C. T.; EISSENSTAT, D. M.; LYNCH, J. P. Lack of evidence for programmed root senescence in common bean (*Phaseolus vulgaris*) grown at different levels of phosphorus supply. **New Phytologist**, v.153, n.1, p.63-71, 2002.
- FRANCO, A. Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja no Brasil: Uma lição para o futuro. **Boletim Informativo da SBCS**, janeiro – abril, 2009
- FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C. & NEYRA, C.A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology**, v.63, p.421-424, 1979.
- FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E.E. Org. **O Caupi no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP/ Ibadan: IITA, p.25-46. 1988.

FREIRE FILHO, F. R. **PRODUÇÃO, MELHORAMENTO GENÉTICO E POTENCIALIDADES DO FEIJÃO-CAUPI NO BRASIL**, Embrapa Meio Norte, Teresina, Piauí, Brasil, 84p. 2011.

FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. de M.; SILVA, K. J. D. e; RIBEIRO, V. Q.; NOGUEIRA, M. S. da R. Feijão-caupi: melhoramento genético, resultados e perspectivas. In: VIDAL NETO, F. das C.; BERTINI, C. H. C. de M.; ARAGÃO, F. A. S.; CAVALCANTI, J. J. V. (Ed.) **O melhoramento genético no contexto atual**. Fortaleza: Embrapa - CNPAT, 2009. p.25-59.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q. Prefácio. In: FREIRE FILHO, F.R; LIMA, J.A.A. & RIBEIRO, V. Q. (Ed). **Feijão-Caupi – Avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, 2005. 519p.

FREIRE, J. R. J. Inoculation of soybeans. In: EXPLOITING THE LEGUM E/RHIZOBIUM TECHNOLOGY SYMBIOSIS IN TROPICAL AGRICULTURE, 1976, Hawaii. Proceedings... **Honolulu:University of Hawaii**, 1977. p.335-379. (NifTAL Project, 145)

FREIRE, J. R. J.; VERNETTI, F. J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.5, p.117-126, 1999.

FREIRE, J.R.J.; KOLLING, I.; VIDOR, C. Sobrevivência e competição por sítios de nodulação de estirpes de *Rhizobium japonicum* para soja. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, Campinas, v.7, p.47-53, 1983.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. S. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v.45, p.109-114, 2012.

FREITAS, F. C. L.; MEDEIROS, V. F. L. P.; GRANGEIRO, L. C.; SILVA, M. G. O.; NASCIMENTO, P. G. M. L.; NUNES, G. H. Interferência de plantas daninhas na cultura do feijão-caupi. **Planta Daninha**. v.27, n.2, p.241-247, 2009.

GIL-QUINTANA, E.; LARRAINZAR, E.; ARRESE-IGOR, C.; GONZÁLEZ, E. M. Is N-feedback involved in the inhibition of nitrogen fixation in drought stressed *Medicago truncatula*? **Journal of Experimental Botany**, v.64, p.281–292, 2013a.

GIL-QUINTANA, E.; LARRAINZAR, E.; SEMINARIO, A.; DÍAZ-LEAL, J. L.; ALAMILLO, J. M.; PINEDA, M.; ARRESE-IGOR, C.; WIENKOOP, S.; GONZÁLEZ, E. M. Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. **Journal of Experimental Botany**, doi:10.1093/jxb/ert074, 2013b.

GOORMACHTIG, S.; CAPOEN, W.; HOLSTERS, M. *Rhizobium* infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. **Trends Plant Sci**, v.9, p.518–522, 2004.

GUZMÁN, L. & DÖBEREINER, J. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of four crossinoculated tropical legumes. **IV Reun. lat.-am. Inoc. Legum.,Pôrto Alegre**, 1968.

GROTEN, K.; DUTILLEUL, C.; HEERDEN, P. D. R. van; VANACKER, H.; BERNARD, S.; FINKEMEIER, I.; DIETZ, K. J.; FOYER, C. H. Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. **FEBS Letters**, v. 580, n.5, p.1269-1276, 2006.

GUALTER, R. M. R. **Efeito da inoculação com diferentes estirpes de rizóbio na nodulação, produtividade e fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi**. Dissertação

de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós- Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, 72f. 2010.

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

GUEDES, G. N.; SOUZA, A. S.; ALVES, L. S. Eficiência agronômica de inoculantes em feijão-caupi no município de pombal – PB. **Revista Verde**, v.5, n.4, p.82-96, 2010.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The acetylene-ethilene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Washington, v.43, p.1185-1207, 1968.

HARTWIG, U. A. The regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspec Plant EcolEvolSyst**; v.1, p.92–120, 1998.

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

HUNGRIA, M.; BOHRER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Londrina: Embrapa Soja**, 2007. 80p.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.; CAMPO, R.; GRAHAM, P. **The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America**. In: D. Werner and W. Newton, Editors, Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment, Springer, Netherlands, p.25-42, 2005.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. & VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, da redutase do nitrato e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.9, p.193-200, 1985.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Ontogenia da fixação biológica de nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, p.715-730, 1986.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field CropsResearch**, Amsterdam, v. 65, p.151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. & PERES, J.R.R. **Fixação biológica do nitrogênio em soja**. In: ARAUJO, R.S. & HUNGRIA, M., eds. Microrganismos de importância agrícola. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p.9-89. 1994.

IMSANDE, J.; SCHMIDT, J.M. Effect of N source during soybean pod filling on nitrogen and sulfur assimilation and remobilization. **Plant and Soil**, v.202, p.41-47, 1998.

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, 1982.

JUNK, G.; SVEC, H.V. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochim. Cosmochim.**, v.14, p.234–243, 1958

- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P. A.; GILLER, K. E.; KUYPER, T.W. Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) dependent on N<sub>2</sub> fixation or nitrate supply. **Plant Biol**, v.12, p. 60-69, 2010a.
- KASCHUK, G.; KUYPER, T. W.; LEFFELAAR, P. A.; HUNGRIA, M.; GILLER, K. E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, p.1233–1244, 2009.
- KASCHUK, G.; LEFFELAAR, P.A.; GILLER, K.E.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M.; KUYPER, T.W. Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: a meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p.125-127, 2010b.
- KASCHUK, G.; YIND, X.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, A. P. A.; GILLER, K. E. A.; KUYPER, T.W. Photosynthetic adaptation of soybean due to varying effectiveness of N<sub>2</sub> fixation by two distinct *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Environmental and Experimental Botany**, v.76, p.1-6, 2012.
- KRASOVA-WADE, T.; DIOUF, O.; NDOYE, I.; SALL, C.E.; BRACONNIER, S. & NEYRA, M. Water-condition effects on rhizobia competition for cowpea nodule occupancy. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p.1457-1463, 2006.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.501-505, 1992.
- LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B.; SOARES, A.L.L. Yield and nodulation of cowpea inoculated with selected strains. **R. Ceres**, v.51, p.67-82, 2004.
- LAJUDIE, P. de; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MASTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium sahel* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.715-733, 1994.
- LAWN, R.J., AND W.A. BRUN. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans: Effect of supplemental nitrogen and intervarietal grafting. **Crop Science**. v. 14, p. 22-25, 1974.
- LEITE, L. F. C.; ARAÚJO, A. S. F.; COSTA, C. N.; RIBEIRO, A. M. B. Nodulação e produtividade de grãos do feijão-caupi em resposta ao molibdênio, **Revista de Ciência Agronômica**, v.40, n.4, p. 492-497, 2009.
- LIAO, C.F.H. Devarda's allow method for total nitrogen determination. **Soil Science Society of America Journal**, v.45, p.852-855, 1981.
- LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R. PAULO, F. S. D.; NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M. D.; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36 n.2, p.337-348, 2012.
- LIMA, A. S. T.; BARRETO, M. C. S.; ARAÚJO, J. M.; SELDIN, L.; BURITY, H. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. SINERGISMO *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* na Simbiose *Bradyrhizobium*-CAUPI. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.713-721, 2011.
- LUPWAYI, N. Z.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W. Rhizobial inoculants for legume crops. **Journal of Crop Improvement**, v.15, n.2, p.289-321, 2005.

- MALAVOLTA, E.; LIMA, F. O. F. **Nutrição e adubação do feijoeiro**. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Tecnologia da produção do feijoeiro irrigado. Piracicaba: Esalq-DeptoAgricultura/Fealq, p.100-120, 1997.
- MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; SANTOS, A. C. F.; AIDAR, S. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.49, n.5, p.395-402, 2014.
- MARIOTTI, A. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural <sup>15</sup>N abundance measurements. **Nature**, v.303, p.685-687, 1983.
- MARIOTTI, A., GERMON, G.C., HUBERT, P., KAISER, P., LÉTOLLE, R., TARDIEUX, A., TARDIEUX, P. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fraction: some principle; illustrations for the denitrification and nitrification processes. **Plant Soil**, v.62, p.413-430, 1981.
- MARTINS, L. M.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.333-339, 2003.
- MASKEY S.; BHATTARAI S. L.; PEOPLE M. B.; HERRIDGE D. F.; On-farm measurements of nitrogen fixation by winter and summer legumes in the Hill and Terai regions of Nepal. **Field Crops Res**, v.70, p.209-221, 2001.
- MEDEIROS, E. V.; SILVA, K. J. P.; MARTINS, C. M.; BORGES, W. L.; Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.7, n.2, p. 160-168, 2007.
- MELO, S. R. e ZILLI, J. E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o estado de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.9, p.1177-1183, 2009.
- MELO, F. B.; CARDOSO, M. J.; BASTOS, E. A.; RIBEIRO, V. Q. Resposta do feijão-caupi à adubação fosfatada e potássica em Latossolo Amarelo distrófico no Cerrado do Leste Maranhense. In: Anais do III CONAC- **Congresso Nacional de Feijão-Caupi, Fortaleza-PE, 2013**.1 CD-ROM.
- MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. **Biology and Fertility of Soils**, v.40, p.28-35, 2004.
- MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D. M. G. & CAMPO, R. J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em Latossolos do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1053-1060, 2008.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition**. 5.ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 2001, 849p.
- MOREIRA, F. M de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 729 p. 2006.
- MORÓN, B.; SORIA-DÍAZ, M. E.; AUKT, J.; VEROLOS, G.; NOREEN, S.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; GIL-SERRANO, A.; THOMAS-OATES, J.; MEGÍAS, M.; SOUSA, C.

Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tripici* CIAT 899. **Chemistry and Biology**, v.12, p.1029-1040, 2005.

NEVES, M. C. P. & RUMJANEK, N. G. Diversity and adaptability of Soybean cowpea rhizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.889-895, 1997.

NEVES, M. C. P. Interdependência fisiológica entre os componentes do sistema simbiótico rhizobium-leguminosas. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Campinas, v.5, p.79-92, 1981.

NEVES, M.C.P.; FERNANDES, M.S. & SÁ, M.F.M. Assimilação de nitrogênio em plantas noduladas de *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.689-695, 1982.

NG, N. Q.; MARÉCHAL, R. Cowpea taxonomy, origin germplasm. In: SINCH, S. R; RACHIE, K. O., eds. **Cowpea research, production and utilization**. Chichester, John Wiley. p.11-21. 1985.

NYEMBA, R. C.; DAKORA, F. D. Evaluating N<sub>2</sub> fixation by food grain legumes in farmers fields in three agro-ecological zones of Zambia, using N<sup>15</sup> natural abundance. **Biology and Fertility of Soils**, v.46, p.461-470, 2010.

NOBREGA, R.S.A.; MOTTA, J.S; LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p. 899-905, 2004

OKELEYE, K. A.; OKELANA, M. A. Effect of phosphorus fertilizer on nodulation, growth and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.67, p.10-12, 1997.

OKITO, A.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Isotopic fractionation during N<sub>2</sub> fixation by four tropical legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1179-1190. 2004.

OLIVEIRA, A. P.; SILVA, J. A.; LOPES, E. B.; SILVA, E. E.; ARAÚJO, L. H. A.; RIBEIRO, V. V. Rendimento Produtivo e Econômico do Feijão-Caupi em Função de Doses de Potássio. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n.2, p.629-634, 2009.

OLIVEIRA, G. A.; ARAÚJO, W. F.; CRUZ, P. L. S.; MANDUCA, W. L.; FERREIRA, G. B. Resposta do feijão-caupi às lâminas de irrigação e às doses de fósforo no cerrado de Roraima, **Revista de Ciência Agronômica**, v.42, n.4, p.872-882, 2011.

PAFFETTI, D.; DAGUIN, F.; FANCELLI, S.; GNOCCHI, S.; LIPPI, F.; SCOTTI, C.; BAZZICALUPO, M. Influence of plant genotype on the selection of nodulating *Sinorhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.3-8, 1998.

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

PATE, J. S. Photoassimilate partitioning and consumption in nitrogen fixing crop legumes. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A. A. (Ed.). **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York: Marcel Dekker, p.467-478, 1996.

PAU, R. N.; MITCHENALL, L. A.; ROBSON, R. L. Genetic evidence for an *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.124-129, 1989.

- PESSOA, A.C.S.; RIBEIRO, A.C.; CHAGAS, J.M. & CASSINI, S.T.A. Atividades de nitrogenase e redutase de nitrato e produtividade do feijoeiro “Ouro Negro” em resposta à adubação foliar com molibdênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.217- 224, 2001.
- PEOPLES, M. B.; BROCKWELL, J.; HERRIDGE, D. F.; ROCHESTER, I. J.; ALVES, B. J. R.; URQUIAPA, S.; BODDEY, R. M.; DAKORA, F. D.; BHATTARAI, S.; MASKEY, S. L.; SAMPET, C.; RERKASEM, B.; KHAN, D. F.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; JENSEN, E. S. The contribution of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. **Symbiosis**, v.48, p.1-17, 2009.
- PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica: EDUR, 150 p. 1998.
- PINHEIRO, M. S.; SOUSA, J. B.; FEITOZA, R. M.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Resistência de Estirpes de Rizóbios Isoladas do Semiárido a Elevadas Temperaturas. In: **Anais do III CONAC- Congresso Nacional de Feijão-Caupi, Fortaleza- PE, 2013**. 1 CD-ROM. ([www.conac2012.org\\_resumospdf\\_216b](http://www.conac2012.org_resumospdf_216b)).
- POLETTO, N.; GROHS, D. S.; MUNDSTOCK, C. M.; Flutuação Diária e Estacional de Nitrato e Amônio em um Argissolo Vermelho Distrófico Típico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p.1619-1626, 2008.
- PRELL, J. & POOLE, P. Metabolic changes of rhizobial in legume nodules. **TRENDS in Microbiology**, v.14, n.4, p.161- 168, 2006.
- PULE-MEULENBERG, F.; BELANE, A. K.; KRASOVA-WADE, T.; DAKORA, F. D. Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. **BMC Microbiology**, v.10, p.1471-2180, 2010.
- PUPPO, A.; GROTEN, K.; BASTIAN, F.; CARZANIGA, R.; SOUSSI, M.; MERCEDES, L. M.; ROSARIO, F. M.; HARRISON, J.; VANACKER, H.; FOYER, C. H. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. **New Phytologist**, v.165, n.3, p.683-701, 2005.
- RADL, V.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; LEITE, J.; PASSOS, S. R.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RUNJANEK, N. G.; BALDANI, J. I.; ZILLI, J. E. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, DOI 10.1099/ijs.0.053082-0.
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubri sub albicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366). 2009. 04p. (**Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica 30**).
- REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. de M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (ED.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, p.153-174, 2006.
- REIS, V. M.; TEIXEIRA, A. K. R. S. Fixação biológica de nitrogênio – Estado da arte. In: AQUINO, Adriana Maria de; ASSIS, Renato Linhares de. **Processos biológicos no sistema solo-planta**. Brasília, DF: Embrapa Agrobiologia, 2005.

- RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, J. A. G.; BONIFACIO, A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Metabolism of nitrogen and carbon: Optimization of biological nitrogen fixation and cowpea development. **Soil Biology & Biochemistry**, v.67, p.226-234, 2013.
- RODRIGUES, A.C.; ANTUNES, J.E.L.; MEDEIROS, V.V.de; BARROS, B.G. de F.; FIGUEIREDO, M. do V. B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, v.28, p.196-202, 2012.
- 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.
- SA, T. M.; ISRAEL D. W. Phosphorus-deficiency effects on response of symbiotic N<sub>2</sub> fixation and carbohydrate status in soybean to atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, p.2207-2218, 1998.
- SA, T. M.; ISRAEL, D. W. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. **Plant Physiology**, v.97, p.928-935. 1991
- SAITO, S.M.T.; MATSUI, E. & SALATI, E. 15N<sub>2</sub> fixation, H<sub>2</sub> evolution and C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction relationships in *Phaseolus vulgaris*. **Physiology of Plant**, v.49, p.37-42, 1980.
- SAMAPAI, L. S.; BRASIL, E.C. Exigência Nutricional do Feijão-Caupi. In: Anais do II CONAC- Congresso Nacional de Feijão-Caupi, Belém-PA, 2009.1 CD-ROM.
- SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SOUTO, S. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região nordeste do Brasil na fixação do N<sub>2</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum**, v.27, p.301-307, 2005.
- SANTOS, H.G. dos; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C. dos; OLIVEIRA, V.A. de; OLIVEIRA, J.B. de; COELHO, M.R.; LUMBRERAS, J.F.; CUNHA, T.J.F. (Ed.). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306p.
- SARAIVA, C. N.; ANDRADE, M. L. Jr.; STAMFORD, N. P.; GALVÃO, M. B. S. F.; & ALBUQUERQUE, C. S. Nodulação e produção do caupi (*Vigna unguiculata* L. walp) sob efeito de plantas de cobertura e inoculação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.579-587, 2008.
- SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J.M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J. de B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.2, p.261-268, fev. 2012.
- SCHULZE, J. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, v.167, p.125-137, 2004.
- SEMENTES TOMAZETTI. **Feijão-caupi continua aquecido no mercado internacional**. Disponível: <http://www.sementestomazetti.com.br/noticias>, 2012.
- SESSITSCH, A.; HOWIESON, J. G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in Rhizobium research. **Crit. Rev. Plant Sci**, v.21, p.323-378, 2002.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. N<sub>2</sub>-fixation in field settings: estimations based on natural 15N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.699–756. 1986.

SILVA JÚNIOR, E. B. **Avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantios Tecnificados de Feijão-Caupi na Região Centro-Oeste do Brasil**. 57p, 2012. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Agronomia- Ciência do Solo/ UFRRJ, Seropédica- RJ.

SILVA JÚNIOR, E. B.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; BODDEY, R. M.; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de nova formulação de inoculante rizobiano para feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.1, p.138-141, 2012.

SILVA NETO, M. L.; SMIDERLE, O. J.; SILVA, K.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; XAVIER, G. R.; ZILLI, J. E. Compatibilidade do tratamento de sementes de feijão-caupi com fungicidas e inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.1, p.80-87, jan. 2013.

SILVA, A. F.; CARVALHO, M. A. C.; SCHONINGER, E. L.; MONTEIRO, S.; CAIONE, G.; SANTOS, P. A. Doses de inoculante e nitrogênio na semeadura da soja em área de primeiro cultivo. **Bioscience Journal**, v.27, n.3, p.404-412, 2011.

SILVA, J. F.; ALBERTINO, S. M. F. Manejo de plantas daninhas. In: ZILLI, J.E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. **A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira**. Boa Vista-RR: Embrapa Roraima, 2009. p. 223-243.

SILVA, R. P.; SANTOS, C. E.; LIRA JÚNIOR, M. A. STAMFORD, N. P. Efetividade de estirpes selecionadas para feijão-caupi em solo da região semi-árida do sertão da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, n.2, p.105-110, 2008.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.28, n.3, p.407-412, 2006.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Co-Inoculação de Sementes de Caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua Eficiência na Absorção de Cálcio, Ferro e Fósforo pela Planta. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.36 n.2, p.95-99, 2006.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. P.; FERREIRA, P. A. A.; MARTINS, H. M. V.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B. & MOREIRA, F. M. S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.795-802, 2006.

SOARES, B. L.; FERREIRA, P. A. A.; LONGATTI, S. M. O.; MARRA, L. M.; RUFINI, M.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. **Scientia Agricola**, v.71, n.3, p.171-180, 2014.

SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; MACIEL, C.D.; CAMPO, R.J.; ZAIA, D.A.M. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.1, p.83-91, 2008.

SULIEMAN S. Does GABA increase the efficiency of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in legumes? **Plant Signaling and Behavior**, v.6, p.32–36, 2011.

SULIEMAN, S.; CHIEN, V. H.; SCHULZE, J.; TRAN, L. P. Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. **Journal of Experimental Botany**, doi:10.1093/jxb/ert122, 2013.

- THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of the Size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes. **Appl. Environ. Microbiol.** v.57, n.1, p.19-28, 1991.
- TRIVELIN, P. C. O. Técnicas com <sup>15</sup>N em estudos de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Apostila do Programa de Pós-Graduação em Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Piracicaba, outubro de 2001.
- TSIKOU, D.; KALLONIATI, C.; FOTELLI, M. N.; NIKOLOPOULOS, D.; KATINAKIS, P.; UDVARDI, M. K.; RENNENBERG, H.; FLEMETAKIS, E. Cessation of photosynthesis in *Lotus japonicus* leaves leads to reprogramming of nodule metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v.64, n.5, p.1317–1332, 2013.
- TSIKOU, D.; KALLONIATI, C.; FOTELLI, M. N.; NIKOLOPOULOS, D.; KATINAKIS, P.; UDVARDI, M. K.; RENNENBERG, H.; FLEMETAKIS, E. Cessation of photosynthesis in *Lotus japonicus* leaves leads to reprogramming of nodule metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v.64, n.5, p.1317–1332, 2013.
- UDVARDI, M. K.; YANG, L. J. O.; YOUNG, S.; DAY, D. A. Sugar and amino-acid-transport across symbiotic membranes from soybean nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.3, n.5, p.334-340, 1990.
- VAN DE VELDE, W.; GUERRA, J. C. P.; KEYSER, A.; RYCKE, R.; ROMBAUTS, S.; MAUNOURY, N.; MERGAERT, P.; KONDOROSI, E.; HOLSTERS, M.; GOORMACHTIG, S. Aging in Legume Symbiosis. A Molecular View on Nodule Senescence in *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, v.141, p.711–720, 2006.
- VANCE, C. P.; HEICHEL, G. H. Carbon in N<sub>2</sub> fixation: limitation or exquisite adaptation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.373-392, 1991.
- VASCONCELOS, I.; ALVES, J. F.; LIMA, I. T. Nodulação do feijão-de-corda, *Vigna simensis* (L) Savi ao longo do ciclo cultural da planta. **Ciência Agrônômica**, v.6, p.11-15, 1976.
- VIEIRA NETO, S. A.; PIRES, F. R.; MENEZES, C.C. E.; MENEZES, J. F. S.; SILVA, A. G.; SILVA, G. P. & ASSIS, R. L. Formas de Aplicação de Inoculante e Seus Efeitos Sobre a Nodulação da Soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.861-870, 2008.
- VIKMAN, P.; VESSEY, J. K. Ontogenetic changes in root nodule subpopulations of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) I. Nitrogenase activity and respiration during pod-filling. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.563- 569, 1993.
- VINCENT, J.M. A. Manual for the Practical study of Root Nodule Bacteria. Oxford, **Blackwell Scientific Publications**, 1970, 164p (IBP Handbook, 15).
- WILLIAMS, L. E. & MILLER, A. J. Transporters Responsible for the Uptake and Partitioning of Nitrogenous solutes. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.659-688, 2001.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. A. e RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, v.19, n.1, p.25-33, 2006.
- XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, v.37, p.561-564, 2007.

- ZILLI, J. E. **Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para a inoculação de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em áreas de Cerrado**. 2001. 112p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- ZILLI, J. E.; CAMPO, R. J. e HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.2, p.335-338, 2010b.
- ZILLI, J. E.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; COSTA ROUWS, J. R. & HUNGRIA, M. Inoculação da soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1875-1881, 2010a.
- ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. R.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **ACTA AMAZONICA**, v.39, p.749-758, 2009.
- ZILLI, J. E.; NETO, M. L. S.; FRANÇA, I. J.; 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**, v.35, p.739-742, 2011.
- ZILLI, J. E.; PEREIRA, G. M. D.; JÚNIOR, I. F.; SILVA, K.; HUNGRIA, M.; ROUWS, J. R. C. Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. **ACTA AMAZONICA**, v.4, p.153-160, 2013.
- ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.811-818, 2006.

## 10 ANEXOS

### **Anexo à Instrução Normativa Secretária Defesa Agropecuária 13, de 25/03/2011**

#### **PROTOCOLO OFICIAL PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE CEPAS, INOCULANTES E TECNOLOGIAS RELACIONADOS AO PROCESSO DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM LEGUMINOSAS.**

A metodologia aqui descrita é própria para soja, feijão, caupi e outras leguminosas, com as devidas adaptações técnicas e metodológicas para cada cultura como, por exemplo, exigência climática, espaçamento, época de plantio, cultivar recomendada, adubação e calagem.

#### **Ensaio em Casa de Vegetação**

Os ensaios em casa de vegetação devem ser conduzidos na avaliação de cepas e de produtos que se destinam ao uso em ambiente protegido.

A apresentação de resultados de avaliação em casa de vegetação de outros produtos inoculantes e de tecnologias é opcional.

#### **Tratamentos:**

Tratamento sem inoculação; 2. Tratamento sem inoculação, com N na concentração recomendada para a cultura\* 3. Tratamentos com inoculação de cepas já recomendadas para a cultura, testadas separadamente, quando existentes; 4. Tratamentos com inoculação das cepas a serem testadas separadamente.

\* O nitrogênio deverá ser parcelado semanalmente. Exemplos de requerimento do nutriente por planta: Soja: 700mg; Feijão e Caupi: 350mg

Estágios de avaliação: as cepas ou produtos devem ser avaliados em vasos de Leonard e vasos com solo, com no mínimo quatro repetições para cada tratamento, conforme descrito:

-Vasos de Leonard ou sistemas semelhantes que permitam o cultivo sob condições de substratos estéreis: Colocar sementes desinfestadas e ou plântulas em vasos Leonard autoclavados preenchidos com um substrato e solução nutritiva de Norris 1, ou solução equivalente. Inocular conforme os objetivos de cada estudo.

-Vasos com solo: Plantar as sementes desinfestadas em vasos com solo, preferencialmente livre ou com baixas populações de rizóbios e baixo teor de nitrogênio. Em solos com teores elevados de matéria orgânica adicionar palha de arroz ou milho na proporção de 1 a 3 gramas de palha por quilograma de solo seco, ou realizar outro procedimento para imobilização do N de fonte orgânica. Inocular conforme os objetivos de cada estudo.

Observação: Cuidados normais de assepsia devem ser observados durante o preparo dos vasos, inoculação e condução dos testes.

#### **Parâmetros mínimos a serem avaliados:**

Especificamente para seleção de cepas deve-se avaliar o número e a massa de nódulos secos (g/planta ou vaso). Na seleção de cepa e na avaliação de inoculantes devem também ser avaliados a massa seca da parte aérea (g/planta) de plantas cortadas no ponto de inserção dos cotilédones e nitrogênio total na massa seca (mg de N/planta). A eficiência nodular (mg de N da massa seca de planta/mg de nódulos secos) pode ser calculada a partir dos parâmetros determinados. Opcionalmente pode ser medido o teor de clorofila nas folhas.

Aos 35-40 dias após emergência fazer o corte das plantas e separar as raízes da parte aérea no ponto de inserção dos cotilédones. Separar os nódulos das raízes, contar, secar em estufa a 65° até atingir massa constante, apresentado o resultado em g/planta ou vaso. Secar a parte aérea das plantas, como descrito anteriormente, pesar, moer e determinar os teores de N

na massa seca. Apresentar os resultados da massa seca das plantas em g/planta ou vaso, N total

na massa seca em mg de N/planta. De posse dos parâmetros N total na massa seca (mg) e da massa seca de nódulos (mg) determinar a eficiência nodular que é igual a mg de N total da massa seca dividido mg de nódulos secos.

### **Ensaio no Campo**

A área a ser utilizada para instalação do experimento deve ser preparada e ter suas características químicas e físicas determinadas. Se possível fazer análise foliar da cultura anterior para facilitar a adubação com os macro e micronutrientes necessários.

O solo a ser utilizado não deverá apresentar população estabelecida do rizóbio em estudo. Na impossibilidade de atendimento deste requisito a população deverá ser quantificada e incluída no relatório técnico-científico.

Os experimentos deverão ser delineados a campo em blocos ao acaso com no mínimo quatro repetições. A semeadura das parcelas deverá ser feita de forma a evitar contaminação entre as parcelas experimentais. As parcelas experimentais deverão ter uma dimensão que possibilite uma área útil experimental suficientemente representativa. No caso específico da soja e feijão as parcelas deverão ter tamanho mínimo de 24,0 e 10 m<sup>2</sup>, área útil mínima de 6,0 e 4,0 m<sup>2</sup>, respectivamente, observados distância mínima entre parcelas de um metro para evitar contaminações. Sugere-se para soja: parcelas de 4 x 6 m (oito linhas espaçadas de 0,5 m) colhendo as 4 linhas centrais ou 5 x 5 m (dez linhas espaçadas 0,5 m) colhendo as seis linhas centrais, deixando sempre um metro de bordadura nas cabeceiras.

### **Tratamentos:**

O experimento de campo deverá conter, no mínimo, os seguintes tratamentos:

Tratamento 1. Ausência de fertilizante nitrogenado e de inoculação; Tratamento 2. Controle com N-mineral; Tratamento 3. Inoculação padrão com inoculante turfoso contendo ao menos uma das cepas recomendadas para a cultura, quando existente. Tratamento 4. Demais tratamentos a serem testados – seguir a recomendação técnica do proponente.

### **Observações:**

Tratamento 2. As seguintes doses e formas de aplicação de nitrogênio são recomendadas: Soja - 200 kg de N/ha, sendo 50% na semeadura e 50% na floração ou aos 35 dias após emergência, por ocasião da coleta de plantas; Feijão - 80 kg de N/ha, sendo 20 kg no plantio e 60 kg aos 20-25 dias após emergência; Caupi - 70 kg de N/ha, sendo 35 kg no plantio e 35 kg aos 20-25 dias após emergência;

Tratamento 3. A inoculação padrão consiste em umedecer as sementes com água açucarada a 10%, usando no máximo 300 ml por 50 kg de sementes, e aplicação de acordo com a recomendação técnica (em número de UFC por semente) de um inoculante turfoso com população mínima legalmente estabelecida. O cálculo do número de células por semente deve tomar por base que um kg de semente de soja tem 7000 sementes e um kg de feijão ou de caupi tem 5000 sementes. Para outras espécies, considerar o número de sementes por quilograma. As sementes inoculadas devem secar em local fresco e arejado e a semeadura deve ser feita imediatamente após a secagem, em período não superior a duas horas. Como a maioria dos produtos químicos pode ser tóxica quando em contato direto com a bactéria, os insumos usados para tratamento de sementes (micronutrientes, fungicidas e inseticidas) devem ser evitados ou, se utilizados, não devem ter contato direto com o inoculante. No caso de ser necessária a aplicação de micronutrientes, recomenda-se que a aplicação seja feita por pulverização foliar antes da floração na mesma dose recomendada para as sementes ou segundo as recomendações técnicas para cada cultura e região.

**Recomendação Geral:** Sempre usar a mesma população de células para a inoculação padrão e para os inoculantes ou cepas em teste. No caso de inoculantes líquidos, o total de líquido a ser aplicado nas sementes não deve ultrapassar 300 ml por 50 kg de sementes.

Parâmetros mínimos a serem avaliados a campo:

- Caracterização química e física do solo

Devem ser realizadas as análises químicas necessárias à verificação do requerimento de adubação. A classificação do solo e sua classe textural deverão ser informadas.

- População de rizóbio

O solo da área experimental deverá ter a população de rizóbios determinada.

- Nodulação

Coletar cinco plantas com as raízes intactas, da área central da segunda linha de cada parcela, imediatamente antes da floração (no caso da soja aos 30 - 35 dias após emergência). Apresentar resultados para número de nódulos por planta (no/planta) e massa de nódulos seca por planta (mg/planta).

- A avaliação da biomassa e nitrogênio total da parte aérea das plantas

Deve ser feita por ocasião da coleta de nódulos.

- Rendimento de Grãos O rendimento de grãos deve ser corrigido para 13% de umidade e expresso em kg/ha. Determinar os teores de N nos grãos e expressar em mg/kg e o N total nos grãos expressar em kg de N/ha.

- Análise estatística

Os resultados devem ser submetidos à análise de variância e, quando o teste “F” for significativo a 5%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas por um teste de média adequado, também ao nível de 5% de significância. Se o teste de “F” não for significativa a 5% mas apresentar significância a 10%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas pelo teste de média, também ao nível de 10% de significância.

- Interpretação dos Resultados

Para recomendação de inoculantes e/ou outras tecnologias, estes devem apresentar resposta igual ou superior à inoculação padrão e/ou às tecnologias já recomendadas, respectivamente, e superior ao controle sem inoculação nos quatro ensaios. Para recomendação de nova cepa, esta deve apresentar resposta igual ou superior a pelo menos uma cepa já recomendada para a mesma cultura, e superior ao controle sem inoculação nos quatro ensaios. No caso da condução de um maior número de experimentos, o número de casos positivos deve representar pelo menos 70% do total. No caso da soja, a produtividade mínima a ser considerada deve ser de 2000 kg/ha, para feijão deve ser de 1000 kg/ha e para Caupi de 500kg/ha, para que o resultado do experimento seja considerado válido.