



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - POSAGRO

SHIRLANY RIBEIRO DE MELO

**DESEMPENHO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE
NITROGÊNIO EM CULTIVARES DE
FEIJÃO-CAUPI EM RORAIMA**

**BOA VISTA
RORAIMA - BRASIL
2009**

SHIRLANY RIBEIRO DE MELO

Desempenho da fixação biológica de nitrogênio em cultivares de
feijão-caupi em Roraima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Roraima em parceria com a EMBRAPA - Roraima.

Boa Vista
Roraima - Brasil
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M528d Melo, Shirlany Ribeiro de.
Desempenho da fixação biológica de nitrogênio de cultivares de feijão-caupi em Roraima / Shirlany Ribeiro de Melo – Boa Vista, 2009.
59 p.

Orientador: Dr. Jerri Édson Zilli.
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia - POSAGRO, Universidade Federal de Roraima.

1 – Agronomia. 2 – Fitopatologia. 3 – Feijão. 4 – Roraima. I - Título.

SHIRLANY RIBEIRO DE MELO

Desempenho da fixação biológica de nitrogênio em cultivares de
feijão-caupi em Roraima

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Agronomia, área de
concentração em Produção Vegetal, da
Universidade Federal de Roraima em
parceria com a EMBRAPA - Roraima.

Aprovada em: 27 de março de 2009

Pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli
Orientador - Embrapa Roraima

Prof. Dr. José Maria Arcanjo Alves
UFRR

Pesquisador Dr. Aloísio Alcântara Vilarinho
Embrapa Roraima

Pesquisadora Dra. Liamara Perin
PNPD/Capes

DEDICATÓRIA

À **Minha Família** que tanto amo, **meus pais**, Alcimir Pereira de Melo e Josefa Ribeiro de Melo e **minhas irmãs**, Sheyla de Melo Oliveira, Aliny Maria Ribeiro de Melo e Ynnaê Estela Ribeiro de Melo que tanto amo e aos meus sobrinhos Ana Beatriz Melo Oliveira e Ian Felipe Melo Oliveira.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por tudo que tenho conseguido;

Ao **meu orientador**, pela constante orientação e paciência;

À **Universidade Federal de Roraima - UFRR**, em particular ao Centro de Ciências Agrárias - CCA, pela realização deste mestrado;

À **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA**, pela parceria na realização do mestrado;

Aos **professores da banca examinadora**, pela participação e valorosas sugestões apresentadas a este trabalho.

A **todos os professores do Curso de Mestrado em Agronomia**, pelos ensinamentos transmitidos;

Às amigas **Rosianne Nará Thomé Barbosa** e **Lionésia da Silva Esbell**, pelo companheirismo, carinho e incentivo em todos os momentos;

Aos **colegas da turma**, pela colaboração e torcida para o êxito;

À amiga **Sarita Socorro Campos Pinheiro**, pelo incondicional apoio;

Aos **funcionários e estagiários do Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA**, pelo inestimável auxílio e colaboração na realização dos trabalhos, em especial para as técnicas de laboratório **Aliny Maria Ribeiro de Melo**, **Luzia Doraci Barbosa** e ao estagiário **Bruno Marçon**;

A **todos** que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo.

Agradeço.

BIOGRAFIA

Shirlany Ribeiro de Melo, filha de Alcimir Pereira de Melo e Josefa Ribeiro de Melo, nasceu na cidade de Boa Vista, Roraima, em 26 de abril de 1974.

Concluiu o ensino médio pela Escola de 1º e 2º graus Gonçalves Dias, no ano de 1991 e graduou-se em Bacharelado em Agronomia, na Universidade Federal de Roraima, no ano de 2000.

Cursou Especialização em Proteção de Plantas, em Viçosa, Minas Gerais, no ano de 2002, e em Extensão Rural para o Desenvolvimento Sustentável na cidade de Belém, Pará, nos anos de 2005 e 2006.

Iniciou o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, na Universidade Federal de Roraima, em março de 2007, desenvolvendo seu trabalho de pesquisa junto ao laboratório de microbiologia da EMBRAPA Roraima.

MELO, Shirlany Ribeiro de. **Desempenho da Fixação Biológica de Nitrogênio em Cultivares de feijão-caupi Recomendadas para Roraima.** 2008. 63 p., Dissertação de Mestrado / Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em cinco cultivares de feijão-caupi - BR-17 Gurguéia, BRS Guariba, BRS Mazagão, UFRR Grão Verde e Pretinho Precoce 1. Em 2007, conduziu-se um experimento em casa de vegetação e outro em campo, utilizando um esquema fatorial com cinco cultivares de feijão-caupi, três fontes de nitrogênio (adubação com uréia na dose de 50 kg ha⁻¹ de N, inoculação com as estirpes de Bradyrhizobium BR 3262 e BR 3267) e um controle absoluto. Aos 35 dias, após a emergência das plantas, avaliou-se o número e a massa seca de nódulos, massa da matéria seca e N-total da parte aérea, eficiência nodular em casa de vegetação e o rendimento de grãos na colheita em campo. Em casa de vegetação, observou-se alta nodulação e eficiência nodular para ambas as estirpes em todas as cultivares, destacando-se BR 17 Gurguéia e Pretinho Precoce 1, com a maior e menor nodulação, respectivamente. No campo, a nodulação e o N-total foram menores para todas as cultivares, comparativamente à casa de vegetação, indicando interferência de fatores locais na FBN. Um aumento no rendimento de grãos ocorreu em todas as cultivares, em decorrência da inoculação, especialmente com a estirpe BR 3262, que mostrou capacidade para substituir a adubação nitrogenada. Os resultados também mostraram que as cultivares de feijão-caupi avaliadas respondem a inoculação com as estirpes avaliadas, indicando ser uma alternativa eficiente para o aumento da produtividade desta cultura, gerando um impacto econômico e ambiental positivo.

Termos para indexação: *Vigna unguiculata*, FBN, Bradyrhizobium.

MELO, Shirlany Ribeiro de. **Performance of the Biological Nitrogen Fixation in Cowpea Cultivars Recommended for Roraima-Brazil**. 2008. 63 p., Dissertação de Mestrado / Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

ABSTRACT

The work aimed to evaluate the biological nitrogen fixation (BNF) in five cowpea cultivars - BR-17 Gurguéia, BRS Guariba, BRS Mazagão, UFRR Grão Verde and Pretinho Precoce 1. In 2007, one green house and one field experiment were performed using a factorial design with five cowpea cultivars and three nitrogen sources (urea fertilization in the level of 50 kg ha⁻¹ of N, inoculation with BR 3262 and BR 3267 Bradyrhizobium) and a complete control. Thirty-five days after plants emergence, were evaluated the nodules number and dry weight, plants dry weight matter and total-N, nodular efficiency in the green house and the grains yield in field experiment on the harvest. In the green house, high nodulation and nodular efficiency were observed for both strains in all cultivars, with prominence to BR 17 Gurguéia and Pretinho Precoce 1, with the largest and smallest nodulation, respectively. The nodulation and total-N for all cultivars were smaller in the field, comparatively with the green house experiment, indicating the interference of local factors in the BNF. A grains yield increase was observed for all cultivars, in consequence of the inoculation, especially with the BR 3262 strain, that showed capacity to substitute the nitrogen fertilization. The results showed that cowpea cultivars recommended to Roraima have a good response to the inoculation with the strains evaluated showing that they are an efficient alternative to increase the yield of this crop, generating a positive economical and environmental impact to agriculture in Roraima.

Index terms: *Vigna unguiculata*, BNF, Bradyrhizobium.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. A cultura do feijão-caupi.....	16
2.2. Cultivares Recomendadas para Roraima.....	17
2.3. O Nitrogênio na Agricultura.....	18
2.4. Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	19
2.4.1 Importância da Fixação Biológica de Nitrogênio.....	21
2.4.2 A Fixação Biológica de Nitrogênio em Feijão-Caupi.....	22
2.4.3 Bactérias Recomendadas para a Cultura do feijão-caupi no Brasil.....	24
2.4.4 Resposta de Estirpes a FBN em Feijão-Caupi.....	25
2.4.5 Resposta de Cultivares de Feijão-Caupi a FBN.....	27
2.5. Fatores que Limitam a Simbiose Rizóbio-leguminosa.....	28
2.5.2 Fatores bióticos.....	31
3. ARTIGO A: DESEMPENHO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI EM RORAIMA	32
3.1 Resumo.....	32
3.2 Abstract.....	33
3.3 INTRODUÇÃO.....	34
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.4.1 Experimento sob Condições Controladas.....	35
3.4.2 Experimento de Campo	37
3.4.3 Análise Estatística.....	38
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICES	57
APÊNDICE A Tabela de Análise de Variância para o Experimento em Campo.....	58
APÊNDICE B Tabela de Análise de Variância para o Experimento em Casa de vegetação.....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA

PÁGINA

Tabela 1	Médias do número e massa de nódulos secos, massa seca da parte aérea, eficiência nodular e rendimento de grãos do feijão-caupi em experimentos conduzidos em casa de vegetação e área de cerrado em Roraima.	42
-----------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGUR A		PÁGINA
Figura 1	(A) Número e (B) massa de nódulos secos de plantas de feijão-caupi em experimento de casa de vegetação (CV) e campo em Roraima.	39
Figura 2	Nodulação em plantas de feijão-caupi em experimentos de casa de vegetação e campo em Roraima. (A) – Número de nódulos, (B) Massa de nódulos secos.	41
Figura 3	(A) Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e (B) N-total da parte aérea de plantas de feijão-caupi em experimento de casa de vegetação (CV) e campo em Roraima.	44
Figura 4	Rendimento de grãos de feijão-caupi em experimento de campo no Cerrado de Roraima; (A) Comparação dos diferentes tratamentos para fornecimento de nitrogênio; (B) Comparação das cultivares avaliadas.	46

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma fabaceae herbácea nativa da África. Sua produção está associada com cultivos de subsistência, tanto no Brasil, nas regiões Nordeste e Norte, quanto nos países africanos e asiáticos, onde os cultivos, em sua grande maioria, destinam-se à alimentação da família dos agricultores, e se constitui em uma das principais fontes de proteínas, principalmente para populações de baixa renda (FREIRE FILHO et al., 1998; TARAWALI et al., 2002).

Essa leguminosa apresenta alta rusticidade; ampla adaptabilidade às condições de estiagens e capacidade de se desenvolver satisfatoriamente em solos de baixa fertilidade; tolerância a estresse hídrico, térmico e salino (OLIVEIRA e CARVALHO, 1988; PINHO et al., 2005). Além disso, é uma cultura eficiente na fixação biológica de nitrogênio, o que permite ser introduzida em solos com baixos teores de matéria orgânica (ZILLI et al., 2006a).

Apesar dessas características, historicamente, o feijão-caupi no Brasil, apresenta baixa produtividade de grãos, com média entre 500 e 700 kg ha⁻¹. No entanto, o potencial produtivo da cultura é estimado em 6 t ha⁻¹, (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005; IBGE, 2006). Esta produtividade é, de forma geral, justificada pela baixa adoção de tecnologias nos cultivos, as quais são praticadas, na maioria das vezes, em lavouras de subsistência e em consórcios com outras culturas (SOUSA e MOREIRA, 2008).

O cultivo do feijão-caupi no estado de Roraima não difere da maioria dos cultivos no Brasil, pois, em geral, são praticados com baixa ou nenhuma adoção tecnológica, apresentando uma produtividade média de grãos entre 502 e 629 kg ha⁻¹, com aproximadamente 1500 ha de área cultivada (MENEZES et al., 2007).

O nitrogênio, por ser exigido em grandes quantidades pelos vegetais, é um dos nutrientes mais limitantes à produção de feijão-caupi e outras culturas, especialmente em regiões tropicais (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005). Nos solos das regiões Norte e Nordeste, um dos grandes problemas no cultivo agrícola é a baixa disponibilidade de nitrogênio no solo, que é agravada pelas altas taxas de mineralização da matéria orgânica (XAVIER et al., 2006a).

Esta baixa disponibilidade faz com que o N seja empregado em grande quantidade na agricultura moderna, na forma de fertilizantes minerais. No Brasil, entre 2005 e 2007, houve aumento no uso de fertilizantes em mais de 4 milhões de toneladas, sendo o consumo no último ano superior a 24 milhões de toneladas (CONAB, 2008). Em 2007, o aumento no consumo, aliado ao elevado preço do petróleo, tem motivado o aumento na ordem de 30% no preço dos fertilizantes nitrogenados (ANDA, 2008).

No entanto, os fertilizantes nitrogenados minerais utilizados em excesso oferecem riscos ao meio ambiente, podendo contaminar as águas subterrâneas, com efeitos sobre os mananciais e na saúde humana, além de exercer influência negativa na camada de ozônio, contribuindo para o aquecimento global (VIEIRA, 2004).

Neste contexto, a exploração de processos biológicos economicamente viáveis, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada por bactérias denominadas diazotróficas, apresenta-se como uma alternativa eficiente no aporte de nitrogênio no sistema solo-planta, na manutenção dos sistemas agrícolas, gerando um impacto econômico e ambiental positivo para a agricultura (CANTARELLA, 2007).

No Brasil, a importância econômica da pesquisa em fixação biológica de N₂ pode ser exemplificada pelos resultados obtidos com a soja, que devido ao melhoramento vegetal e seleção de rizóbios adaptados, com utilização de inoculantes com *Bradyrhizobium*, chegou a dispensar o uso de adubo nitrogenado, e tem proporcionado uma economia anual de US\$ 3 bilhões em fertilizantes nitrogenados, além de, anualmente, retornar ao sistema solo-planta um montante de nitrogênio também equivalente a três bilhões de dólares (HUNGRIA e CAMPO, 2005).

As pesquisas sobre a fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi têm avançado nos últimos anos. No entanto, a maior parte (cerca de 99%) dos inoculantes utilizados no Brasil destinam-se a cultura da soja e o restante é destinado a outras espécies de leguminosas, incluindo o feijão-caupi (MOREIRA, 2005). Um dos fatores da baixa exploração do processo de FBN na cultura do feijão-caupi está associado à forma de cultivo praticada e à falta de informação e acessibilidade aos inoculantes. Outro fator relevante é o fato deste vegetal apresentar baixa especificidade na nodulação, sendo capaz de nodular e

estabelecer simbiose com diversas espécies e estirpes de bactérias do grupo rizóbio (NEVES e RUMJANEK, 1997; ZILLI et al., 2006b; ZHANG et al., 2007; MOREIRA, 2008).

Além das peculiaridades inerentes ao microssimbionte, também tem sido mostrado que determinados genótipos de feijão-caupi apresentam maior capacidade de nodulação e eficiência na FBN, indicando a possibilidade de otimização das respostas à FBN com o uso de cultivares eficientes, ou mesmo com a implementação de programas de melhoramento vegetal visando a FBN (SANGINGA et al., 2000; FALL et al., 2003; XAVIER et al., 2006a).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a FBN em cinco cultivares de feijão-caupi, sendo duas recomendadas para o estado de Roraima (BRS Guariba e BRS Mazagão), duas em fase de recomendação (UFRR Grão Verde e Pretinho Precoce 1) e uma não recomendada oficialmente (BR-17 Gurguéia), porém utilizada pelos produtores da região, e sobre a qual se tem muito pouca informação no Estado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura do feijão-caupi

O feijão-caupi apresenta ampla distribuição mundial com área total cultivada em torno de 11,3 milhões de hectares, sendo o continente africano o principal produtor. Existem cultivos também na América do Sul, América Central, Ásia, Oceania, Sudoeste da Europa e nos Estados Unidos (FAO, 2008). O Brasil assume papel de destaque neste contexto, ocupando o terceiro lugar entre os maiores produtores mundiais, superado apenas por Nigéria e Níger (SINGH et al., 2002).

Planta Dicotyledonea, pertencente à ordem Fabales da Família Fabaceae, subfamília Faboideae da tribo Phaseoleae, Gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005). Apresenta características agrônomicas desejáveis, como ciclo curto, baixa exigência hídrica e reconhecida capacidade de se desenvolver satisfatoriamente em solos de baixa fertilidade, o que lhe confere rusticidade e capacidade de ser cultivado em quase todos os tipos de solo (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005).

No Brasil, o feijão-caupi é conhecido popularmente também como feijão-macaça, macáçar ou feijão-de-corda na região Nordeste; feijão-da-colônia, de praia e de estrada na região Norte (FREIRE FILHO et al., 1998). É uma cultura de destaque na economia destas regiões, representando cerca de 70% do feijão produzido na região Nordeste (VIEIRA, 1989) e cerca de 60% na região Norte (Zilli, comunicação pessoal).

Os principais estados brasileiros produtores de feijão-caupi são: Ceará, Piauí e Bahia na região Nordeste. Na região Norte e no estado do Pará apresenta-se como principal produtor, com área plantada estimada em 70.000 ha e produção em torno de 60.000 t por ano, porém, com baixa produtividade (860 kg ha⁻¹), seguido pelos estados de Tocantins, Amazonas, Amapá e Roraima, sendo que nos três últimos a produção de feijão-caupi atinge praticamente 100% da área cultivada com feijão (CRAVO e SOUZA, 2007; IBGE, 2008).

Na década de 90, o Brasil produziu, em média, 430 mil t ano⁻¹, colhidas em cerca de 1.300.000 ha. Estima-se também que a cultura seja responsável, anualmente, pela criação de 1,36 milhões de empregos e pela alimentação de mais de 23 milhões de brasileiros, com valor de produção da ordem de 250 milhões de dólares. O plantio anual é cerca de 1.500.000 ha, sendo mais de 90% destes localizados na região Nordeste (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005).

O feijão-caupi no estado de Roraima foi introduzido fortemente com o surgimento dos projetos de colonização. Esta cultura vem sendo desenvolvida para a subsistência na agricultura familiar (MENEZES et al, 2007). Segundo diagnóstico de produção, a área cultivada no estado é, em média, inferior a 1 ha por produtor, voltada prioritariamente para o auto-abastecimento e posterior comercialização dos excedentes. No entanto, os recursos financeiros aportados com a comercialização são insuficientes para investimento em tecnologias que resultem em aumento de rendimento e volume de produção (MENEZES et al., 2007).

2.2 Cultivares de feijão-caupi recomendadas para Roraima

No estado de Roraima, segundo o IBGE (2006), são plantados em torno de 1000 ha anuais de feijão-caupi, com produtividade média da ordem de 620 kg ha⁻¹. Esta produtividade, embora acima da média nacional, que é de pouco mais de 300 kg ha⁻¹, é baixa se comparada ao potencial da cultura, e não atende a toda demanda do estado (MENEZES et al., 2007).

Atualmente, são recomendadas para cultivo em Roraima 09 cultivares de feijão-caupi, lançados pela Embrapa. Todos com potencial produtivo acima de 1000 kg ha⁻¹. São elas cultivares BRS Guariba (porte semi ereto, recomendado em 2006), BRS Mazagão (porte semi-ereto e recomendado em 2002), BRS Amapá (porte semi-prostrado, recomendado em 2002), Vita 7 (porte semi-ereto, recomendado em 1995), Pitiúba (porte enramado, recomendado em 1995), Tracuateua (porte enramado, recomendado em 1995), BRS Nova era (porte semi ereto, recomendado em 2007) (VILARINHO et al., 2006). Além disso, em 2008, foram lançados pela Embrapa o BRS Cauamé (porte semi ereto, recomendado em 2008) e BRS

Xiquexique (porte semi-prostrado, recomendado em 2008) (VILARINHO et al., 2008a e b.).

Alguns genótipos de feijão-caupi são estudados no curso de agronomia da Universidade Federal de Roraima desde 1998. Atualmente, estão sendo consolidadas várias linhas de pesquisa visando à identificação de genótipos promissores e à obtenção de cultivares melhoradas para serem cultivadas em monocultivo e em consórcio, principalmente com a cultura da mandioca, nas condições edafoclimáticas do cerrado de Roraima (ALVES et al., 2007). Dentre eles, o cultivar UFRR Grão Verde (destinada à produção de grão verde, com produtividade acima de 4.000 kg ha⁻¹ de grão verde, alta precocidade e porte semi-ereto), e Pretinho Precoce 1 (porte semi-ereto, produtividade acima de 1.000 kg ha⁻¹) apresentam-se com cultivares promissores para produção em Roraima (ALVES et al., 2007).

2.3 O Nitrogênio na Agricultura

O nitrogênio (N) constitui aproximadamente 78% da atmosfera terrestre, na forma molecular N₂, essencial à sobrevivência e crescimento dos organismos vivos (NEWTON, 2000). Porém, esse grande reservatório de nitrogênio não está diretamente disponível para todos os organismos eucariontes e para a maioria dos procariontes, pois as moléculas de N₂ encontram-se unidas de maneira muito estável por uma tripla ligação, precisando, portanto ser convertido a uma forma assimilável por meio do fornecimento de temperatura (superior a 400 °C) e pressões (acima de 10⁷ pascal) obtidas por meio de derivados de petróleo, ou pela presença de um sistema enzimático apropriado, como é o caso da nitrogenase (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O nitrogênio está presente em vários compostos das plantas, destacando-se os aminoácidos, ácidos nucléicos e clorofilas. É um macronutriente primário, essencial para as plantas, por participar das principais reações bioquímicas, como formação de proteínas, aminoácidos e de outros compostos importantes no

metabolismo, sendo, portanto, considerado um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento vegetal no seu ambiente natural (EPSTEIN e BLOOM, 2005).

A deficiência desse elemento na forma assimilável pelos organismos vivos, especificamente pelas culturas, tem sido compensada com a fabricação de fertilizantes nitrogenados, onde mais de 100 milhões de toneladas são anualmente usados na agricultura (NEWTON, 2000). A conjuntura atual do crescimento da demanda global de alimentos gera a aceleração temporal dos processos agrícolas, mediante as inovações tecnológicas, provocando o uso, em larga escala, dos fertilizantes nitrogenados (MOSIER e GALLOWAY, 2005).

Dos nutrientes minerais, o nitrogênio é o mais caro, o que consome mais energia e potencialmente o mais poluente (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A utilização desses fertilizantes é percebida em efeito cascata que pode, em sequência, aumentar o ozônio atmosférico, contribuindo para o aquecimento global, gerando consequências sérias para a saúde humana. Pode, ainda, aumentar a quantidade de nitrato particulado no perfil do solo, contaminando as águas subterrâneas, acidificar a superfície das águas, ocasionando perda de biodiversidade, e promover eutrofização litorânea; além de alterar a produtividade florestal (GALLOWAY et al., 2003).

2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é um processo bioquímico natural e essencialmente desenvolvido por bactérias. Constitui um passo crucial do ciclo do nitrogênio e responde, em grande medida, pela manutenção da vida na Terra (LINDEMANN e GLOVER, 2003).

Os organismos responsáveis pela FBN são encontrados em vários ambientes, vivendo livremente ou associado a outros seres vivos, como por exemplo, em simbiose com leguminosas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Quando em simbiose, se estabelece uma relação mutualística entre o microssimbionte e a planta, ocorrendo uma parceria de troca mútua entre a bactéria e a planta, em que o

microrganismo fornece o nitrogênio à planta e esta, em troca, a supre com carboidratos (CASSINI e FRANCO, 2006).

O processo de simbiose em leguminosas ocorre no interior de estruturas específicas, denominadas nódulos, que se formam no sistema radicular. Estas bactérias, na forma de bacteróide, convertem o N_2 atmosférico em amônia, através do complexo enzimático da nitrogenase que é incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização pelas plantas (ARAÚJO e CARVALHO, 2006).

As espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas têm sido denominadas coletivamente de rizóbio, sendo a maioria pertencente à família Rhizobiaceae (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005). Até a década de 80, os rizóbios eram classificados em uma única família, com dois gêneros e seis espécies. Atualmente, entretanto, os rizóbios encontram-se em quatro famílias (Bradyrhizobiaceae, Hyphomicrobiaceae, Phyllobacteriaceae, Rhizobiaceae), 13 gêneros, entre eles: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*; 54 espécies e vários biovars, todos na ordem Rhizobiales (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; GRAHAM, 2008).

A simbiose de rizóbio com leguminosa é classificada como complexa, devido à grande heterogeneidade encontrada entre as estirpes de rizóbio e à suscetibilidade das estirpes aos fatores ambientais (MELLO e FARIA, 1998; ZILLI et al., 1998; STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999). Outro fator que determina a complexidade rizóbio-leguminosa é a população nativa dos solos, que pode apresentar-se em baixas ou altas concentrações. Esta população caracteriza-se pela baixa eficiência e alta capacidade de formar nódulos, o que é um fator limitante à nodulação com estirpes mais eficientes inoculadas (NEVES e RUMJANEK, 1997).

Portanto, para que se alcancem os benefícios na simbiose, é necessário que a planta esteja eficientemente nodulada, o que depende de uma série de fatores relacionados com a planta, a bactéria, o solo e a interação entre eles (MARTINS, 1996). Dentre eles, destacam-se a efetividade e competitividade das estirpes presentes no inóculo ou no solo, riqueza do inóculo em número de células, técnicas de inoculação, semeadura e fatores ambientais, principalmente os fatores químicos e físicos do solo (VARGAS e HUNGRIA, 1997; ZILLI et al., 1998; STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999), que asseguram a sobrevivência e multiplicação do rizóbio no solo, a rápida nodulação e adequada fisiologia da planta.

A seleção dessas estirpes é uma etapa de fundamental importância na produção de inoculantes comerciais para inoculação com estirpes eficientes, buscando o melhor desenvolvimento das plantas no campo (JESUS et al., 2005).

2.4.1 Importância da Fixação Biológica de Nitrogênio

Estima-se que a FBN contribua com a maior parte do N fixado anualmente - 175 milhões de toneladas, ou seja, 65% do total, fazendo com que este seja considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese, juntamente com a decomposição orgânica (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A exploração da FBN na produção agrícola oferece cerca de 30% do nitrogênio necessário ao desenvolvimento das culturas, que é estimado em mais de 100 Tg anualmente (GALLOWAY et al., 2003). Desta forma, há a contribuição para o aumento da produção vegetal, a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, a recuperação de áreas degradadas e o incremento da fertilidade e da matéria orgânica do solo. Entretanto, sua principal vantagem, em curto prazo, está associada à economia no uso de fertilizantes nitrogenados industrializados.

No caso da soja, esse valor representa cerca de 3,2 mil toneladas ano⁻¹ de N (CANTARELLA, 2007). Enquanto que, nos últimos anos, a utilização de inoculantes com rizóbios na cultura da soja proporcionou, para o Brasil, uma economia em fertilizantes nitrogenados de pelo menos U\$ 3 bilhões anualmente, que seriam necessários para manter a atual produtividade da cultura (ZILLI et al., 2006b).

Para o feijão-caupi, embora não se saiba a real contribuição da FBN para a economia nacional, verifica-se que, se a produtividade anual fosse mantida com a aplicação de nitrogênio mineral, seria necessário um investimento equivalente a US\$ 13 milhões somente para a região Nordeste, o que indica a magnitude da contribuição da FBN para o feijão-caupi nessas regiões (SILVA et al., 2002; FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005).

Considerando-se que a inoculação substitua a aplicação de 80 kg ha^{-1} , a economia advinda da FBN chegaria a algo em torno de 250 a 300 reais por ha (ZILLI et al., 2006b). Pesquisas conduzidas no Brasil, e também na África, mostram que a simbiose caupi/rizóbio é capaz de acumular de 50 a 120 kg ha^{-1} de N (WANI, RUPELA e LEE, 1995) o que representa de 35 a 70% do total de N assimilado pela cultura (BODDEY et al., 1990).

2.4.2 A Fixação Biológica de Nitrogênio em feijão-caupi

A FBN é reconhecidamente eficiente em feijão-caupi que, quando bem nodulado, pode dispensar outras fontes de N e atingir altos níveis de produtividade (RUMJANEK et al., 2005). Segundo estes autores, estimativas da contribuição da FBN no campo são, entretanto, bastante variáveis, tendo sido obtidos valores numa faixa de 40 a 90% do total de N acumulado pela cultura. Essa variabilidade pode ser atribuída a diferenças tanto do genótipo da planta quanto do rizóbio, que podem influenciar os níveis de FBN.

No entanto, a simbiose entre feijão-caupi e rizóbio é relatada frequentemente como sendo de baixa especificidade, pois, reconhecidamente, esta leguminosa é capaz de nodular com diversas espécies de bactérias do grupo rizóbio, especialmente dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia* e *Azorhizobium* (LEWIN et al., 1987; MPEPEREKI, WOLLUM e MAKONESE, 1996; NEVES e RUMJANEK, 1997; GONÇALVES e MOREIRA, 2004; ZILLI et al., 2006a; ZHANG et al., 2007; MOREIRA, 2008), além de nodular efetivamente com rizóbios nativos, apesar desta cultura não ser originária do Brasil (MARTINS, 1996; ZILLI et al., 1999).

Alta diversidade entre as estirpes nodulantes de feijão-caupi tem sido observada com frequência (MARTINS et al., 1996). Estes autores realizaram um massivo isolamento de rizóbios nodulantes de feijão-caupi no Nordeste brasileiro e observaram alta diversidade entre os isolados, sendo que, pelo menos, 25% eram de crescimento rápido. Estes resultados corroboram com os encontrados por Soares

et al., (2006) que ao estudarem eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões – MG, concluíram que, apesar de ser o feijão-caupi uma espécie geralmente relatada como formadora de simbiose com estirpes de crescimento lento, pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, ela pode nodular com gêneros de crescimento rápido, como *Sinorhizobium*.

Esta baixa especificidade é comprovada por Mpeperekí, Wollum e Makonese, (1996) que ao estudarem a simbiose de estirpes de crescimento lento e rápido entre 59 estirpes de rizóbio obtidas de nódulos de feijão-caupi e 9 estirpes-referência de rizóbios inoculadas em 12 leguminosas tropicais, verificaram que as estirpes de rizóbio nativas apresentaram uma estreita faixa de hospedeiros (em média 2,4 hospedeiros para as estirpes de crescimento rápido e 2,3 hospedeiros para estirpes de crescimento lento), e que o feijão-caupi é capaz de nodular com uma grande diversidade de rizóbios, uma vez que nodulou com todas as estirpes testadas, inclusive as estirpes isoladas do gênero *Phaseolus*.

Apesar da baixa especificidade, diversos estudos já comprovaram que a inoculação com estirpes selecionadas pode resultar, em produtividades iguais ou superiores, quando comparadas à adição de fertilizantes nitrogenados (XAVIER et al., 2006a; MELO e ZILLI, 2008).

Trabalhos desenvolvidos no semi-árido nordestino têm mostrado a obtenção de rendimentos de grãos significativos, com a utilização de inoculantes com estirpes eficientes (MARTINS et al., 2003). Em experimentos conduzidos em condições de campo, estes autores obtiveram rendimentos de grãos de aproximadamente 700 kg ha⁻¹ em tratamentos inoculados, sendo semelhantes ao uso de adubação nitrogenada na dose de 50 kg ha⁻¹ de N, na forma de uréia, dose aplicada quando esta prática é utilizada pelos produtores da região.

Em experimentos no sul de Minas Gerais, com inoculação de estirpes selecionadas oriundas da Amazônia, os rendimentos de grãos alcançaram entre 1.000 e 1.400 kg ha⁻¹, semelhantes ao controle com 70 kg ha⁻¹ de nitrogênio, sendo esses significativamente superiores às produtividades obtidas no tratamento do controle com as estirpes nativas, entre 350 e 1.000 kg ha⁻¹ (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006).

Apesar dos resultados serem satisfatórios, observa-se frequentemente, para a cultura do feijão-caupi, uma grande nodulação espontânea, especialmente em

áreas de mata, mostrando potencial de bactérias nativas presentes no solo como inoculantes (ZILLI et al., 2006b).

2.4.3 Bactérias recomendadas para a cultura do feijão-caupi no Brasil

A inoculação de estirpes de rizóbio em leguminosa é uma tecnologia que permite alcançar a diminuição ou a completa exclusão dos fertilizantes nitrogenados (FERNANDES JUNIOR, 2006). Estirpes eficientes já foram selecionadas para cerca de 100 espécies leguminosas por várias instituições de pesquisa brasileira, tendo sido comercializado cerca de 26 milhões de doses de inoculante (produzidos no Brasil e importados) em 2003 (RUMJANEK e XAVIER, 2007).

A reunião da RELARE (Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola), realizada em junho de 2004, recomenda duas estirpes de *Bradyrhizobi*: a INPA3-11B e a UFLA3-84, resultantes de experimentos realizados na Universidade Federal de Lavras (UFLA) (RUMJANEK e XAVIER, 2007).

Em 2006, a RELARE recomendou a estirpe BR 3267. Os testes de seleção desta estirpe foram desenvolvidos pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica/RJ) e Embrapa Semi-Árido (Petrolina/PE), onde foi observado ganhos de produtividade para a cultura do feijão-caupi de até 30% em experimentos de campo e de até 52% em áreas de agricultores experimentadores. (RUMJANEK e XAVIER, 2007).

Em pesquisas realizadas pela Embrapa Roraima, em parceria com a Embrapa Agrobiologia (Seropédica - RJ), avaliou-se uma nova bactéria (BR 3262) para a inoculação de sementes de feijão-caupi, cujos resultados mostraram um aumento de até 30% na produtividade de grãos nos plantios deste feijão em Roraima. Os experimentos foram realizados entre 2005 a 2007, em áreas de mata e cerrado, com fins de avaliar a eficiência de quatro estirpes de bactérias para a fixação biológica de nitrogênio. O resultado dos estudos gerou, em 2008, a recomendação da estirpe BR3262 para ser utilizada na produção de inoculante para sementes de feijão-caupi em Roraima (ZILLI et al., 2007; 2008).

2.4.4 Resposta de estirpes a FBN em feijão-caupi

A fixação biológica de nitrogênio é mediada por ampla gama de microrganismos procariotos, com substancial diversidade morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética. Tal diversidade garante a ocorrência desse processo nos mais diferentes habitats terrestres. Contudo, apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 1% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Essa grande variabilidade é observada na habilidade das estirpes em infectar, nodular e fixar o nitrogênio atmosférico, associada à influência exercida pela planta através de características intrínsecas, podendo levar estirpes eficientes na fixação do N₂ em algumas espécies de leguminosas hospedeiras a apresentarem baixa eficiência na fixação (XAVIER et al., 2006a).

Neste contexto, vários estudos vêm sendo realizados visando identificar as estirpes que melhor respondem à inoculação em ambiente tropical, onde diversos autores demonstram que a inoculação em feijão-caupi apresenta resultados positivos. Por exemplo, Martins et al. (2003), em experimentos na região do semi-árido nordestino, observaram que a inoculação da estirpe BR 3267 em feijão-caupi propiciou produtividade equivalente às obtidas com tratamentos de adubação nitrogenada, 50 kg de N ha⁻¹.

No município de Perdões (Minas Gerais), Soares et al. (2006), visando estudar a eficiência simbiótica, observaram que a inoculação com as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. UFLA 03-84 e INPA03-11B contribuiu, de forma significativa, para o aumento no rendimento de grãos do feijão-caupi, que variaram de 341 a 952 kg ha⁻¹, sendo estes tratamentos semelhantes ao da testemunha, que recebeu uma adubação mineral de 70 kg ha⁻¹, e superiores ao tratamento inoculado com a estirpe de referência BR 2001. Enquanto que Pereira et al., (2004) ao avaliar essas mesmas estirpes em Poços de Caldas (MG), obtiveram produção de grãos similares à adubação nitrogenada de 80 kg de nitrogênio ha⁻¹, e também superiores à BR 2001.

Em Roraima, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* spp. (incluindo BR3267, INPA 03-11b, BR3262, e UFLA 03-84) foram avaliadas nos anos de 2005 e 2006,

em áreas de cerrado e mata. Todas as estirpes testadas mostraram potencial para substituir uma adubação nitrogenada de cerca de 80 kg ha⁻¹ de nitrogênio mineral. As estirpes BR3262 e INPA 03-11b, isoladas em solo amazônico, tiveram grande destaque, pois proporcionaram rendimentos de grãos superiores ao controle absoluto e igual ao tratamento nitrogenado (ZILLI et al., 2006a).

Ao avaliar a estirpe INPA03-11B inoculada em variedades de feijão-caupi, nas condições edafo-climáticas de Confresa (MT), Sousa e Moreira (2008) verificaram um incremento de cerca de mais de 35% no rendimento de grãos, comparado à produtividade sem N-mineral e sem inoculante, apresentando-se como alternativa de baixo custo para os agricultores da região.

Estudos feitos por Lacerda et al. (2004), mostraram que as estirpes UFLA 03-35, UFLA 03-36 e UFLA 03-129 são mais eficientes que a estirpe BR 2001 na produção de matéria seca da parte aérea do feijão-caupi, em casa de vegetação, e a inoculação das sementes no campo com as estirpes INPA 03-11B, UFLA 03-36, UFLA 03-84 e UFLA 03-129 resultaram em rendimentos de grãos equivalentes ao da testemunha, que recebeu nitrogênio mineral.

As avaliações realizadas com a estirpe BR 3262, em experimentos em áreas de cerrado e mata alterada em Roraima resultou em um aumento de produtividade de até 30% do feijão-caupi, em relação aos plantios que não receberam inoculação. Os resultados de Roraima mostraram, ainda, que para este ecossistema, a recomendação da estirpe BR 3262, isolada do Sistema Integrado de Produção Agroecológica em Seropédica (RJ), pode garantir ganhos de produtividade expressivos (ZILLI et al., 2008).

Na avaliação da eficiência simbiótica de rizóbio em feijão-caupi, Soares (2007) observou que as estirpes BR 3262 e BR 3299 apresentaram desenvolvimento similar àquelas já recomendadas oficialmente para a cultura do feijão-caupi e a adubação mineral nitrogenada nas dosagens de 50 e 80 kg ha⁻¹. Quando foram usadas as estirpes BR 3302, BR 3267, BR 3301 e o controle no cultivo do feijão-caupi, houve a produção de sementes com maior percentual de germinação. Enquanto que Xavier et al. (2006b) ao avaliar o desempenho de estirpes de rizóbio no primeiro ano de experimentação em quatro regiões do Nordeste e duas no Norte, observaram um incremento de cerca de 230% de aumento com a estirpe BR3299 em relação ao controle absoluto (sem inoculação e N mineral).

2.4.5 Resposta de cultivares de feijão-caupi a FBN

O feijão-caupi possui grande capacidade de fixar nitrogênio em associação com bactérias do grupo rizóbio. Entretanto, observa-se resposta diferenciada quanto à habilidade em fixar nitrogênio entre diferentes genótipos e estirpes (MANDAL et al., 1999).

Neste contexto, estudos são realizados visando avaliar a eficiência simbiótica entre hospedeiro e rizóbio, objetivando o aumento do rendimento desta cultura. No agreste paraibano, as cultivares IPA-206, Sedinha, Corujinha, Canapú, Sempre Verde e Azul, ao serem inoculadas com as estirpes BR 3267 e BR 2001, mostraram resultados bastante promissores, resultando em nodulação, teores e conteúdos de N maiores que os obtidos com EI 6 e NFB 700. Em geral, Sempre Verde e Sedinha foram as cultivares com os melhores resultados, destacando-se Sempre Verde com boas respostas à inoculação com todas as estirpes (VIEIRA, 2007).

Ao avaliar as cultivares BRS Guariba e BRS Marataoã inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii*, em Teresina, no Piauí, Gaulter (2007) observou que a cultivar Guariba foi superior a Marataoã, obtendo produtividade de grãos superiores aos da média nacional.

Na avaliação da FBN, em cultivares de feijão-caupi de origens senegalesas, (FALL et al., 2003) verificaram que a cultivar Diongoma apresentou maior resposta a fixação de nitrogênio em relação a cultivar Mouride.

Avaliações da resposta de cultivares de feijão-caupi à inoculação com estirpes hup+, huphr e hup de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, (SOUZA et al., 1999) observaram que a cultivar VITA-4 apresentou comportamento superior em relação às demais, com nodulação significativamente maior em comparação às cultivares IPA-202 e BR-3.

Em estudo comparando genótipos de feijão-caupi com variabilidade genética do Brasil, Estados Unidos e Nigéria, foi observada seletividade na interação entre estes acessos e as estirpes de *Bradyrhizobium*, utilizadas como inoculantes, caracterizando a importância do componente vegetal nestes estudos. As estirpes 3269, 3271, 3273, 3300 e 3267, quando inoculada no genótipo BR-17, foi capaz de

formar maior número e massa de nódulos em relação ao genótipo Au 94-MOB 816 (XAVIER et al., 2005; 2006a).

Ao comparar produtividade de cultivares de feijão-caupi em resposta à inoculação em experimentos realizados em diferentes localidades do Nordeste (PI, PB, PE) e Norte (RR), (XAVIER et al., 2006b) verificaram diferenças significativas da cultivar BRS Mazagão (RR) em relação a IPA-206 (PE). Observou ainda resultados expressivos entre as cultivares Canapú e IPA-206, ambas em Pernambuco.

2.5 Fatores que limitam a simbiose rizóbio-leguminosa

2.5.1 Fatores edafoclimáticos

Em condições de clima tropical, os principais fatores abióticos que afetam o potencial da fixação biológica de nitrogênio são: temperatura, acidez e toxidez de alumínio, salinidade e baixa fertilidade do solo (THIES et al., 1991a).

O solo com temperatura elevada tem frequentemente, representado um dos principais fatores climáticos limitantes à FBN em regiões tropicais, uma vez que afetam praticamente todas as etapas de crescimento do rizóbio e das plantas hospedeiras, sendo os efeitos ainda mais drásticos na simbiose (HUNGRIA e VARGAS, 2000).

A simbiose do feijoeiro se fixa completamente entre 20° e 40°C. Em temperaturas superiores a 40°C, os plasmídeos, que transportam os genes simbióticos, podem ser perdidos (VARGAS e HUNGRIA, 1997). Por outro lado, baixas temperaturas reduzem a formação de nódulos e a fixação de nitrogênio em leguminosas de clima tropical (PADMANABHAN, 1990).

O feijão-caupi é reconhecidamente tolerante a altas temperaturas e, as bactérias, especialmente do gênero *Bradyrhizobium* que ocorrem e nodulam amplamente esse vegetal em solos tropicais, possuem tolerância variada (VALICHESKI et al., 2001). Estudando um grupo de estirpes provenientes do semi-

árido nordestino e mata Atlântica do Rio de Janeiro, Xavier et al., (2007) observaram respostas variadas quanto à tolerância a estresses térmicos. Em experimento com aplicação de choque térmico (40°C-42°C; 3 dias; 5h diárias), algumas estirpes, entre elas BR3262, conseguiram retomar satisfatoriamente o processo de FBN, enquanto outras não, mostrando a possibilidade de seleção de estirpes mais tolerantes a altas temperaturas de solo.

O pH representa um fator limitante à sobrevivência e ao estabelecimento do rizóbio no solo. A faixa de pH para a sobrevivência do rizóbio e a efetivação da nodulação parece não ser uma regra (WANI, RUPELA e LEE, 1995), são capazes de nodular em pH entre 4,9 a 8,1. No entanto, pH neutro favorece a exsudação de carbono pelas raízes, o que interfere na sobrevivência e a competição do rizóbio no solo, pois compostos de carbono são substratos para os microorganismos que vivem na rizosfera (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Em solos ácidos, há um aumento na solubilidade de Al^{+3} e Mn^{+2} e diminuição da concentração de fosfatos, Ca^{+2} e molibdatos. O alumínio reduz a atividade das células de rizóbio, próximo à divisão celular, aumentando o tempo de geração de células, causando uma queda na população de rizóbio, uma vez que a taxa de mortalidade se torna mais alta que a multiplicação celular (HUNGRIA e VARGAS, 2000; WATKIN, O'HARA e GLENN, 2003). Este efeito, entretanto, varia entre as espécies leguminosas e também entre espécies e estirpes de rizóbio (IGUAL et al., 1997; CHAGAS JÚNIOR, 2007).

O fósforo (P) potencializa a FBN por estimular o crescimento de plantas hospedeiras, além de influenciar diretamente a formação do rizóbio e dos nódulos. Como a FBN é um processo que demanda uma grande quantidade de energia e como o P tem um papel chave no metabolismo energético das células, sua deficiência tem um papel negativo no status energético dos nódulos (CHAUDHARY e FUJITA, 1998). A deficiência do P pode reduzir a produção da biomassa do hospedeiro e a demanda por fixação de N_2 fixado, reduzindo a força do dreno para o nódulo e conseqüentemente o funcionamento dos nódulos (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005).

O molibdênio (Mo) faz parte do co-fator ferro-molibdênio, do grupo prostético da fração dinitrogenase, do complexo enzimático nitrogenase. Sendo assim, o Mo afeta o metabolismo do nitrogênio devido a sua participação como componente da

nitrogenase, enzima relacionada a FBN pelas leguminosa, e da redutase do nitrato (ZIMMER e MENDEL, 1999).

A planta apresenta uma economia de energia quando obtém N do solo em comparação a obtenção via FBN e, desta forma, preferencialmente, a planta utiliza N disponível no solo em detrimento da formação do processo de FBN (FERNANDEZ e CREIGHTON, 1986). Os teores elevados de N-NH₄ e N-NO₃ na rizosfera podem remover as lectinas responsáveis pela atração quimiostática do rizóbio pelas raízes nos primórdios da associação simbiótica, bem como alterar o perfil de flavonóides (moléculas sinalizadoras da planta para o rizóbio), diminuindo assim, a formação de nódulos (BANDYOPADHYAY, JAIN e NAINAWATEE, 1994).

A umidade do solo interfere diretamente no metabolismo celular da bactéria e da planta, bem como no processo de FBN, sendo a sua carência ou excesso fator determinante da permanência e multiplicação da bactéria no solo (SANGINGA et al., 2000). O excesso de água influencia mais o metabolismo da planta e a FBN, devido à falta de oxigênio, do que a sobrevivência da bactéria no solo. (MARTINS, 1996).

A deficiência hídrica afeta o peso dos nódulos e a atividade da nitrogenase em leguminosa. A pouca aeração em solos inundados pode afetar negativamente a simbiose em diversas culturas. No entanto, a simbiose de leguminosas com rizóbios nativos pode se estabelecer em condições de extrema seca ou em condições de prolongada inundação, neste caso, até cinco meses (TORO, 1996; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Experimentos revelaram que a suspensão de água na 2^a e 5^a semana reduziu o peso dos nódulos e o acúmulo de N-total da parte aérea de plantas de feijão-caupi (STAMFORD, CHAMBER e CAMACHO, 1995).

O processo de nodulação e FBN é sensível à salinidade do solo, e a principal causa é a inibição, pelos sais presentes no solo, dos passos iniciais de infecção bacteriana no pêlo radicular (BOUHMOUCH et al., 2005), impedindo o início do processo de nodulação. Além disso, outros trabalhos sugerem que a redução do crescimento nodular, pelo excesso de sais, esteja ligada à inibição de enzimas associadas à degradação da sacarose (GONZALEZ et al., 2001) ou à formação de barreira cortical, impedindo a difusão de oxigênio nos nódulos (SERRAJ, ROY e DREVON, 1994). Entretanto, as leguminosas presentes nos ecossistemas áridos, como por exemplo, feijão-caupi, podem se adaptar e fixar N eficientemente (SWARAJ e BISHNOI, 1999).

2.5.2 Fatores bióticos

A presença de uma grande diversidade de antagonistas, bacteriófagos, predadores de nódulos e, principalmente, alta densidade populacional e competitividade de rizóbios nativos, constitui uma verdadeira barreira no estabelecimento da inoculação, uma vez que competem pela ocupação dos sítios de infecção nas raízes das plantas hospedeiras (FRANCO e NEVES, 1992). Segundo Singleton e Tavares (1986), acima de 20 rizóbios nativos por grama de solo, diminuem o estabelecimento de rizóbios inoculados. Weaver e Frederick (1974), estimaram que há a necessidade de inocular mil vezes mais rizóbio na semente do que o número de rizóbio no solo, para que as estirpes superem as do solo, na formação de nódulos. Por outro lado, Thies, Singleton e Bohlool (1991a) propõem que essa relação seja 100:1.

Em geral, quanto maior a população nativa de rizóbio no solo, mais difícil é a introdução com sucesso da estirpe inoculante (THIES, BOHLOOL e SINGLETON, 1991b). Em solo com população de *Bradyrhizobium japonicum*, superior a 1700 células por grama de solo, a ocorrência da estirpe introduzida nos nódulos era de apenas 08 a 12%, enquanto, que em solo com população mais baixa de rizóbios nativos, a ocorrência chegou até 96% (RANGEL et al., 2001). Este resultado foi confirmado (XAVIER et al., 2006a) ao observar a habilidade das estirpes em infectar, nodular e fixar o nitrogênio atmosférico, associada à influência exercida pela planta através de características intrínsecas e a outras bactérias nativas do solo, podendo levar estirpes eficientes na fixação do N₂ em algumas espécies de leguminosas hospedeiras, e a apresentarem baixa eficiência fixadora.

3 ARTIGO: DESEMPENHO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI EM RORAIMA

3.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em cinco cultivares de feijão-caupi - BR-17 Gurguéia, BRS Guariba, BRS Mazagão, UFRR Grão Verde e Pretinho Precoce 1. Em 2007, conduziu-se um experimento em casa de vegetação e outro em campo, utilizando um esquema fatorial com cinco cultivares de feijão-caupi, três fontes de nitrogênio (adubação com uréia na dose de 50 kg ha⁻¹ de N, inoculação com as estirpes de *Bradyrhizobium* BR 3262 e BR 3267) e um controle absoluto. Aos 35 dias após a emergência das plantas avaliou-se o número e a massa seca de nódulos, massa da matéria seca e N-total da parte aérea, eficiência nodular em casa de vegetação e o rendimento de grãos na colheita em campo. Em casa de vegetação, observou-se alta nodulação e eficiência nodular para ambas as estirpes em todas as cultivares, destacando-se BR 17 Gurguéia e Pretinho Precoce 1, com a maior e menor nodulação, respectivamente. No campo, a nodulação e o N-total foram menores para todas as cultivares, comparativamente à casa de vegetação, indicando interferência de fatores locais na FBN. O aumento no rendimento de grãos ocorreu em todas as cultivares em decorrência da inoculação, especialmente com a estirpe BR 3262, que mostrou capacidade para substituir a adubação nitrogenada. Associando-se os resultados, observou-se que as cultivares de feijão-caupi avaliadas respondem bem à inoculação com as estirpes avaliadas, indicando ser uma alternativa eficiente para o aumento da produtividade desta cultura, gerando um impacto econômico e ambiental positivo.

Termos para indexação: *Vigna unguiculata*, FBN, *Bradyrhizobium*.

PERFORMANCE OF THE BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN COWPEA CULTIVARS IN RORAIMA-BRAZIL

3.2 ABSTRACT

The work aimed to evaluate the biological nitrogen fixation (BNF) in five cowpea cultivars - BR-17 Gurguéia, BRS Guariba, BRS Mazagão, UFRR Grão Verde and Pretinho Precoce 1. In, 2007, one green house and one filed experiment were performed using a factorial design with five cowpea cultivars and three nitrogen sources (urea fertilization in the level of 50 kg ha⁻¹ of N, inoculation with BR 3262 and BR 3267 *Bradyrhizobium*) strains and a control. Thirty-five days after plants emergency were evaluated the nodules number and dry weight, plants dry matter weigh and total-N and nodular efficiency in the green house, and the grains yield in field experiment on the harvest. In the green house, high nodulation and nodular efficiency were observed for both strains in all cultivars, with prominence to BR 17 Gurguéia and Pretinho Precoce 1 with the largest and smallest nodulation, respectively. The nodulation and total-N for all cultivars were smaller in the field, comparatively with the green house experiment, indicating the interference of local factors in the BNF. A grains yield increase was observed for all cultivars in consequence of the inoculation, especially with the BR 3262 strain that showed capacity to substitute the nitrogen fertilization. The results showed that cultivars of cowpea-bean recommended to Roraima have a good response to the inoculation with the strains evaluated showing that they are an efficient alternative to increase the yield of this crop, generating a positive economical and environmental impact.

Index terms: *Vigna unguiculata*, BNF, *Bradyrhizobium*.

3.3 INTRODUÇÃO

A utilização de insumos biológicos em substituição aos insumos químicos tem sido cada vez mais frequente na agricultura. Neste sentido, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem-se mostrado indispensável para a sustentabilidade da agricultura brasileira, por meio do fornecimento de nitrogênio às culturas com baixo custo econômico e redução do impacto ambiental (HUNGRIA, CAMPO e MENDES, 2007).

Para a cultura do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], a qual se estima uma área plantada de 150 mil hectares na região Amazônica, pesquisas têm mostrado resultados positivos para o aumento da produtividade de grãos com inoculação das sementes com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (MARTINS et al., 2003; LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; ZILLI et al., 2006b; ZILLI et al., 2008). Nestes trabalhos, foi demonstrado que a inoculação com estirpes bacterianas eficientes é capaz de substituir uma adubação nitrogenada de até 80 kg ha⁻¹ e aumentar o rendimento de grãos do feijão-caupi em mais de 30%.

Desta forma, o uso de inoculantes com bactérias eficientes na FBN em condições de campo tem-se mostrado uma estratégia importante, visando o aumento da produtividade do feijão-caupi, sendo atualmente recomendadas quatro estirpes de *Bradyrhizobium* para esta cultura: INPA3-11B, UFLA3-84, BR 3267 e BR 3262 (ZILLI et al., 2008).

Contudo, apesar da cultura apresentar ampla capacidade na FBN, nem sempre são observadas respostas positivas do uso de inoculantes em condições de campo, devido ao fato do feijão-caupi ser cultivado, em sua maioria, em condições de subsistência com baixo aporte tecnológico. Soma-se a isto, o fato deste vegetal apresentar baixa especificidade na nodulação, sendo capaz de nodular e estabelecer simbiose com diversas espécies e estirpes de bactérias do grupo rizóbio, pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia* e *Azorhizobium* (NEVES e RUMJANEK, 1997; ZILLI et al., 2006a; ZHANG et al., 2007; MOREIRA, 2008). Esta baixa especificidade da cultura em relação ao microssimbionte mostra-se limitante à exploração da FBN, uma vez que as bactérias nodulantes estabelecidas no solo, além de serem

competitivas e estarem em número elevado, apresentam eficiência na FBN variável (THIES, BOHLOOL e SINGLETON, 1991b; HARA e OLIVEIRA, 2007).

Além das peculiaridades inerentes ao microssimbionte, também tem sido mostrado que determinados genótipos de feijão-caupi apresentam maior capacidade de nodulação e eficiência na FBN, indicando a possibilidade de otimização das respostas à FBN com o uso de cultivares eficientes, ou mesmo com a implementação de programas de melhoramento vegetal visando à FBN (SANGINGA et al., 2000; FALL et al., 2003; XAVIER et al., 2006a).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a FBN em cinco cultivares de feijão-caupi, sendo duas recomendadas para o estado de Roraima (BRS Guariba e BRS Mazagão), duas em fase de recomendação (UFRR Grão Verde e Pretinho Precoce 1) e uma não recomendada oficialmente (BR-17 Gurguéia), porém utilizada pelos produtores da região e sobre a qual se tem muito pouca informação no Estado.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Experimento sob condições controladas

Entre os meses de março e abril de 2007, foi conduzido um experimento sob condições controladas em casa de vegetação na Embrapa Roraima, localizada na BR 174 km 08, município de Boa Vista-RR. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso com três repetições e esquema fatorial com cinco cultivares de feijão-caupi, três fontes de nitrogênio (duas estirpes de *Bradyrhizobium*, e um tratamento nitrogenado com 40 mg vaso⁻¹ semana⁻¹ de N, na forma de nitrato de amônio, correspondente a uma adubação de 50 kg ha⁻¹ de N e um controle sem inoculação e sem nitrogênio). As cultivares de feijão-caupi utilizadas foram: BR 17 Gurguéia, BRS

Guariba, BRS Mazagão, Pretinho Precoce 1 e UFRR Grão Verde; e as estirpes de *Bradyrhizobium* BR 3267 (=SEMIA 6462) e BR 3262.

As sementes do feijão-caupi foram previamente desinfestadas - 30 segundos em etanol a 70%, 5 minutos em hipoclorito de sódio a 5% e 10 lavagens sucessivas com água destilada esterilizada e semeadas, colocando-se 4 sementes por vaso Leonard (VICENT, 1970), com substrato areia: vermiculita (proporção de 2:1), esterilizado em autoclave (121°C; 90 minutos; 1 ATM). Semanalmente, os vasos receberam 0,3 L de solução nutritiva de Norris (NORRIS e DATE, 1976; citado por CAMPO e HUNGRIA, 2007) e irrigação com água esterilizada, quando necessária.

A determinação do número de células de rizóbio foi realizada pelo método quantitativo para contagem de rizóbio, denominado método de espalhamento, onde os inoculantes foram preparados, cultivando-se as estirpes bacterianas em meio de cultura YM, seguindo-se de incubação sob agitação constante de 150 rpm (rotações por minuto) por cerca de 96 horas a 28°C para subsequente contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) (VICENT, 1970, CAMPO e HUNGRIA, 2007).

O desbaste foi realizado três dias após a semeadura, deixando-se duas plantas por vaso. Após o desbaste, procedeu-se a inoculação das plântulas, aplicando-se 1 mL plântula⁻¹ do inoculante líquido, contendo aproximadamente 600 mil UFC, no colo de cada plântula (CAMPO e HUNGRIA, 2007).

Aos trinta e cinco dias após a emergência, as plantas do feijão-caupi foram coletadas, separando-se as raízes da parte aérea, na altura do nó cotiledonar. Os nódulos foram destacados das raízes, lavados e contados. Posteriormente, nódulos e parte aérea foram secos em estufa com circulação de ar (60° C; até obter peso constante - 72 horas) para determinação da massa seca. Após a pesagem, a parte aérea das plantas foi moída para a determinação do N-total pelo método KJELDAHL (LIAO, 1981).

As variáveis analisadas foram: número e massa de nódulos secos, massa da matéria seca e N-total da parte aérea e a eficiência nodular (N-total da parte aérea por massa de nódulos secos de cada planta).

3.4.2 Experimento de campo

Entre os meses de agosto e setembro de 2007, conduziu-se um experimento no campo experimental Água Boa, da Embrapa Roraima (O 60° 39'54'', N 02° 15'00'' e altitude de aproximadamente 90 m), em área representativa do cerrado de Roraima.

O experimento foi conduzido em área de primeiro cultivo, preparando-se o solo com antecedência de seis meses com incorporação da vegetação nativa, utilizando-se grade aradora e aplicando-se 1500 kg ha⁻¹ de calcário dolomítico (PRNT 80-85%), 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅, na forma de superfosfato simples e 50 kg ha⁻¹ de FTE BR-12. Posteriormente, semeou-se milho, o qual foi dessecado utilizando-se glyphosate na dose recomendada, dez dias antes da semeadura do feijão-caupi.

A análise de solo foi realizada antes da implantação do experimento. As amostras foram retiradas na profundidade de 0 a 20 cm, apontando as seguintes características: pH em CaCl₂ - 5,2; alumínio - 0,00 cmol_c dm⁻³; potássio - 0,04 cmol_c dm⁻³; cálcio - 1,01 cmol_c dm⁻³; magnésio - 0,30 cmol_c dm⁻³; matéria orgânica - 10,03 g dm⁻³; fósforo - 30,01 mg dm⁻³. A textura apresentou 870 g kg⁻¹ de areia, 120 g kg⁻¹ de argila e 10 g kg⁻¹ de silte e o número de células de rizóbio nodulantes do feijão-caupi - 1,9 x 10³ UFC g⁻¹ de solo, determinado pelo método quantitativo para contagem de rizóbio denominado método de espalhamento (CAMPO e HUNGRIA, 2007), conforme descrito para a determinação do número células para a inoculação na casa de vegetação.

Como adubação de plantio, distribuiu-se mecanicamente, na linha de plantio 80 kg ha⁻¹ de P₂O₅, na forma de superfosfato simples e 60 kg ha⁻¹ de K₂O, na forma de cloreto de potássio (50% no plantio e 50% aos 30 dias após a emergência das plantas).

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições em esquema fatorial com cinco cultivares de feijão-caupi e três fontes de nitrogênio (duas estirpes de *Bradyrhizobium* e um tratamento nitrogenado com 50 kg ha⁻¹ de N, aplicados no plantio, na forma de uréia) e o controle sem inoculação e sem nitrogênio. As cultivares de feijão-caupi e as estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas foram as mesmas do experimento sob condições controladas.

A inoculação foi realizada aplicando-se o volume de líquido de 3 mL de suspensão bacteriana por kg^{-1} de semente, em uma concentração por dose de 600 mil UFC por semente, através de inoculante produzido como descrito para experimento anterior.

A semeadura do feijão-caupi foi realizada logo após a inoculação e consistiu na distribuição manual das sementes no espaçamento de 0,50 m entre linhas e 10 sementes por metro na linha, em parcela de 5 metros de comprimento por 4 de largura, perfazendo uma área de 20 m^2 , deixando 0,50 m de cada lado de bordadura em cada parcela.

As variáveis avaliadas nesse experimento foram: número e massa de nódulos secos, massa da matéria seca e N-Total da parte aérea, e rendimento de grãos (umidade 13%) na colheita. A amostragem para avaliação da nodulação e parte aérea foi realizada aos 35 dias após a emergência das plantas, coletando-se 10 plantas na segunda linha de plantio em cada parcela. E, para a avaliação do rendimento de grãos, realizou-se a colheita das plantas em uma área útil de 6 m^2 nas quatro linhas centrais em cada parcela.

3.4.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, seguindo o delineamento dos experimentos, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de número e massa de nódulos foram transformados para raiz quadrada.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da nodulação das plantas nos experimentos mostrou maior número de nódulos nas plantas nos tratamentos inoculados com as estirpes de *Bradyrhizobium*, em casa de vegetação (Figura 1A e B). Ainda em casa de vegetação, foi observada maior média do número de nódulos nas plantas do tratamento inoculado com a estirpe BR 3267, enquanto no campo, apenas a estirpe BR 3262 proporcionou número de nódulos superior ao tratamento nitrogenado, sendo os demais tratamentos com valores significativamente iguais (Figura 1A). Essa resposta da nodulação justifica-se devido ao fato de o primeiro experimento ter sido conduzido com substrato esterilizado, não sendo influenciado pelos fatores ambientais.

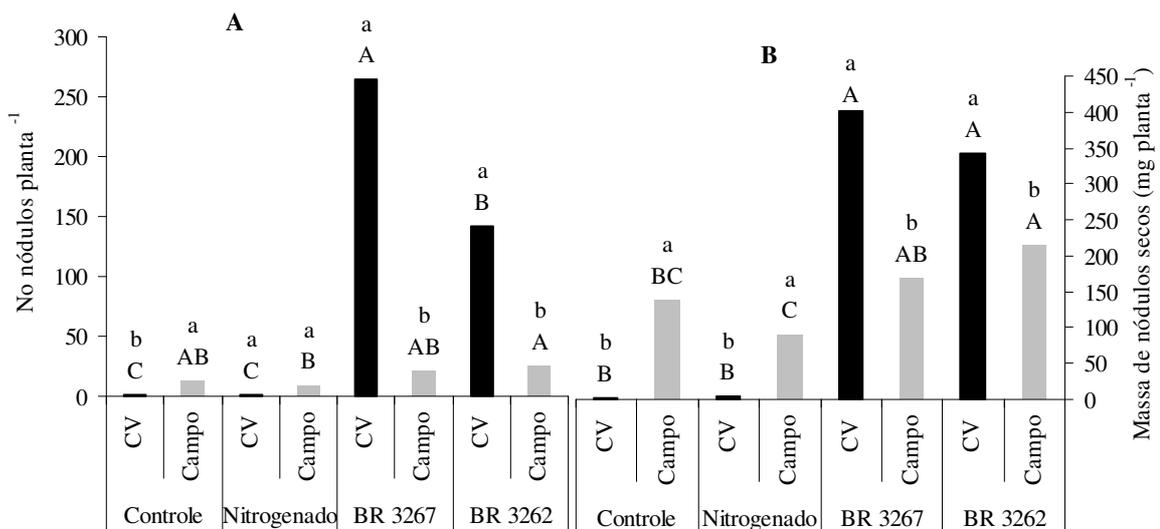


Figura 1 – (A) Número e (B) massa de nódulos secos de plantas de feijão-caupi em experimento de casa de vegetação (CV) e campo em Roraima.

* Médias seguidas de mesmas letras minúsculas, para uma mesma variável e tratamento, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade;

**Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas, para uma mesma variável e ambiente (casa de vegetação e campo), não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Para a massa de nódulos, não houve diferença entre os tratamentos inoculados com as duas estirpes, e os maiores valores obtidos com a inoculação

foram em casa de vegetação (Figura 1B). No campo, a estirpe BR 3262 proporcionou massa de nódulos superior ao controle, ao passo que BR 3267, apesar de ter proporcionado massa de nódulos significativamente igual à estirpe BR 3262, apenas foi superior ao tratamento nitrogenado (Figura 1B).

O fato de o tratamento controle ter nodulado de forma semelhante à estirpe BR 3267 no campo mostra alta capacidade dos rizóbios estabelecidos no solo nodularem as plantas de feijão-caupi, como frequentemente observado (RUMJANEK et al., 2005; HARA e OLIVEIRA, 2007; ZANG et al., 2007). Por outro lado, a menor nodulação observada no tratamento nitrogenado em relação ao controle mostra que o N mineral aplicado no plantio restringiu a nodulação espontânea, fato também observado por (SALVAGIOTTI et al., 2008).

Com relação às estirpes, os resultados de nodulação mostraram que ambas possuem capacidade de nodular as cultivares de feijão-caupi avaliadas, pois formaram mais de 100 nódulos planta⁻¹ em casa de vegetação, corroborando com observações anteriores para estas estirpes (MARTINS et al., 2003; ZILLI et al., 2006a). Por outro lado, o menor número de nódulos obtido em condições de campo, especialmente com a estirpe BR 3267, cerca de 20 nódulos planta⁻¹ na média gera menor massa de nódulos e mostra uma limitação à nodulação das plantas nesse ambiente, mesmo quando inoculadas.

Tal limitação pode estar associada a fatores edáficos, especialmente aos relativos a baixos teores de Ca e Mg observados (vide materiais e métodos), ou devido à alta quantidade de rizóbios nodulantes de feijão-caupi presentes no solo, cerca de 1900 UFC g⁻¹ de solo, que teriam competido com as estirpes inoculantes, ou ainda dificuldade de sobrevivência das estirpes inoculantes no campo (DELAVECHIA et al., 2003; WATKIN, O'HARA e GLENN, 2003).

Entre os genótipos do feijão-caupi, observou-se diferenças significativas no número de nódulos planta⁻¹, sendo o maior valor obtido na cultivar BR 17 Gurguéia e o menor na cultivar Pretinho Precoce 1, no experimento em casa de vegetação (Figura 2A). Também em experimentos conduzidos por Xavier et al. (2006a), foi observada capacidade de nodulação maior na cultivar BR 17 Gurguéia em relação a outros genótipos de feijão-caupi de origem brasileira, nigeriana e Norte americana.

De fato, em casa de vegetação, todas as cultivares apresentaram boa nodulação, acima de 40 nódulos planta⁻¹. Entretanto, em condições de campo, este número foi inferior a 20 nódulos planta⁻¹ para todas as cultivares, e

aproximadamente de 10 nódulos para a cultivar Pretinho Precoce 1 (Figura 2A). Por outro lado, para a massa de nódulos secos, não se observou diferenças entre as cultivares (Figura 2B) e, também, não foi observada interação significativa entre as cultivares e as estirpes inoculantes quanto à nodulação das plantas. Isto mostra que, independentemente da bactéria, as plantas foram capazes de nodular satisfatoriamente.

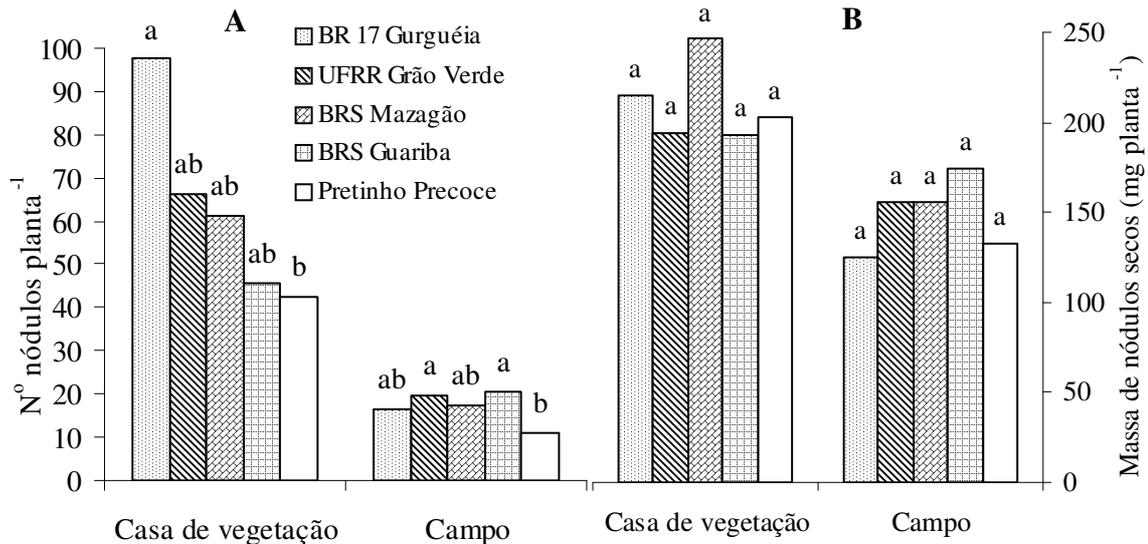


Figura 2 – Nodulação em plantas de feijão-caupi em experimentos de casa de vegetação e campo em Roraima. (A) – Número de nódulos, (B) Massa de nódulos secos.

* Médias seguidas de mesmas letras, para uma mesma variável e ambiente (casa de vegetação e campo), não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Para o feijão-caupi, não existem informações conclusivas sobre o número mínimo de nódulos necessário para garantir bom desempenho da FBN. Contudo, para a cultura da soja, reconhece-se como suficiente a formação de 15 a 20 nódulos na coroa da raiz principal (HUNGRIA, 2001).

Em termos de matéria seca da parte aérea, foi observado que, em casa de vegetação, todas as cultivares apresentaram, na média geral, massas significativamente iguais (Tabela 1). No campo, entretanto, a cultivar BRS Guariba produziu mais matéria seca que a cultivar BRS Mazagão e BR 17 Gurguéia, sendo o valor desta última, também inferior a cultivar UFRR Grão Verde (Tabela 1). Cabe destacar que, as diferenças na matéria seca da parte aérea entre as cultivares, não podem ser atribuídas exclusivamente ao efeito das fontes de nitrogênio. Isto porque

a produção de biomassa tende a variar de acordo com o potencial genético da planta.

Tabela 1 – Médias do número e massa de nódulos secos, massa seca da parte aérea, eficiência nodular e rendimento de grãos do feijão-caupi em experimentos conduzidos em casa de vegetação e área de cerrado em Roraima.

Cultivar	Tratamento	Massa da matéria seca da parte aérea (mg planta ⁻¹)	N-total (mg planta ⁻¹)	Eficiência nodular (mg ⁻¹)	Massa da matéria seca da parte aérea (mg planta ⁻¹)	N-total (mg planta ⁻¹)
		Casa de vegetação			Campo	
Precoce 1	Controle	0,1 b	1,4 c	-	3,5 b	114,91 a
	Nitrogenado	10,6 a	190,5 b	-	6,2 a	177,99 a
	BR 3267	11,7 a	285,9 ab	0,8 a	4,5 ab	161,31 a
	BR 3262	15,7 a	355,3 a	1,2 b	5,4 a	173,58 a
	Média	9,5 A	208,3 AB	1,0 A	4,9 ABC	156,9 A
Grão Verde	Controle	1,4 b	20,9 b	-	3,8 b	115,81 b
	Nitrogenado	6,5 ab	103,0 b	-	6,7 a	224,75 a
	BR 3267	11,8 a	342,6 a	0,9 a	4,7 b	144,14 ab
	BR 3262	11,1 a	317,7 a	0,9 a	5,1 ab	156,11 ab
	Média	7,7 A	196,1 B	0,9 A	5,3 AB	160,2 A
Mazagão	Controle	0,2 b	2,4 c	-	3,1 b	99,89 b
	Nitrogenado	7,4 a	205,3 b	-	6,9 a	227,39 a
	BR 3267	10,5 a	360,7 a	0,8 a	4,1 b	105,86 b
	BR 3262	11,4 a	380,7 a	1,0 a	3,4 b	139,04 b
	Média	7,4 A	237,3 AB	0,9 A	4,4 BC	143,0 A
BR 17	Controle	0,2 b	3,8 c	-	3,0 a	87,82 a
	Nitrogenado	8,2 a	205,4 b	-	4,2 a	155,95 a
	BR 3267	10,8 a	417,8 a	1,1 a	4,6 a	124,22 a
	BR 3262	11,6 a	449,4 a	1,3 a	4,8 a	171,52 a
	Média	7,7 A	269,1 A	1,2 A	4,2 C	134,9 A
Guariba	Controle	0,1 c	1,4 c	-	4,1 4c	143,66 a
	Nitrogenado	7,8 b	195,4 b	-	7,4 A	214,84 a
	BR 3267	9,5 ab	406,4 a	1,0 a	4,3 B	140,75 a
	BR 3262	14,1 a	414,8 a	1,3 a	5,7 Ab	190,12 a
	Média	7,9 A	254,5 AB	1,1 A	5,4 A	172,3 A

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas, na coluna e dentro de cada cultivar, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade;

**Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade

Quando avaliada a interação das cultivares com as fontes de nitrogênio, observou-se valores maiores da massa da matéria seca para os tratamentos inoculados, seguidos do nitrogenado e controle em casa de vegetação (Figura 3). A exceção ocorreu para a cultivar UFRR Grão Verde, cuja massa de matéria seca das plantas do tratamento com N, embora tenha sido maior, foi estatisticamente igual ao controle (Tabela 1), indicando que esta cultivar poderia ser menos eficiente na utilização do N mineral. No campo, o tratamento nitrogenado apresentou massa da matéria seca das plantas superior ao experimento em casa de vegetação, ao passo que nos tratamentos inoculados, isto ocorreu em casa de vegetação, sendo os valores superiores em mais de 100% neste experimento (Figura 3), mostrando que a menor nodulação das plantas ocorrida no campo limitou uma maior contribuição da FBN para o crescimento das plantas.

Em relação à eficiência nodular, todas as cultivares apresentaram valores significativamente iguais entre si (Tabela 1). Porém entre as estirpes, houve diferença significativa na cultivar Pretinho Precoce 1, na qual a estirpe BR 3262 apresentou eficiência superior a estirpe BR 3267, indicando que esta cultivar pode se beneficiar mais da FBN quando inoculada com a estirpe BR 3262, sobretudo por ter havido maior acúmulo de N quando inoculada com esta estirpe (Tabela 1). De forma semelhante Fall et al. (2003), observaram, no Senegal, interação entre cultivares de feijão-caupi com estirpes de rizóbio recomendadas naquele país em relação a redução de acetileno, a qual indica a atividade da nitrogenase e indiretamente a atividade nodular.

Para a variável N-total, semelhantemente à produção de matéria seca, os tratamentos inoculados tenderam a proporcionar valores maiores, seguidos do tratamento nitrogenado e o controle em condições controladas (Figura 3), confirmando a alta eficiência das estirpes em fixar nitrogênio. Por outro lado, também em casa de vegetação, observou-se que entre as cultivares, ocorreu maior acúmulo de N com a cultivar BR 17 Gurguéia, refletindo a maior nodulação que esta cultivar apresentou, e menor para a cultivar UFRR Grão Verde, que acumulou N de forma significativamente igual ao controle. Provavelmente em função da baixa resposta ao tratamento com nitrogênio mineral (Tabela 1).

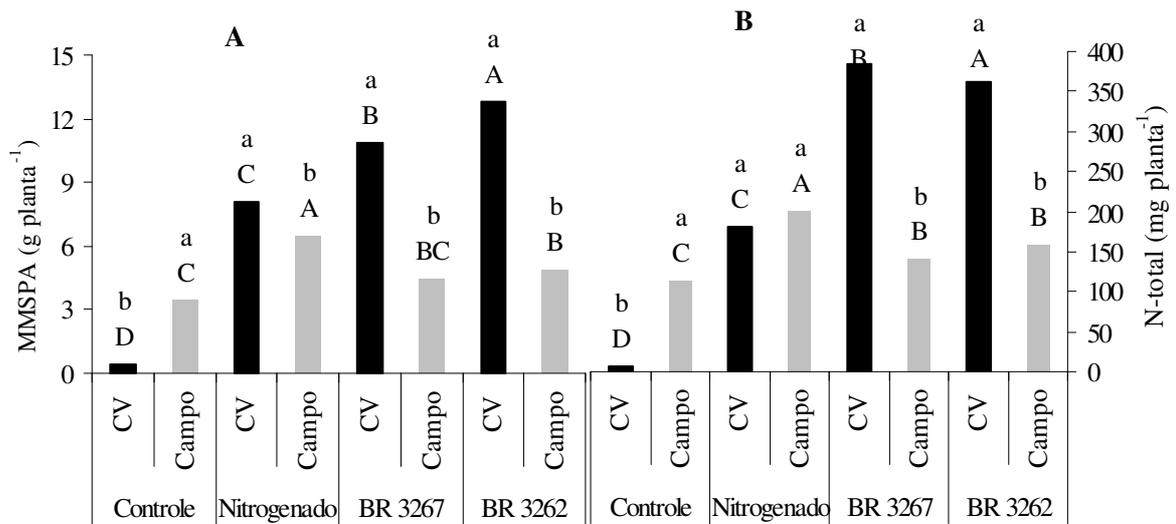


Figura 3 – (A) Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e (B) N-total da parte aérea de plantas de feijão-caupi em experimento de casa de vegetação (CV) e campo em Roraima.

* Médias seguidas de mesmas letras minúsculas, para um mesmo tratamento e variável, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

** Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas, para um mesmo ambiente (casa de vegetação e campo) e variável, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

No campo, entretanto, não foi observada diferença significativa entre as cultivares em relação ao N-total (Tabela 1). Porém, entre as fontes de nitrogênio, o controle apresentou resultado inferior ao tratamento nitrogenado dentro da cultivar UFRR Grão Verde e, também, os tratamentos inoculados apresentaram valores menores que o nitrogenado, na cultivar BRS Mazagão, sendo que os demais apresentaram resultados significativamente iguais (Tabela 1). Além disso, na média geral, observou-se que, enquanto o N-total do tratamento nitrogenado foi significativamente igual nos dois experimentos, para os inoculados houve um acúmulo maior (mais de 100%) na casa de vegetação, indicando mais uma vez que a menor nodulação das plantas ocorrida no campo restringiu a resposta da FBN.

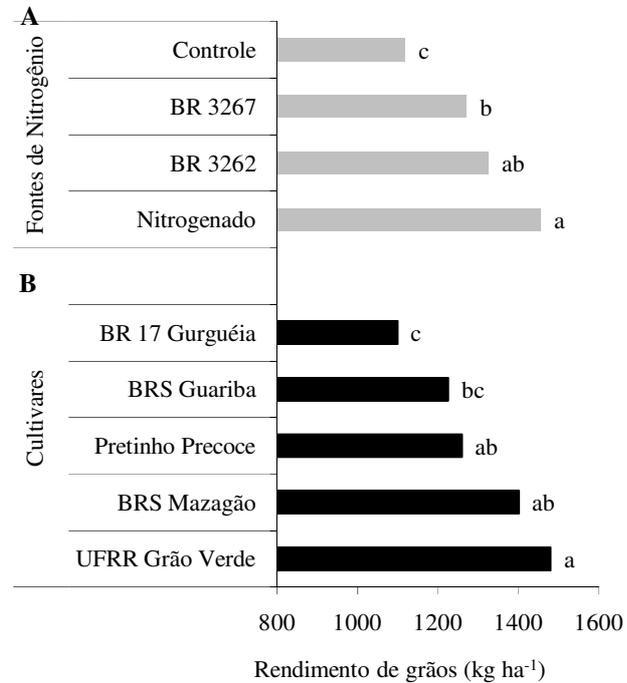
De fato, a avaliação da massa da matéria seca e N-total da parte aérea do feijão-caupi mostrou que, embora em casa de vegetação todas as cultivares tenham apresentado eficiência na FBN com as duas estirpes de *Bradyrhizobium*, a limitação na formação de nódulos ocorrida no campo restringiu maior acúmulo de N. Isto se torna visível com a constatação que o tratamento nitrogenado acumulou N de forma

semelhante nos dois experimentos (Figura 3B), enquanto as estirpes, apesar de terem proporcionado acúmulo de N maior que o nitrogenado sob condições controladas, proporcionaram valores inferiores no campo. Desta forma, embora tenham sido observadas diferenças no comportamento das cultivares em relação às estirpes inoculantes, e, também, algumas diferenças entre as estirpes, os maiores efeitos na FBN parecem estar em outros fatores, mencionados anteriormente, que ocorrem no campo e não foram considerados nas avaliações deste trabalho.

Em relação ao rendimento de grãos com relação às fontes de nitrogênio, aqueles que obtiveram maior produtividade foram aqueles com o tratamento nitrogenado e o inoculado com a estirpe BR 3262, os quais apresentaram rendimentos significativamente superiores ao controle. Ao passo que a estirpe BR 3267, apesar de ter proporcionado rendimento igual a BR 3262, foi também igual ao controle (Figura 4 A). Isto corrobora com informações anteriores para esta estirpe, descritas por Soares, 2007; Zilli et al., 2008, e mostra que, embora tenha havido restrição da nodulação das plantas no campo, a inoculação, especialmente com a BR 3262, foi viável e capaz de substituir a adubação nitrogenada de 50 kg ha^{-1} de N.

Foi observada interação entre as cultivares e tratamentos para o fornecimento de N (Figura 4 B). Contudo, entre as cultivares, a UFRR Grão Verde proporcionou rendimento significativamente igual a cultivar BRS Mazagão e maior que as demais, e BRS Mazagão, maior produtividade em relação a BR 17 Gurguéia e igual as demais (Figura 4 B). Da mesma forma que a variável matéria seca, é preciso considerar que o potencial genético da planta, bem como a adaptabilidade da planta às condições de campo, influenciou no rendimento de grãos e não meramente a disponibilidade de nitrogênio.

Figura 4 – Rendimento de grãos de feijão-caupi em experimento de campo no Cerrado de Roraima; (A) Comparação dos diferentes tratamentos para fornecimento de nitrogênio; (B) Comparação das cultivares avaliadas.



* Médias seguidas de mesmas letras, para cultivares ou fonte de nitrogênio, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

A cultivar BR 17 Gurguéia e Pretinho Precoce 1 apresentaram maior e menor habilidade para nodular, respectivamente, em casa de vegetação.

Sob condições controladas, todas as cultivares avaliadas apresentaram alta eficiência nodular com as estirpes de *Bradyrhizobium* BR 3262 e BR 3267.

Todas as cultivares, quando inoculadas no campo, apresentaram menor nodulação e acúmulo de nitrogênio comparativamente ao experimento sob condições controladas.

Em condições de campo, a inoculação das plantas com a estirpe BR 3262 se mostra viável para substituir a adubação nitrogenada de 50 kg ha⁻¹ de N na forma de uréia.

REFERÊNCIAS

- ALVES, J.M.A.; UCHÔA, S.C.P.; SILVA, A.J.; NASCIMENTO, J.F.; LIMA, A.C.S.; ALBUQUERQUE, J.A.A.; SILVA, L.C.; BARBOSA, R.N.T.; TEROSSI FILHO, C.A.; BARROS, M.M.; RODRIGUES, G.S. Programa de melhoramento de feijão-caupi da UFRR. In: ZILLI, J.E.; VILARINHO, A.A.; ARAÚJO, W.F.; MELO, V.F. (Ed.) **Anais do Workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. 84 p. (Embrapa Roraima. Documentos, 04).
- ARAÚJO, A.S.F.; CARVALHO, E.M.S. **Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas**. UFPI. Comunicado Técnico, n. 11, p. 1-4, abril 2006.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS – ANDA. **Anuário estatístico do setor de fertilizantes 2007**. São Paulo: ANDA, 2008. 160p. Disponível em: <http://www.anda.org.br/publicações.aspx>. Acesso em: 02 mar.2009.
- BANDYOPADHYAY, A.K.; JAIN, V.; NAINAWATEE, H.S. Nitrate alters the flavonoid profile and nodulation in pea (*Pisum sativum* L.). **Biology and fertility of soils**, v. 21, p.189-192, 1994.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; NEVES, M.C.P.; SUHET, A. R.; PERES, J.R. Quantification of the contribution of N₂ fixation to field-grown grain legume – a strategy for the practical application of the 15N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 649-655, 1990
- BOUHMOUCH, I.; SOUAD-MOUHSINE, B.; BRHADA, F.; AURAG, J. Influence of host cultivars and Rhizobium species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.1103-1113, 2005.
- CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Protocolo Para Análise da Qualidade e da Eficiência agrônômica de Inoculantes, Estirpes e outras Tecnologias Relacionadas ao Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio em Leguminosas. In: REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIAS DE INOCULANTES DE INTERESSE AGRÍCOLA (RELARE), 2006, Londrina. **Anais**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 89-123 (Embrapa Soja. Documentos, 290).
- CANTARELLA, H. Nitrogênio: In. NOVAIS, R. F. et al. **Fertilidade do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa. MG, 2007. p.375-379.
- CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica de nitrogênio microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; PAULA Jr., T. J.; BORÉM, AL. (Ed.). **Feijão**. 2. ed.atual. Viçosa, MG: EFV, 2006. p.143-170.
- CHAGAS JÚNIOR, A.F. **Características agrônômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia**. 2007. 158p. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CHAUDLHARY, M.I., FUJITA, K. Comparison of phosphorus deficiency effects on the growth parameters mashbean, mugbean, and soybean. **Soil Science and plant Nutrition**, Tokyo. v. 44. n. 1. p. 19-30, 1998.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO – CONAB. **Indicadores da agropecuária – junho 2008**. Brasília: CONAB, 2008. 65p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/indicadores/pu,indicadores.pdf>. Acesso em Acesso em: 02 mar.2009.

CRAVO, M. S.; SOUZA, B.D.L. 2007. Sistemas de cultivo do feijão-caupi na Amazônia. Workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima, Boa Vista, 2007. **Anais**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. p. 15-21 (Embrapa Roraima. Documentos, 4).

DELAVECHIA, C.; HAMPP, E.; FABRA, A.; CASTRO, S. Influence of pH and calcium on the growth, polysaccharide production and symbiotic association of *Sinorhizobiummeliloti* SEMIA 116 with alfalfa roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38:, p.110-114, 2003. Disponível em: <http:// www.dcs.ufla.br/artigocaupi.pdf>Acesso em: 30 de Nov. de 2008.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspective**. 2 ed. Sunderland, Sinauer Associates. 2005. 400 p. In: **Fertilidade do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa, MG, 2007. 22 ed, p 375-737.

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

FERNANDEZ JUNIOR, P.I. **Composições Poliméricas a base de Carboximetilcelulose (CMC) com Veículos de Inoculação em Leguminosas**. 2006, 43p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

FERNANDEZ, G. C.; CREIGHTON, J. M. **Interaction between rhizobia inoculation and fertilizer nitrogen in five cowpea cultivars**. HortScience, Alexandria, v. 21, p. 1345–1348, 1986.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Base de Dados**. disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/>>. acesso em: 27 dez. 2008.

FRANCO, A. A. e NEVES, M. C. P. Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Ed.) **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, 1992, p. 219-230.

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

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, C.A.F. **Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região do Nordeste**. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. p. 2-5. Embrapa Meio-Norte.1998.

GALLOWAY, J.N.; ABER, J.D.; ERISMAN, J.W.; SEITZINGER, S.P.; HOWARTH R. W.; COWLING, E.B.; COSBY, B. J. The nitrogen cascade. **BioScience**, v.53, p.341-356, 2003.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F.M.S. Specificity of the legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and its nodule isolates *Azorhizobium johanna*e with other legume hosts and rhizobia. *Symbiosis*, v.36, p.57-68, 2004.

GONZALEZ, E.M.; GALVEZ, L.; ROYURLA, M.; APARICIO-TEJO, P.M.; ARRESSE-IGOR, C. Insights into the regulation of nitrogen fixation in pea nodules: lessons from drought, abscisic acid and increased photoassimilate availability. **Agronomie**, v.21, p.607-613, 2001.

GRAHAM, P. H. Ecology of the Root-nodule Bacteria of Legumes. In: DILWORTH, M.J. JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; NEWTON, W.B.E. **Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses**. Ed. 7. 2008. Universidade de Minne Sola, SI Paul, E.U. A. p. 23-43.

GUALTER, R.M.R. et al. Avaliação dos Efeitos da Inoculação de Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) com *Bradyrhizobium elkanii*. **Rev. Bras. de Agroecologia**. Teresina, vol.2, p. 6. 2007.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbio oriundos de solos ácidos do município do Rio Preto da Eva, Amazonas. **Revista de Ciências Agrárias**, v.48, p.55-70, 2007.

HUNGRIA, M. e CAMPO, R. J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 30, 2005, Recife. **Anais...Recife**, 2005. 1 CD-ROM.

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

HUNGRIA, M. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, p.48.2001.

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. 48p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

IGUAL, J. M.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; CERVANTES, E. 1997. The effects of aluminum on nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Casuarina cunninghamiana* Miq. **Plant and Soil**, 190: 41- 46.

INTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **Estatística da Produção Agrícola**. Janeiro, 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em Acesso em: 02 mar.2009.

INTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **Levantamento sistemático da Produção Agrícola**, 2006.

JESUS, E.C.; SCHIAVO, J.A.; FARIA, S.M. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosa s arbóreas tropicais. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.4, p.545-552, 2005.

LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S. ANDRADE, M.J.B; SOARES, A.L.L. Yeld and nodulation of cowpea inoculated with selected strains. **Revista Ceres**, v.51, p.67-82, 2004.

LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, H.Z.A.; WONG, C.H.; NELSON, L.; MANEN, J.F.; STANLEY, J.; DOWLING, D.N.; DÉNARIE, J.; BROUGHTON, W.J. Multiple host-specificity *loci* of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. **Plant Molecular Biology**, v.8, p.447-459, 1987.

LIAO, C.F.H. Devarda's allow methods for total nitrogen determination. **Soil Science Society of American Journal**, v.45, p.852-855, 1981.

LINDEMANN, W. C.; GLOVER, C. R. Nitrogen fixation by gegumes Guide A-129. Cooperative Extension Service College of Agriculture. **Home Economics**. Mexico:Electronic Distribution May, 2003.

MANDAL, J.; CHATTOPADHYAY, A.; HAZRA, P.; DASGUPTA, T.; SOM. M.G. Genetic variability for three biological nitrogen fixation components in cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cultivars. **Crop Research**, v.18, p.222–225, 1999.

MARTINS, L.M.V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbios de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil**. Seropédica, 1996. 213p. Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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

MELLO, R.B.; FARIA, S.M. 1998. Compatibilidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, rizóbio, com espécies da família leguminosae. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**. 3p. (Comunicado Técnico, Nº 27).

MELO, S.R, ZILLI, J.E. Fixação biológica de nitrogênio em diferentes cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental (ENAMA), 11., 2008, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Microbiologia; Universidade Federal do Ceará, 2008. CD-Rom.

MENEZES, A.C.S.G.; ZILLI, J.E.; VILARINHO, A.A; GALVÃO, A.; MESSIAS, O.I. 2007. Importância sócio-econômica e condições de cultivo do feijão-caupi em Roraima. Anais do Workshop Sobre a Cultura do feijão-caupi em Roraima, Boa Vista, 2007. **Anais...** Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. p.12-30 (Embrapa Roraima. Documentos, 4).

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008, p. 621-680.

MOREIRA, F.M.S. **Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para produção de inoculantes comerciais**. Lavras: UFLA, 2005, 16p.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 625p.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**, 2a ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MOSIER, A. GALLOWAY, J. Setting the Scene. The international nitrogen initiative. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON ENHANCED-EFFICIENCY FERTILIZERS. Frankfurt, 2005. Proceedings. Paris, **International Fertilizer Industry Association**, 2005. 10p.

MPEPEREKI, S. WOLLUM, A.G.; MAKONESE, F. Diversity in symbiotic specificity of cowpea rhizobia indigenous to Zimbabwean soils. **Plant and Soil**, v.186, p.167-171, 1996.

NEVES, M. C.P.; RUMJANEK, N.G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.889-895, 1997.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (ed.) **Nitrogen Fixation: From Molecules To Crop Productivity**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000.

OLIVEIRA, I. P. e CARVALHO, A. M. A cultura do caupi nas condições de clima e de solo dos trópicos úmidos e semi-árido do Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. 1. ed., Brasília: EMBRAPA-DPU, 1988, p. 63-96.

PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 22, p. 23-28, 1990: In: ZILLI, JERRI ÉDSON. **Caracterização e Seleção de Estirpes de rizóbio para a inoculação de Caupi em área de cerrado**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p. 6, 7, 9. 2001.

PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; NOGUEIRA, C. G.; SOARES, A. L. L.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B. **Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* cultivar Poços de Caldas por estirpes selecionadas de rizóbio no Município de Iguatama**. FERTBIO, 2004, Lages, SC. Resumo expandido.

PINHO, J. L. N.; TÁVORA, F. J. A. F.; GONÇALVES, J. A. Aspectos fisiológicos. In: FREIRE-FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.191-210.

RANGEL, F. W.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RIBEIRO, J. R. A.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P. e RUMJANEK, N. G. **Influência da inoculação de caupi com estirpes eficientes de rizóbio na população rizobiana nativa no solo da região semi-árida brasileira.** In: Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi, 5, 2001, p.273-278.

RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P. Fixação biológica de nitrogênio. In: Freire Filho, F.R.; Araujo Lima J.A.; Silva, P.H.S.; Ribeiro, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi - Avanços tecnológicos.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p.279-335.

RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G. R. Inoculação do feijão-caupi: uma tecnologia que garante aumento real na produtividade. **Portal do Agronegócio**, p 4,5. 2007. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>>. acesso em: 20 jan. 2008.

SALVAGIOTTI, F.; CASSMAN, K.G.; SPECHT J.E.; WALTERS D.T.; WEISS, A.; DOBERMANN, A. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research**, v. 108, p.1–13, 2008.

SANGINGA, N.; LYASSE, O.; SINGH B.B.; Phosphorus use efficiency and nitrogen balance of cowpea breeding lines in a low P soil of the derived savanna zone in West Africa. **Plant and Soil**, v. 220, p.119–128, 2000.

SERRAJ, R.; ROY, G.; DREVON, J.J. Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion. **Physiology Plantarum** v.91, p.161-168, 1994.

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.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, p.10-16. 2002.

SINGH, B.B.; EHLERS, J.D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F.R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C.A.; TARAWALI, S.A.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAMO, M. (Ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production.** Ibadan: IITA, p.287-300. 2002.

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

SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. vol.30, nº. 5. Viçosa. 2006.

SOARES, C.S. **Eficiência de estirpes de rizóbio no rendimento e qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.).** 2007. 92p. Tese de Doutorado - Universidade Federal da Paraíba, Areia.

SOUSA, P.M.; MOREIRA, F.M.M. Inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio: alternativa para aumentar a produtividade do caupi na agricultura familiar de

Confresa, Mato Grosso. In: RELARE, XIV, 2008, Bonito. **Anais**. Bonito: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. p.16.

SOUZA, A.A.; SOUZA, BURITY, H.A.; FIGUEIREDO, M. V. B.; SILVA.; M.L.R.B.; MELOTTO, M.; TSAI, S.M. Eficiência Simbiótica de Estirpes hup+, huphr e hupde *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* em Cultivares de Caupi. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v.34, n.10, p.1925-1931, out. 1999.

STAMFORD, N.P.; CHAMBER, P.M.; CAMACHO, M.M. Symbiotic effectiveness of several tropical *Bradyrhizobium* strains on cowpea under a long-term exposure to nitrate: relationships between nitrogen and nitrate reduction activities. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 147, p. 378-382, 1995.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. 1999. **Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 51p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 94).

SWARAJ, K.; BISHNOI, N. R. Effects of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian Journal of Experimental Biology*, New Delhi, v. 37, p. 843–848, 1999.

TARAWALI, S.A.; SINGH, B.B.; GUPTA, S.C.; TABO R.; HARRIS, F.; NOKOE, S.; FERNÁNDEZ-RIVERA, S.; BATIONO, A.; MANYONG, V.M.; MAKINDE K.; ODION E.C. Cowpea as a key factor for a new approach to integrated 233 crop–livestock systems research in the dry savannas of West Africa. In: FATOKUN, C.A., S.A. TARAWALI, B.B. SINGH, P.M. KORMAWA, AND M. TAMÒ (Ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan, Nigeria: Proceedings of the World Cowpea Conference III held at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), 2002. p.233-251.

THIES, J. E.; BOHLOOL, B. B.; SINGLETON, P. W. Subgroups of the cowpea miscellany symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hipogaeae* and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p.1540-1545, 1991b.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL.; B. Influence of the size of indigenous rhizobial populatin on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-crop legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n.1, p.19-28, 1991a.

TORO, N. Nodulation competitiveness in Rhizobium-legume symbiosis. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 157-162, 1996

VALICHESKI, R.R.; XAVIER, G. R. ; SIMÕES-ARAÚJO, J.L. ; RUMJANEK, N. G. Seleção de estirpes de crescimento lento de rizóbio tolerantes ao choque térmico para inoculação de caupi (*Vigna unguiculata*). In: *Avanços Tecnológicos no feijoeiro caupi*, Teresina 2001. **Anais**. Documentos 56 - dezembro de 2001.v.56. p. 268-272.

VARGAS, M.A.T. e HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Embrapa, Planaltina. 1997. 524p.

- VIEIRA, C.L. **Efeitos de estirpes de Rizóbio em cultivares de Caupi do agreste Paraibano**. 2007. 39p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
- VIEIRA, R. F. **Adubação molibídica no feijoeiro**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 2p. (Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, 10).
- VIEIRA, R.F. **Comparações de feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* com feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. p.213. 1989.
- VILARINHO, A.A.; FREIRE FILHO, F.R.; ROCHA, M.M.; RIBEIRO, V.Q. **Cultivar de Feijão-Caupi BRS Cauamé: Uma Nova Cultivar para Roraima**. (Comunicado técnico nº 15) Embrapa, set 2008a.
- VILARINHO, A.A.; FREIRE FILHO, F.R.; ROCHA, M.M.; RIBEIRO, V.Q. **BRS Xiquexique: Cultivar de Feijão-Caupi Rica em Ferro e Zinco para Cultivo em Roraima**: (Comunicado técnico nº 16) Embrapa, set 2008b.
- VILARINHO, A.A.; FREIRE FILHO, F.R.; ROCHA, M.M.; RIBEIRO, V.Q. **BRS Novaera, Nova Cultivar de Feijão-caupi para Cultivo em Roraima**: (Comunicado técnico nº 15). Embrapa, set 2006.
- VICENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: lackwell Scientific, 1970, 164p.
- WANI, S.P.; RUPELA, O.P.; LEE, K.K. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen in grain legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht v. 174, p.29-49, 1995.
- WATKIN, E.L.J., O'HARA, G.W.; GLENN, A.R. Physiological responses to acid stress of an acid-soil tolerant and an acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.621-624, 2003.
- WEAVER, R. W. e FREDERICK, L. R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* (L.) Merrill. II. Field studies. **Agron. J.**, Madison, n. 66, p. 233-236, 1974.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N; G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi baseada em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p.353- 359, 2005.
- XAVIER, G.R.; MARTINS.: L.M.V.; RIBEIRO., J.R.A. ; RUMJANEK, N.G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, v.19, p.25-33, 2006a.
- XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; MORGADO, L.B.; ALCANTARA, R.M.C.M.; FORTALEZA J.M.; FREIRE-FILHO, F.R.; DANTAS, J.P.; SANTOS, C.E.R.S.; ZILLI, J.É.; COSTA, J.R. Avaliação do Desempenho de Estirpes de Rizóbio em Feijão-caupi: Dados de Rede referente ao 1º ano de Experimentação. **Fertibio**. 2006b. 4p.

XAVIER, G.R.. Tolerância de Rizóbio de Feijão-caupi à Salinidade e à Temperatura em Condição in Vitro. **caatinga** (Mossoró,Brasil), v.20, n.4, p.01-09, Outubro/Dezembro 2007.

ZHANG, W.T.; YANG, J.K.; YUAN, T.Y.; ZHOU, J.C. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Biology and Fertility of Soils*, v.44, p.201–210, 2007.

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, 2006a.

ZILLI, J.E.; CAMARA, A.F.S.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. **Diversidade de rizóbio nativo em área da Mata Atlântica sob diferentes sistemas**. In: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, p.302, Salvador, 1999.

ZILLI, J.E.; MARSON, L.C.; RUMJANEK, N.G.R.; XAVIER, G.R. **Recomendação da Estirpe BR 3267 (=Semia 6462) para a Inoculação de Sementes de Feijão-Caupi em Roraima**. Comunicado técnico nº 04. Embrapa Roraima. 2007.

ZILLI, J.E.; MARSON, L.C.; XAVIER, G.R. **Avaliação de Estirpes de Rizóbio para a Cultura do Feijão Caupi em Roraima**. Embrapa/RR Circular Técnico 01, p.2-4. Dezembro de 2006b.

ZILLI, J.E.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Signalling specificity of rhizobia isolated from nodules of Phaseoleae and Indigofereae tribes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.70, p.743-750, 1998.

ZILLI, J.E.; XAVIER, R.G.; RUMJANEK, N. G. **BR3262: Nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a Inoculação de Feijão-Caupi em Roraima**. Comunicado técnico nº 10. Embrapa, 2008.

ZIMMER, MENDEL, R. Molybdenum Metabolism in Plants. **Plants biology**. Stuttgart, v. 1, n. 2, p.160-168. 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EXPERIMENTO EM CAMPO

1 - Variável Analisada: **Número de Nódulos / Planta – NNP**

Opção de transformação: raiz quadrada - SQRT (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULTIVARES	4	15.048969	3.762242	3.585	0.0112
FN	3	41.831216	13.943739	13.289	0.0000
BL	3	8.262164	2.754055	2.625	0.0591
CULTIVARES*FN	12	12.349327	1.029111	0.981	0.4779
erro	57	59.809734	1.049294		
Total corrigido		79	137.301411		
CV (%) =	25.08				
Média geral:	4.0838073	Número de observações:		80	

2- Variável analisada: **Matéria dos Nódulos Secos / planta – MNS (mg/planta⁻¹)**

Opção de transformação: raiz quadrada - SQRT (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULTIVARES	4	0.536305	0.134076	2.094	0.0935
FN	3	2.871050	0.957017	14.946	0.0000
BL	3	0.420864	0.140288	2.191	0.0990
CULTIVARES*FN	12	0.531358	0.044280	0.692	0.7526
erro	57	3.649832	0.064032		
Total corrigido		79	8.009410		
CV (%) =	20.68				
Média geral:	1.2234204	Número de observações:		80	

3 - Variável analisada: **Massa Matéria Seca da Parte Aérea / Planta – MMSPA (mg/planta⁻¹)**

Opção de transformação: variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULTIVARES	4	18.467380	4.616845	4.767	0.0022
FN	3	93.178320	31.059440	32.067	0.0000
BL	3	2.404470	0.801490	0.827	0.4842
CULTIVARES*FN	12	28.044980	2.337082	2.413	0.0132
erro	57	55.209630	0.968590		
Total corrigido	79	197.304780			
CV (%) =	20.42				
Média geral:	4.8205000	Número de observações:	80		

4 - Variável analisada: **Nitrogênio Total Acumulado / Planta – N-total (mg/planta⁻¹)**

Opção de transformação: variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULTIVARES	4	940349.137432	235087.284358	1.340	0.2663
FN	3	7701582.918730	2567194.306243	14.634	0.0000
BL	3	713904.975430	237968.325143	1.357	0.2653
CULTIVARES*FN	12	3245723.373757	270476.947813	1.542	0.1362
erro	57	9999195.629770	175424.484733		
Total corrigido	79	22600756.035120			
CV (%) =	26.96				
Média geral:	1553.7110000	Número de observações:	80		

5- Variável analisada: **Rendimento de Grão – RGR (kg/ha⁻¹)**

Opção de transformação: variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULTIVARES	4	1441095.970543	360273.992636	11.281	0.0000
FN	3	1164378.376570	388126.125523	12.153	0.0000
BL	3	115563.174130	38521.058043	1.206	0.3158
CULTIVARES*FN	12	417411.684517	34784.307043	1.089	0.3866
erro	57	1820415.743120	31937.118300		
Total corrigido	79	4958864.948880			
CV (%) =	13.82				
Média geral:	1292.7780000	Número de observações:	80		

APÊNDICE B

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO:

1 - Variável analisada: **Número de Nódulos / Planta – NNP**

Opção de transformação: raiz quadrada - SQRT (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULTIVARES	5	94.476515	18.895303	2.678	0.0331
FN	3	2906.376437	968.792146	137.318	0.0000
BL	2	26.177307	13.088653	1.855	0.1679
CULTIVARES*FN	15	131.739633	8.782642	1.245	0.2753
erro	46	324.534239	7.055092		
Total corrigido		71	3483.304130		
CV (%) =	33.26				
Média geral:	7.9858346	Número de observações:	72		

2 - Variável analisada: **Matéria dos Nódulos Secos / planta – MNS (mg/planta⁻¹)**

Opção de transformação: variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULTIVARES	5	23678.489583	4735.697917	0.830	0.5349
FN	3	2140933.010417	713644.336806	125.119	0.0000
BL	2	40062.520833	20031.260417	3.512	0.0381
CULTIVARES*FN	15	64202.968750	4280.197917	0.750	0.7217
erro	46	262371.979167	5703.738678		
Total corrigido		71	2531248.968750		
CV (%) =	35.78				
Média geral:	211.0625000	Número de observações:	72		

3 – Variável analisada: **Massa Matéria Seca da Parte Aérea / Planta – MMSPA (mg/planta⁻¹)**

Opção de transformação: variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULTIVARES	5	36.930433	7.386087	1.193	0.3274
FN	3	1570.571589	523.523863	84.568	0.0000
BL	2	24.050358	12.025179	1.943	0.549
CULTIVARES*FN	15	62.954644	4.196976	0.678	0.7919
erro	46	284.765375	6.190552		
Total corrigido	71	1979.272400			
CV (%) =	31.28				
Média geral:	7.9550000	Número de observações:	72		

4 - Variável analisada: **Nitrogênio Total Acumulado / Planta – N-total (mg/planta⁻¹)**

Opção de transformação: variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULTIVARES	5	45688.696528	9137.739306	2.765	0.0289
FN	3	1660468.236367	553489.412122	167.509	0.0000
BL	2	4238.312086	2119.156043	0.641	0.5312
CULTIVARES*FN	15	46005.319083	3067.021272	0.928	0.5409
erro	46	151994.506314	3304.228398		
Total corrigido	71	1908395.070378			
CV (%) =	24.80				
Média geral:	231.7694444	Número de observações:	72		

5 – Variável analisada: **Eficiência Nodular – EF**

Opção de transformação: variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULTIVARES	5	0.471581	0.094316	3.094	0.0290
FN	1	0.642669	0.642669	21.082	0.0001
BL	2	0.146872	0.073436	2.409	0.1132
CULTIVARES*FN	5	0.60781	0.032156	1.055	0.4115
erro	22	0.670661	0.030485		
Total corrigido	35	2.092564			
CV (%) =	17.58				
Média geral:	0.9930556	Número de observações:	36		