

ÍTALO AUGUSTO FÉRRER MELO SANTOS

SELEÇÃO DE ISOLADOS RIZOBIANOS DE MUCUNA PRETA
(*Stizolobium aterrimum* Piper e Tracy)

RECIFE-PE
2015

ÍTALO AUGUSTO FÉRRER MELO SANTOS

SELEÇÃO DE ISOLADOS RIZOBIANOS DE MUCUNA PRETA
(*Stizolobium aterrimum* Piper e Tracy)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciências do Solo, área de concentração: Química, Fertilidade e Microbiologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Ciências do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior

RECIFE-PE

2015

Ficha catalográfica

S237s Santos, Ítalo Augusto Férrer Melo
Seleção de isolados rizobianos de mucuna preta
(*Stizolobium aterrimum* Piper e Tracy) / Ítalo Augusto
Férrer Melo Santos. – Recife, 2015.
46 f. : il.

Orientador: Mario de Andrade Lira Junior.
Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Agronomia, 2015.
Referência(s).

1. *Mucuna aterrima* 2. Seleção de isolados 3. Fixação
biológica do nitrogênio 4. Adubação verde 5. Inoculação
I. Lira Junior, Mario de Andrade, orientador II. Título

CDD 631.4

ÍTALO AUGUSTO FÉRRER MELO SANTOS

SELEÇÃO DE ISOLADOS RIZOBIANOS DE MUCUNA PRETA
(*Stizolobium aterrimum* Piper e Tracy)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciências do Solo, área de concentração: Química, Fertilidade e Microbiologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Ciências do Solo.

Aprovada em 31 de julho de 2015.

Examinadores:

Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior (UFRPE)
Presidente da Banca Examinadora
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a Giselle Gomes Monteiro Fracetto (UFRPE)

Prof.^a Dr.^a Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos (UFRPE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sempre iluminar meus caminhos, me abençoar e por fazer com que mais esse sonho se realizasse.

Aos meus pais, Gerson e Fátima, pelos exemplos de vida, com dignidade, luta e perseverança. Sempre me dando força, coragem, e constante apoio para seguir em busca dos meus objetivos. Esta vitória também é de vocês.

Ao meu irmão, Itamar, pela amizade, respeito e incentivo.

À minha noiva, Andréa, pelos momentos alegres e difíceis compartilhados. Por sua dedicação, pelo amor que me fez mais forte, fazendo entender que sou capaz de ir além.

À minha tia, Luciene, minha segunda mãe. Pela paciência, confiança, acolhimento em sua casa e apoio incondicional. Muito obrigado!

À minha tia, Ir. Marta (in memoriam), pelo exemplo de benevolência e caridade, e que sempre me incentivou durante toda minha vida escolar. Meus eternos agradecimentos!

Aos meus queridos avós, Joaquim e Tereza, Genilda e Manoel, pelo incentivo e exemplos de vida. Apenas você, vó Genilda, se encontra entre nós, mas sei que em algum lugar estou sendo abençoado e orientado por todos.

A todos os meus familiares, tios e primos, que de alguma forma contribuíram para que eu realizasse mais um sonho.

Aos meus amigos em especial, Giovane e Edmilson, pelo companheirismo, cumplicidade, amizade e apoio antes e durante o ingresso no curso de graduação.

Aos meus amigos de curso, pelas experiências compartilhadas. Em especial, a William Ramos e Juliet Emília, com quem dividi minhas angústias, inseguranças, mas acima de tudo muitos momentos de alegria.

A todos do laboratório, que compartilharam comigo conhecimentos, alegrias e decepções, descobertas, desafios e muita cooperação no decorrer do trabalho, durante todo esse tempo fomos colegas, amigos e até irmãos. Em especial a Clayton, pelas conversas e muitas dúvidas sanadas; Luciana Remígio e Adeneide Candido, pelo apoio e incentivo; Aline Medeiros, João Campos e Victor Lucas por todas as conversas, argumentações, ideias e muito companheirismo. Uns já seguiram seus caminhos e outros só estão começando. Fica a certeza de que cada um de nós contribuiu para o crescimento do outro. Muito obrigado.

Ao meu orientador, professor Mario de Andrade Lira Junior, pelo exemplo de disciplina e competência, e pela confiança depositada.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade e estrutura para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo.
A Capes pela bolsa concedida.

A todos, meu carinho, respeito e gratidão.

“Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir!”

(Augusto Cury)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 COMPETITIVIDADE E SELEÇÃO EM VASOS COM SOLO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	19
2.1.1 Origem dos isolados rizobianos	19
2.1.2 Coleta do solo.....	19
2.1.3 Determinação da população de rizóbio no solo	21
2.1.4 Montagem do experimento.....	22
2.1.5 Condução e coleta	23
2.2 EFICIÊNCIA AGRONÔMICA A CAMPO	25
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 COMPETITIVIDADE E SELEÇÃO EM VASOS COM SOLO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	28
3.2 EFICIÊNCIA AGRONÔMICA A CAMPO	34
4 CONCLUSÕES	38
5 REFERÊNCIAS	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Produção de massa seca da parte aérea (MSPA) da mucuna preta em função da aplicação de N em doses crescentes (n=5).....	28
Figura 2 – Concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de nitrogênio na parte aérea de mucuna preta em função da aplicação de N em doses crescentes (n=5).....	29
Figura 3 – Acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) em kg ha^{-1} , de plantas de mucuna preta aos 45 dias de cultivo, inoculadas com a mistura de duas estirpes recomendadas pelo MAPA para a espécie (SEMIA6156-6158), cinco isolados rizobianos pré-selecionados em casa de vegetação, além de dois tratamentos controles: nitrogenado ($80 \text{ kg de N ha}^{-1}$ na forma de ureia) e nativa (sem inoculação e sem N). Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5%.....	36

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Origem e identificação dos 39 isolados rizobianos estudados	19
Tabela 2 - Características químicas e físicas, precipitação, classificação do solo e posição geográfica das áreas canavieiras de origem dos 39 isolados.....	20
Tabela 3 - Caracterização química, física e microbiológica do solo utilizado em casa de vegetação.....	21
Tabela 4 - Identificação das estirpes recomendadas pelo MAPA para inoculação em mucuna preta e utilizadas como referência	24
Tabela 5 - Caracterização química, física e microbiológica do solo no experimento a campo	25
Tabela 6 - Massa seca de nódulo (MSN), raiz (MSR), parte aérea (MSPA), concentração (CNPA) e acúmulo de N (ANPA) na parte aérea, eficiência relativa (ER) e dose N (DOSE N) de 39 isolados rizobianos avaliados e dos tratamentos controles: nitrogenado (60, 120, 180 e 240 kg de N ha ⁻¹), mistura de estirpes referências (SEMIA6156-6158) e absoluto (NATIVA)	30
Tabela 7 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis: massa seca de nódulo (MSN), raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), concentração (CNPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA), eficiência relativa (ER) e dose N (DOSE N).33	
Tabela 8 - Massa seca de nódulo (MSN), raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), concentração (CNPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA), e eficiência relativa (ER) dos cinco isolados rizobianos avaliados em campo e dos tratamentos adubação nitrogenada (80 kg de N ha ⁻¹), inoculação da mistura das estirpes referência SEMIA6156 e 6158 (SEMIAs) e controle sem inoculação e sem adubação (NATIVA).....	34
Tabela 9 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis: massa seca de nódulo (MSN); raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA); concentração (CNPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER)	37

SANTOS, Ítalo Augusto Ferrer Melo. Msc., Universidade Federal Rural de Pernambuco. Julho de 2015. **Seleção de isolados rizobianos de mucuna preta (*Stizolobium aterrimum* Piper e Tracy)**. Orientador: Dr. Mario de Andrade Lira Junior.

RESUMO

O panorama de rápido crescimento populacional alerta para o desafio da segurança alimentar mundial demandando o aumento da produção de alimento. A adubação verde com leguminosas, como a mucuna preta, se mostra importante no incremento, principalmente de N, no sistema, em decorrência da fixação biológica do N₂ (FBN), reduzindo o uso de adubos minerais, diretamente ligados à produção agrícola. A FBN pode ser maximizada através da inoculação com estirpes eficientes e competitivas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi selecionar isolados rizobianos de nódulos de mucuna preta, eficientes e competitivos, em condição de casa de vegetação e campo experimental. O experimento em casa de vegetação foi composto por 39 isolados rizobianos, quatro doses de adubo nitrogenado (N) na forma de ureia (60; 120; 180 e 240 kg ha⁻¹), um tratamento sem inoculação e sem N e outro com a inoculação da mistura de estirpes recomendadas SEMIA6156-6158, em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. O cultivo foi realizado em sacos plásticos de polietileno preenchido com 2,5 kg de solo não estéril por 45 dias. Enquanto que o experimento de campo foi composto por cinco isolados selecionados em casa de vegetação, uma dose de N na forma de ureia (80 kg ha⁻¹), e os tratamentos sem inoculação e sem N, e a inoculação da mistura de estirpes recomendadas, em sistema de sequeiro em blocos casualizados com quatro repetições, por 45 dias. A coleta do solo e o teste a campo foram realizados na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina pertencente à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizada na cidade de Carpina, estado de Pernambuco. O experimento de casa de vegetação foi realizado na UFRPE, na cidade do Recife, estado de Pernambuco. Nos dois experimentos o solo foi corrigido com calcário dolomítico na dose de 0,60 t ha⁻¹ e 0,65 t ha⁻¹, respectivamente. A adubação básica nos dois experimentos foi realizada com superfosfato simples (60 kg de P ha⁻¹) e cloreto de potássio (40 kg de K ha⁻¹). O preparo do inoculante partiu do cultivo das bactérias em meio YM (120 rpm, 28°C) durante 72 horas. Foram

mensuradas as seguintes variáveis: massa seca de nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR). Determinada a concentração de N total no tecido da parte aérea (CNPA) e o acúmulo de N na parte aérea (ANPA). E ainda, avaliação da eficiência relativa comparada à dose de 120 kg de N ha⁻¹ e calculada a Dose N, para o experimento de casa de vegetação, e 80 kg de N ha⁻¹ para o experimento de campo. Também se avaliou a correlação Pearson entre as variáveis. Realizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla de médias pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Os isolados T2.19A e T1.17M apresentaram grande potencial para a produção de inoculantes por promoverem acúmulo de nitrogênio na parte aérea, no campo, significativamente superior à aplicação de 80kg de N ha⁻¹, à inoculação com a mistura de estirpes recomendadas SEMIA6156-6158 e ao tratamento sem inoculação e sem N. A MSPA foi influenciada pelas doses de N.

Palavras-Chave: *Mucuna aterrima*; Seleção de isolados; Fixação biológica do nitrogênio; Adubação verde; Inoculação.

SANTOS, Ítalo Augusto Férrer Melo. Mcs. Federal Rural University of Pernambuco. July 2015. **Selection isolated rizobianos of velvet beans black (*Stizolobium aterrimum* Piper and Tracy)**. Adviser: Dr. Mario de Andrade Lira Junior.

ABSTRACT

The panorama of rapid population growth alert to the challenge of global food security demanding increased food production. Green manuring with legumes such as velvet bean, proves important in the growth of mainly N, in the system, due to the biological N₂ fixation (BNF), reducing the use of mineral fertilizers, directly linked to agricultural production. The BNF can be maximized by inoculation with efficient and competitive strains. Therefore, the objective was to select isolates rizobianos nodules of velvet bean, efficient and competitive in home condition of vegetation and then experimental field. The experiment in greenhouse was composed of 39 isolated rizobianos, four doses of nitrogen fertilizer (N) in the form of urea (60, 120, 180 and 240 kg ha⁻¹), one without inoculation and without N treatment and another with inoculating the mixture of strains recommended SEMIA6156-6158 in a completely randomized design with five repetitions. Cultivation was carried out in plastic bags of polyethylene filled with 2.5 kg of non-sterile soil for 45 days. While the field experiment consisted of five isolates selected in a greenhouse, one dose of N in the form of urea (80 kg ha⁻¹), one treatment without inoculation and without N, and inoculation of the mixture of strains recommended in dryland system in a randomized block design with four replications for 45 days. The collection of soil and field tests were conducted in Experimental Cane Sugar Carpina Station belonging to the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), located in the city of Carpina, Pernambuco state. The greenhouse experiment was conducted at UFRPE in the city of Recife, Pernambuco state. In both experiments the soil was fixed with dolomitic limestone at a dose of 0.60 t ha⁻¹ and 0.65 t ha⁻¹, respectively. The basic fertilization in both experiments was performed with superphosphate (60 kg P ha⁻¹) and potassium chloride (40 kg K ha⁻¹). The preparation of the inoculant started the cultivation of bacteria in YM medium (120 rpm, 28 ° C) for 72 hours. The following variables were measured: dry mass of nodules (MSN), the aerial part (MSPA) and root (MSR). Determined the total nitrogen concentration in the shoot tissues (CNPA) and the accumulation of N in the shoot (ANPA). Also, assessment of the relative

efficiency compared with 120 kg N ha⁻¹ and calculated N Dose, for the greenhouse experiment, and 80 kg N ha⁻¹ for the field experiment. We also assessed the Pearson correlation between variables. It was performed by analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison test medium by Scott-Knott test ($p \leq 0.05$). The T2.19A and T1.17M isolates present great potential for the production of inoculants because they promote nitrogen accumulation in the shoot, in the field, significantly higher than the application of 80 kg N ha⁻¹, to inoculation with the mixture of strains recommended SEMIA6156-6158 and treatment without inoculation and without N. The MSPA was influenced by N levels.

Keywords: *Mucuna aterrima*; Isolated selection; Biological N₂ fixation; Green manure; Inoculation.

1 INTRODUÇÃO

O panorama de rápido crescimento populacional associado ao crescimento do consumo de alimentos e mudança ambiental, alerta para o desafio da segurança alimentar mundial. Mesmo o sistema mundial de produção de alimentos, nos últimos 50 anos, tendo ofertado três vezes mais alimentos frente a um aumento de duas vezes da população (Keating et al., 2014). De acordo com Keating & Carberry (2010) a estimativa de aumento na demanda por alimentos entre 2030 e 2050 relativo a 2010 é de 64 a 71%, levando em consideração o consumo per capita de países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Essa demanda vem exercendo pressão sobre a agricultura, no aumento da produção de alimento, e a agricultura, por sua vez, exercendo pressão sobre os recursos naturais. Segundo a FAOSTAT (2013) o consumo de fertilizantes, que está diretamente ligado à produção agrícola, é cada vez maior em todo o mundo. No Brasil, por exemplo, o consumo de fertilizantes nitrogenados, foi em torno de 19 a 46 kg ha⁻¹ em 2009. Ainda de acordo com a FAOSTAT (2013), ao longo do período 1961-2000 o uso de novas áreas destinadas à agricultura cresceu apenas 11%, enquanto que a produção agrícola cresceu 153%.

Esses dados demonstram sobre tudo, a importância do uso de novas tecnologias e do aprimoramento das tecnologias já existentes, no aumento da produtividade minimizando impactos ambientais. Dificilmente a agricultura atingiria esse nível atual de rendimento das culturas sem a invenção e disseminação de novas práticas agrícolas. Como o uso de insumos agrícolas, principalmente fertilizantes, e melhoramento genético, que permitiram o grande aumento na produtividade agrícola durante as décadas de 60 e 70. Inovações tecnológicas que ficaram denominadas como revolução verde (Albergoni & Pelaez, 2007).

Nesse cenário, o progresso das técnicas agrícolas baseadas no desenvolvimento científico, como a biotecnologia, desenvolve um papel muito importante na agricultura sustentável e produtiva. Uma dessas tecnologias é a inoculação, explorando a simbiose rizóbio-leguminosa fornecendo nitrogênio para a planta via fixação biológica do nitrogênio (FBN). O melhor exemplo no Brasil, da aplicação eficiente dessa tecnologia, é na cultura da soja, importante fonte de proteína para dietas de humanos e animais, na qual a inoculação com estirpes de

bactérias eficientes do gênero *Bradyrhizobium* associado ao melhoramento genético da planta, permite que essa cultura obtenha 94% do N necessário, fixando cerca de 300 kg de N ha⁻¹, economia estimada em US\$ 6 bilhões por ano (Hungria et al., 2005, 2006).

Além disso, o N proveniente da FBN evita possíveis impactos ambientais decorrentes do uso de fertilizantes nitrogenados. Impactos provenientes do baixo aproveitamento do nitrogênio (N) aplicado no solo, em virtude dos processos naturais de perda, como: volatilização; desnitrificação; lixiviação e erosão, promovendo problemas de eutrofização e impacto na atmosfera. E ainda na redução do consumo, que demanda para a fabricação o uso de combustíveis fósseis, como gás natural e carvão, altamente poluentes, e outras fontes de energia comercial (Olivares et al., 2013).

A FBN é um dos processos naturais mais importantes para a manutenção da biosfera, perdendo apenas para a fotossíntese, e a simbiose rizóbio-leguminosa, o sistema de fixação do nitrogênio mais importante. Ocorre em todos os ecossistemas conhecidos e consiste na conversão do dinitrogênio (N₂), forma nitrogenada não assimilável pelas plantas e constituinte de aproximadamente 78% do volume do ar atmosférico, em outras espécies químicas nitrogenadas assimiláveis pelas plantas (Olivares et al., 2013).

A fixação de N₂ pela simbiose rizóbio-leguminosa é estimada em 21 milhões de toneladas de nitrogênio a cada ano (Herridge et al., 2008). No entanto, a eficiência desse processo depende de vários fatores que estão ligados diretamente ao ambiente; à planta e à bactéria. Destaque para a temperatura, umidade e luz solar (fatores físicos do solo); genética e estado nutricional da planta; e eficiência e capacidade das estirpes de formar nódulos. Além da competitividade no solo entre estirpes introduzidas e nativas (Campo & Hungria, 2007).

O processo é intermediado por bactérias diazotróficas do solo, denominadas genericamente como rizóbio, em simbiose com a maioria das espécies que compõem a família botânica Leguminosae. Na simbiose rizóbio-leguminosa a leguminosa fornece os fotossintatos, derivados da fotossíntese, ao rizóbio, para manter sua atividade, que em contra partida, como benefício, fornece o nutriente nitrogênio para as plantas. O processo demanda grande energia, superior à absorção de N diretamente da solução do solo, chegando a comprometer cerca de 20 a 30% da fotossíntese total, na cultura da soja (Kaschuk et al., 2009).

Para que ocorra a simbiose as plantas liberam exsudatos, flavonoides, por exemplo, que induzem no rizóbio os genes de nodulação (genes *nod*), essenciais para o processo de infecção e nodulação. As plantas podem exsudar diferentes grupos de indutores, que podem controlar em algum grau a especificidade do hospedeiro (Hungria & Stacey, 1997). Essa interação rizóbio-leguminosa forma estruturas altamente específicas (nódulos) nas raízes, ocorrendo no seu interior inúmeras reações catalisadas pela enzima nitrogenase. O produto final dessas reações é a amônia (NH_3^+) que no citoplasma da planta hospedeira se transforma em íons amônio (NH_4^+) sendo posteriormente distribuídos pela planta e incorporados em diversas formas de N orgânico (Hungria et al., 2001), para um suprimento parcial e até total desse nutriente.

Como o nitrogênio é o nutriente requerido em maiores quantidades pelas culturas e o mais limitante à produção, e ainda, o uso de fertilizantes nitrogenados é um dos fatores que mais oneram o custo de produção e contribui para a emissão de gases do efeito estufa, a exploração da FBN através da inoculação com estirpes eficientes mostra-se uma tecnologia viável na redução da dependência do nitrogênio mineral. Entretanto, inúmeras ações devem ser adotadas para maximização da FBN, como a otimização dos sistemas de FBN já conhecidos (Olivares et al., 2013).

Uma das importantes formas de utilização desse processo na agricultura é a adubação verde com leguminosas, produzindo quantidade considerável de biomassa que após incorporação e mineralização, beneficia a cultura principal, cultivada posteriormente, se tornando fonte de nutrientes, principalmente nitrogênio derivado da FBN. Além disso, promove melhora do teor de matéria orgânica, da estrutura e da fertilidade do solo, pela ciclagem de vários outros nutrientes, e por consequência a redução do uso de adubos minerais (Silva et al., 2007), sem falar na cobertura do solo controlando o crescimento de ervas daninhas e combatendo a sua erosão.

Entre as diversas leguminosas promissoras para a prática da adubação verde está a mucuna preta (*Stizolobium aterrimum* Piper e Tracy). Espécie que apresenta, principalmente, grande produtividade de fitomassa da parte aérea, mostrando-se bastante promissora como adubo verde em diversas culturas (Queiroz et al., 2010; Andrade Neto et al., 2010; Ambrosano et al., 2013), inclusive na cana-de-açúcar na renovação do canavial (Ambrosano et al., 2011).

A mucuna preta é de origem africana, cujo ciclo, do plantio ao pleno florescimento, varia de 140 a 180 dias (Formentini, 2008). É uma leguminosa anual ou bianual, de crescimento intermediário, porte baixo, hábito rasteiro e com ramos trepadores vigorosos e bem desenvolvidos. Necessita de climas quentes, de invernos suaves, sem ocorrência de geadas e tolera baixa fertilidade e umidade do solo (Eiras & Coelho, 2010). É cultivada para adubação verde, mas também pode ser utilizada como forrageira. Produz entre 6 a 9 toneladas de massa seca e fixa entre 180 e 350 kg de N ha⁻¹ por safra (Formentini, 2008).

Favero et al. (2000), avaliando o desempenho de cinco espécies de leguminosas na região de Sete Lagoas-MG cultivadas com e sem capina, destacaram o grande potencial da mucuna preta apresentando uma das maiores produtividades médias de massa seca da parte aérea de 6,8 t ha⁻¹ e acúmulo de nitrogênio total de 206 kg ha⁻¹ inferior apenas ao feijão-bravo do Ceará. Barros et al. (2013) estudando plantas de cobertura e seus efeitos na cultura em sucessão encontraram produtividade para mucuna preta de 8,54 t ha⁻¹ de massa seca e acúmulo de N total de 274 kg ha⁻¹. Enquanto que Nascimento e Mattos (2007) obtiveram produtividade de 3,9 t ha⁻¹, demonstrando ampla variação no desenvolvimento desta espécie dependendo das condições edafoclimáticas (Barros et al., 2013).

A variação na produtividade de biomassa e acúmulo de nitrogênio, muitas vezes se deve ao fracasso da nodulação espontânea da mucuna preta, seja pela não presença de uma população nativa estabelecida ou baixa eficiência daquela existente. Portanto, a inoculação com estirpes eficientes, capazes de fixar maiores quantidades de N₂, e competitivas, pode aumentar a produtividade de biomassa da mucuna preta (Rodrigues et al., 1994), maximizando a FBN e aumentando o potencial da mucuna preta como adubo verde.

O efeito da inoculação em mucuna foi observado por alguns trabalhos em casa de vegetação, em substrato estéril, no qual a massa seca e N total foram superiores aos da testemunha sem inoculação e adubação nitrogenadas e semelhantes aos da estirpe de referência e do tratamento nitrogenado (Lima et al., 2012; Souza, 2014).

Chada & De-Polli (1988) verificando em solo, em casa de vegetação, a eficiência de estirpes normalmente utilizadas na inoculação de nove leguminosas tropicais para adubação verde, entre elas as mucunas preta, rajada e jaspeada,

observou que os inoculantes utilizados não estavam sendo mais eficiente para as estirpes nativas. Rodrigues et al. (1994) também avaliando a eficiência da inoculação de estirpes selecionadas de *Rhizobium* em mucuna preta em solo, também em casa de vegetação, observaram que a inoculação com estirpes selecionadas de rizóbio e a nodulação espontânea propiciaram o mesmo desempenho. Contudo, trabalhos avaliando o efeito da eficiência da inoculação de estirpes selecionadas em solo, em casa de vegetação e campo, ainda são escassos para a leguminosa mucuna preta.

A população nativa de rizóbio do solo, quando estabelecida, pode, além de não ser capaz de realizar uma simbiose eficiente, competir com as estirpes introduzidas na inoculação, selecionadas em casa de vegetação, por estar adaptada às características edafoclimáticas do local, não permitindo desempenhar o máximo potencial de fixação de N₂ para o qual essas estirpes foram selecionada (Soares et al., 2006). Normalmente, quanto maior a população nativa do solo, mais difícil o sucesso de estirpes introduzidas pela inoculação (Thies et al., 1991). Isso mostra a importância de uma avaliação prévia em solo, em ambiente controlado, e posteriormente em campo, para a obtenção de estirpes eficientes e competitivas com potencial para compor inoculante.

A seleção de novas estirpes, mais eficientes para inoculação, parte da avaliação da eficiência agrônômica dessas bactérias, que envolvem, comumente, três etapas. Antes, a busca por essas estirpes, normalmente, se inicia em um estudo de diversidade de população rizobiana que nodula a espécie hospedeira alvo. A primeira etapa, em vasos de Leonard, verifica-se a capacidade de fixação de nitrogênio. Na etapa seguinte, em vasos com solo, em ambiente controlado (casa de vegetação), avalia-se a competitividade frente à população nativa estabelecida, selecionando as estirpes que apresentarem melhor desempenho. A última etapa, em experimento de campo, avalia-se a eficiência agrônômica em ecossistemas de importância para a cultura, procedendo a seleção das mais eficientes. Etapas listadas nos anais da XIII reunião da RELARE (Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologias de inoculantes microbianos de interesse agrícola).

Os principais critérios de seleção de estirpes eficientes são: produção de biomassa da parte aérea e de nódulos, fáceis de medir e ligadas diretamente com a eficiência (Olivares et al., 2013). De acordo com Amado et al. (2002) a concentração

de N em leguminosas sob condições mínimas de cultivo, varia pouco por anos. A produção de matéria seca, entretanto, recebe influências edáfica, climática e fitossanitária, entre outras (Amado, 2002; Calegari et al., 2002). Portanto, o N a ser adicionado no solo pela leguminosa, normalmente, será determinado pela produção de matéria seca (Holderbaum et al., 2002).

Avaliações da capacidade de nodulação e eficiência da inoculação em espécies de leguminosas tropicais usadas como adubo verde, inoculadas com estirpes recomendadas, indicam que, apenas com a fixação simbiótica, o potencial máximo de produção dessas espécies não havia sido atingido, inclusive da mucuna preta, ressaltando a importância da busca por estirpes mais eficientes (Rodrigues et al., 1994). Muitas vezes, além da inoculação, recomenda-se a correção da acidez e da fertilidade do solo visando o aumento da simbiose e, conseqüentemente, da FBN (Amado et al., 2002).

Portanto, a busca por novas estirpes de maior capacidade de fixação do N₂ pode maximizar a FBN e, conseqüentemente, a produção de biomassa da mucuna preta, aumento o incremento de N no sistema e o potencial de uso dessa espécie como adubo verde.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi selecionar rizóbios nodulíferos de mucuna preta, de eficiência superior às estirpes recomendadas atualmente para a espécie, e competitivas, em condições de casa de vegetação e em campo experimental, com potencial para recomendação para inoculação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COMPETITIVIDADE E SELEÇÃO EM VASOS COM SOLO EM CASA DE VEGETAÇÃO

2.1.1 Origem dos isolados rizobianos

Foram estudados 39 isolados rizobianos de mucuna preta (Tabela 1), selecionados por Sousa (2014) em vasos de Leonard, oriundos de solos cultivados com cana-de-açúcar no Nordeste brasileiro (Tabela 2).

Tabela 1 - Origem e identificação dos 39 isolados rizobianos estudados

Estado	Região (Usina)	Área	Número de isolados	Identificação dos isolados
Alagoas	(Coruripe)	4	1	C4 - 8A
Pernambuco	Mata Sul (Trapiche)	1	9	T1 17C; 17D; 17F; 17G; 17I; 17M; 17Q; 17R; 17T
		2	15	T2 16D; 19A; 19AF; ;19AG; 19C; 19E; 19H; 19I; 19O; 19P; 19T; 19U-1; 19U-2; 19X; 19Z
		3	14	T3 12A; 12C; 16D; 16E; 16F; 16G; 16H; 16I; 16L; 16N; 16P; 16Q; 18F; 18G

2.1.2 Coleta do solo

O solo para realização do experimento de casa de vegetação foi coletado em setembro de 2014, na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina (EECAC/UFRPE), pertencente à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizada no município de Carpina, Pernambuco. Zona fitogeográfica da Mata e subzona mata seca (Andrade-Lima, 2007), com precipitação média de 1300 mm ano⁻¹ e temperatura anual média de 24°C, no qual predomina o tipo climático As', tropical chuvoso, com estação seca de verão, segundo classificação de Köppen-Geiger.

Tabela 2 - Características químicas e físicas, precipitação, classificação do solo e posição geográfica das áreas canavieiras de origem dos 39 isolados

Estado (Usina)	Área	pH (Água;1:2,5)	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+ Al	P mg dm ⁻³	CO g kg ⁻¹
			----- cmol _c dm ⁻³ -----							
AI (Coruripe)	4	4,9	0,04	0,11	1,5	0,25	0,35	4,95	7,9	8,94
PE (Trapiche)	1	4,3	0,03	0,11	0,7	0,03	1,00	6,73	4,3	17,59
	2	6,0	0,17	1,64	4,5	1,61	0,00	4,19	54,7	21,40
	3	5,7	0,03	0,04	2,0	0,60	0,00	3,51	24,4	11,72
		Areia	Silte	Argila	Classe Textural	Classificação do solo	¹ Precipitação (mm)	Posição Geográfica	Altitude (m)	
		----- g kg ⁻¹ -----								
AI (Coruripe)	4	690	110	200	Francoarenosa	Plintossolo argilúvico	159,8	10°35'35.7"S 36°05'54.5"W	854	
	1	460	120	420	Francoargilo- arenosa	Argissolo Amarelo		8°29'39.1"S 35°03'13.9"W	45	
PE (Trapiche)	2	280	230	490	Argila	Latossolo Amarelo	151,5	8°26'50.7"S 35°06'03.8"W	79	
	3	690	60	250	Francoargilo- arenosa	Argissolo Amarelo		8°29'56.0"S 35°02'06.18"W	32	

Fonte: Souza (2014), modificado. ¹média de 10 anos. CO - Carbono Orgânico.

O solo é classificado como ARGISSOLO AMARELO Distrocoeso (PA dx) de textura média (Alves & Ribeiro, 1994) cultivado com a cultura da cana-de-açúcar (cv RB867515) em sistema convencional. As amostras de solo foram retiradas em área cultivada com cana planta, na camada de 0,0 a 0,2 m e transportadas para casa de vegetação, localizada na UFRPE, no qual foi desenvolvida a pesquisa durante o período de novembro de 2014 a janeiro de 2015. Para amenizar a temperatura no interior da casa de vegetação instalou-se uma tela sombrite preta (sombreamento 50%) sobre a cobertura.

Duas subamostras do solo coletado foram retiradas, uma foi seca ao ar e passada em peneira de 2 mm para posterior realização das análises química e física, conforme metodologia descrita pela Embrapa (1997), e a outra conservada em refrigerador, a aproximadamente 4°C, para posterior avaliação da população nativa de rizóbio estimando o número de células viáveis, pelo método do número mais provável (Andrade & Hamakawa, 1994) (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização química, física e microbiológica do solo utilizado em casa de vegetação

pH	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+ Al	P	CO
(Água;1:2,5)	----- cmol _c dm ⁻³ -----						mg dm ⁻³	g kg ⁻¹
5,4	0,04	0,12	1,67	0,60	0,10	6,68	15,31	12,28
Camada (m)	Classe textural			Granulometria				
				Areia	Silte	Argila		
0,0 - 0,2	Francoarenosa			----- g kg ⁻¹ -----				
				751	49	200		
¹ População rizobiana			3,9x10 ² células de rizóbio g de solo ⁻¹					

P, K e N - extração por Mehlich⁻¹; Ca, Mg e Al - extração por KCl (1mol L⁻¹); H+Al-extração por Acetato de Cálcio (0,5 mol L⁻¹ a pH7); CO - Carbono Orgânico; ¹ Determinação pelo método do número mais provável de diluição e infecção em plantas de caupi.

2.1.3 Determinação da população de rizóbio no solo

A determinação da população de rizóbio no solo seguiu o método quantitativo do número mais provável de diluição e infecção em plantas de caupi (Andrade & Hamakawa, 1994), cultivar IPA206, com cinco repetições. Cultivadas em vaso (saco plástico de polietileno de 1,0 dm³ de volume) preenchido com 0,5 kg de substrato areia+vermiculita (1:1, v:v), esterilizado em autoclave. Foram semeadas quatro sementes por vaso, deixando-se apenas uma planta, após o desbaste, quando as plântulas já estavam estabelecidas (quatro dias).

O inóculo foi obtido de acordo com Andrade & Hamakawa (1994), com adaptação. As diluições foram preparadas em solução salina (0,85%) obtendo a série de diluições de 10^{-1} até 10^{-5} . Para formar a diluição 10^{-1} pesou-se 20,0g de solo e adicionou-se em um frasco de Erlenmeyer com 180,0 ml de solução salina, homogeneizada em agitador orbital por 10 minutos. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 2,0ml desta solução e acrescentada em um tubo de ensaio com 18,0ml de solução salina, procedendo à homogeneização em agitador de tubos, formando a diluição 10^{-2} . E assim sucessivamente, retirando alíquota de 2,0ml da última diluição até formar a diluição 10^{-5} . Em cada uma das cinco plantas, logo após o desbaste, inoculou-se 2,0ml de cada diluição.

Cada vaso recebeu semanalmente 0,25 L da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (Hoagland & Arnon, 1950), isenta de nitrogênio. Após 25 dias, a partir da inoculação, as plantas foram coletadas e realizou-se a avaliação visual da presença ou ausência de nódulos nas plantas inoculadas. A partir dos resultados positivos (nodulação) e negativos (não nodulação) estimou-se o número de células viáveis de rizóbio na amostra utilizando a tabela de número mais provável, realizando também a correção em relação à umidade do solo (Andrade & Hamakawa, 1994).

2.1.4 Montagem do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação usando sacos plásticos pretos de polietileno de 2 dm^3 de volume preenchido com 2,5 kg de solo não estéril. Antes, o solo foi seco ao ar e passado em peneira de 4 mm seguido da correção com calcário dolomítico (PRNT 77%) correspondendo a uma dose de $0,6 \text{ t ha}^{-1}$ (532 mg vaso^{-1}), calculado pelo método da elevação dos teores trocáveis de Ca + Mg (IPA, 2008) fornecendo $2,5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, homogeneizado e incubado por 30 dias mantendo a umidade do solo em 80% da capacidade de vaso.

Para adubação básica de P e K, calculada à base de massa, aplicou-se $53,2 \text{ mg vaso}^{-1}$ de P_2O_5 e $35,5 \text{ mg vaso}^{-1}$ de K_2O correspondendo às doses de 60 kg ha^{-1} e 40 kg ha^{-1} (Embrapa, 2000) utilizando como fontes, superfosfato simples e cloreto de potássio. O nitrogênio foi fornecido na forma de ureia, em solução ($11,82 \text{ g L}^{-1}$ de água destilada) nas doses de 60; 120; 180 e 240 kg ha^{-1} de N, parceladas em três aplicações, 1/3 da dose no plantio e as outras duas aos 15 e 30 dias.

Sementes de mucuna preta foram escarificadas quimicamente para superação da impermeabilidade do tegumento, através da imersão em ácido sulfúrico concentrado por 20 minutos (Maeda & Lago, 1986) seguido de imediata lavagem com água destilada por várias vezes. As sementes foram pré-germinadas em bandeja com substrato de areia+vermiculita (1:1, v:v), esterilizado em autoclave, por quatro dias, seguido do transplântio de uma plântula por saco e inoculação de 1 ml do inoculante no colo da planta.

O preparo do inoculante partiu do cultivo das bactérias recomendadas e nativas, separadamente, em meio de cultura sólido YMA com indicador azul de bromotimol (Vincent, 1970), vertido em placas de Petri, mantidas a 28° C pelo período de 72 horas. Do meio sólido, repicou-se as colônias de cada bactéria isoladamente em 1ml de meio cultura líquido YM sem indicador (Vincent, 1970), em tubo eppendorf®, colocados em agitador horizontal na rotação de 120 rpm por 72 horas em temperatura ambiente atingindo população próxima de 10⁹ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) ml⁻¹, recomendada pela SDA/MAPA (2011), por grama ou mililitro de produto, para bactérias fixadoras de nitrogênio para simbiose com leguminosas.

Estimou-se a população bacteriana no inoculante, às 72 horas, pelo método da diluição seriada decimal e contagem em placa de Petri (Andrade & Hamakawa, 1994), até a diluição 10⁻¹¹, transferindo alíquotas de 1 ml das diluições, para meio sólido YMA, em duplicata, com indicador vermelho congo. As placas foram mantidas a 28°C e observadas por sete dias, seguido da contagem, para placas que apresentaram entre 30 e 300 UFC, e após o cálculo da média das duas repetições estimou-se o número de UFCs por mililitro.

2.1.5 Condução e coleta

As plantas foram cultivadas por 45 dias, a partir do plantio. A inoculação foi realizada no plantio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e 45 tratamentos: 39 bactérias isoladas de nódulos de mucuna preta; mistura de duas estirpes recomendadas para mucuna preta, SEMIA6156 e SEMIA 6158 (Tabela 4); quatro adubações nitrogenadas (60; 120; 180 e 240 kg ha⁻¹ de N); e um controle sem inoculação e sem adubação nitrogenada (nativa). No total

foram 225 unidades experimentais tutoradas com barbante. A rega foi efetuada de acordo com a necessidade, com água destilada.

Tabela 4 - Identificação das estirpes recomendadas pelo MAPA para inoculação em mucuna preta e utilizadas como referência

Cepa autorizada (SEMIA)	Designação original	Instituição que recomendou	Gênero/Espécie	¹ Nº Acesso GenBank	² Nível de recomendação
³ 6156	CPAC F2	Embrapa Cerrados	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	AY904758	IV
6158	CPAC C2	Embrapa Cerrados	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	AY904760	IV

¹Número de acesso da sequência completa do gene ribossomal 16S no GenBank. ²Teste a campo.

³Recomendação SDA/MAPA2006. Fonte: SDA/MAPA (2011)

Aos 20 dias, para controle da cercosporiose (*Cercospora sp.*), aplicou-se o produto comercial *Dithane* (800g de i.a. kg⁻¹), nome comum: mancozebe. Utilizou-se a concentração de 0,26g L⁻¹ de ingrediente ativo, 10% da dose do produto comercial recomendada para a cultura do amendoim, para o volume de calda de 600L ha⁻¹, aplicado com pulverizador costal.

Na colheita, separou-se a parte aérea da raiz e lavou-se o sistema radicular em água corrente para a retirada de qualquer partícula sólida, retirando os nódulos, acondicionando todos, separadamente, em saco de papel para secagem em estufa de ar forçado a 65°C durante três dias. Foram computadas as seguintes variáveis: massa seca de nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR). Também foi determinada a concentração de N total no tecido da parte aérea (CNPA) pelo método semimicro Kjeldahl (Embrapa, 2009) depois da moagem da amostra seca em moinho de facas tipo Willye. Determinou-se o acúmulo de N na parte aérea (ANPA) pelo produto entre o teor e a matéria seca.

Foi construída uma curva de regressão relacionando os valores de MSPA dos tratamentos que receberam as doses de N mineral para estimar, através do modelo de regressão gerado, a dose de N necessária para o ganho de MSPA das plantas inoculadas de cada isolado. Outras duas regressões relacionando as doses de N aplicadas e o acúmulo e concentração de N na parte aérea. E ainda, calculada a eficiência relativa (ER) à dose de 120 Kg ha⁻¹, conforme equação:

$$ER = \left(\frac{\text{ANPA de cada tratamento}}{\text{ANPA do tratamento nitrogenado com 120 kg de N ha}^{-1}} \right) \times 100$$

Os dados das variáveis avaliadas foram submetidos à análise de normalidade. Os dados da variável CNPA foram transformados em raiz quadrada. Depois de atendido os pressupostos realizou-se a análise de variância (ANOVA) e, quando significativa, o teste de comparação múltipla de médias pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) utilizando o software Sisvar. A correlação entre as variáveis foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson utilizando o software Statistix 10.0.

Os cinco isolados que promoveram os maiores acúmulos de MSPA, foram selecionados para eficiência agronômica a campo.

2.2 EFICIÊNCIA AGRONÔMICA A CAMPO

O experimento a campo foi realizado também na EECAC, em local diferente com características químicas diferentes, mas com solo de mesma classificação, classe textural e histórico de uso (Tabela 5).

Tabela 5 - Caracterização química, física e microbiológica do solo no experimento a campo

pH	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+ Al	P	CO
(Água; 1:2,5)	----- cmol _c dm ⁻³ -----						mg dm ⁻³	g kg ⁻¹
4,9	0,08	0,13	3,10	0,90	0,25	7,87	7,37	16,12
Camada (m)	Classe textural			Granulometria				
				Areia	Silte		Argila	
0,0 - 0,2	Francoarenosa			----- g kg ⁻¹ -----				
				591	69		340	
1População rizobina			6,7x10 ² células de rizóbio g de solo ⁻¹					

P, K e N - extração por Mehlich⁻¹; Ca, Mg e Al - extração por KCl (1mol L⁻¹); H+Al-extração por Acetato de Cálcio (0,5 mol L⁻¹ a pH7); CO - Carbono Orgânico; ¹ Determinação pelo método do número mais provável de diluição e infecção em plantas de caupi.

Para caracterização química do solo e posterior correção, coletaram-se 16 amostras simples que compuseram uma amostra composta, na camada de 0,0 – 0,2 m, e posterior secagem ao ar, destorroamento e peneiramento em malha de 2 mm.

O preparo da área partiu da destruição dos resíduos culturais com grade aradora pesada, seguido da aplicação, em área total, do calcário dolomítico (PRNT 77%), a lanço, correspondendo a uma dose de 0,65t ha⁻¹, calculada pelo método de neutralização do Al³⁺ (IPA, 2008), e incorporação, deixando a área em repouso por 60 dias, devido à baixa umidade do solo.

Cultivou-se a mucuna preta em sistema de sequeiro, entre o fim de maio e início de julho de 2015, no período chuvoso da região, com precipitação acumulada durante os 45 dias de cultivo de 336,1mm (IPA - Estação meteorológica EECAC). Entretanto, antes da semeadura a área foi molhada através do sistema de irrigação com pivô central, devido à baixa umidade do solo em decorrência do atraso do início das chuvas.

Antes do plantio realizou-se a adubação básica com P e K utilizando as mesmas doses e as mesmas fontes do experimento em casa de vegetação na fase anterior. Aplicou-se os adubos minerais em sulcos de 3 cm de profundidade ligeiramente ao lado da futura linha de semeadura. O método de plantio da mucuna preta foi manual, distribuindo de seis a oito sementes por metro, totalizando 48 sementes por linha e 336 por parcela, em linhas espaçadas 50 cm (Embrapa, 2000) a 3 cm de profundidade. Superou-se a impermeabilidade do tegumento das sementes por método não sulfúrico, tendo em vista a grande quantidade de sementes utilizadas, através da imersão em água quente a 65°C por cinco minutos (Kobori et al., 2013).

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com oito tratamentos e quatro repetições, com parcelas medindo 3,5 x 6,0 m (21m²) e distanciadas em 1 m, totalizando 32 parcelas experimentais. Considerando o percentual de viabilidade das sementes de 79% (BRSEEDS[®]) e espaçamento entre plantas de 12,5 x 50,0 cm, o experimento apresentou 266 plantas por parcela correspondendo a 126667 plantas ha⁻¹.

Os tratamentos compreenderam a inoculação separada de cinco isolados pré-selecionados no experimento em casa de vegetação, uma inoculação com a mistura das estirpes recomendadas (SEMI6156 e SEMIA6158) e outros dois tratamentos: sem N mineral e sem inoculação (nativa) e um tratamento nitrogenado na dose de 80kg ha⁻¹ na forma de ureia, aplicado parcelado, 1/3 no plantio, também em sulco, e os 2/3 restantes após 15 dias, em cobertura, após a capina manual, antes da cobertura total do solo pela planta.

As bactérias foram multiplicadas e a população estimada, tanto no inoculante quanto no solo, conforme metodologia adotada no experimento em casa-de-vegetação. O inóculo foi misturado à turfa (pH 5,8; Condutividade Elétrica 1,5 dS m⁻¹

e umidade máxima de 55%), esterilizada por autoclavagem, na proporção 1:1 (volume:massa) do inóculo líquido na turfa.

A inoculação seguiu a forma padrão descrita pela Relare (2007). As sementes foram umedecidas em solução açucarada (10%) adicionando 6 ml kg⁻¹ de semente, para efeito adesivo. Inocularam-se aproximadamente 700.000 células de cada isolado separadamente, por semente, ou seja, 10g do inoculante turfoso com população estimada em 10⁹ UFC g⁻¹ de inoculante em um kg de semente, com aproximadamente 1400 sementes. As sementes foram secas à sombra e plantadas imediatamente.

Colheu-se aos 45 dias, a partir da emergência, com o auxílio de um enxadão para a retirada da planta do solo juntamente com a raiz, preservando os nódulos. Foram colhidas quatro plantas aleatoriamente dentro das três linhas centrais de cada parcela dispensando 1 m em cada cabeceira (área útil de 10 m²) evitando o efeito bordadura. As variáveis analisadas foram as mesmas do experimento em casa de vegetação, sendo a ER baseada no tratamento nitrogenado de dose 80kg de N ha⁻¹.

As variáveis MSN e MSR foram transformadas em raiz cúbica, e ER no inverso (hiperbólica do primeiro grau). A análise estatística foi realizada conforme descrito no experimento em casa de vegetação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPETITIVIDADE E SELEÇÃO EM VASOS COM SOLO EM CASA DE VEGETAÇÃO

A massa seca da parte aérea (MSPA) variou em função de crescentes doses de N com alto coeficiente de determinação, de 0,94 (Figura 1). A máxima produção de MSPA da mucuna preta foi estimada na dose 160 kg de N ha⁻¹, atingindo 4,28 g planta⁻¹.

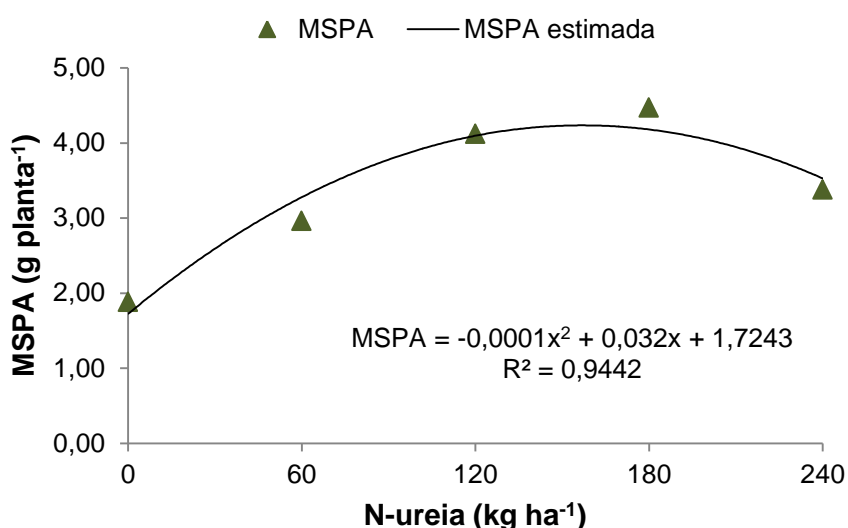


Figura 1 – Produção de massa seca da parte aérea (MSPA) da mucuna preta em função da aplicação de N em doses crescentes (n=5).

No entanto, observaram-se acréscimos na concentração (CNPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA) com o aumento das doses, exceto para a dose de 240 kg de N ha⁻¹ que promoveu decréscimo do ANPA (Figura 2) devido a menor produção de MSPA, provavelmente provocada pela toxidez da alta dose de N (Malavolta et al., 1997). A influência de doses crescentes de N na MSPA com aumento tanto da concentração quanto do acúmulo de nitrogênio na parte aérea com elevados coeficientes de determinação, também foi observada por Calheiros et al. (2015) avaliando a diversidade e eficiência de isolados rizobianos para calopogônio originados de um argissolo sob diferentes coberturas vegetais.

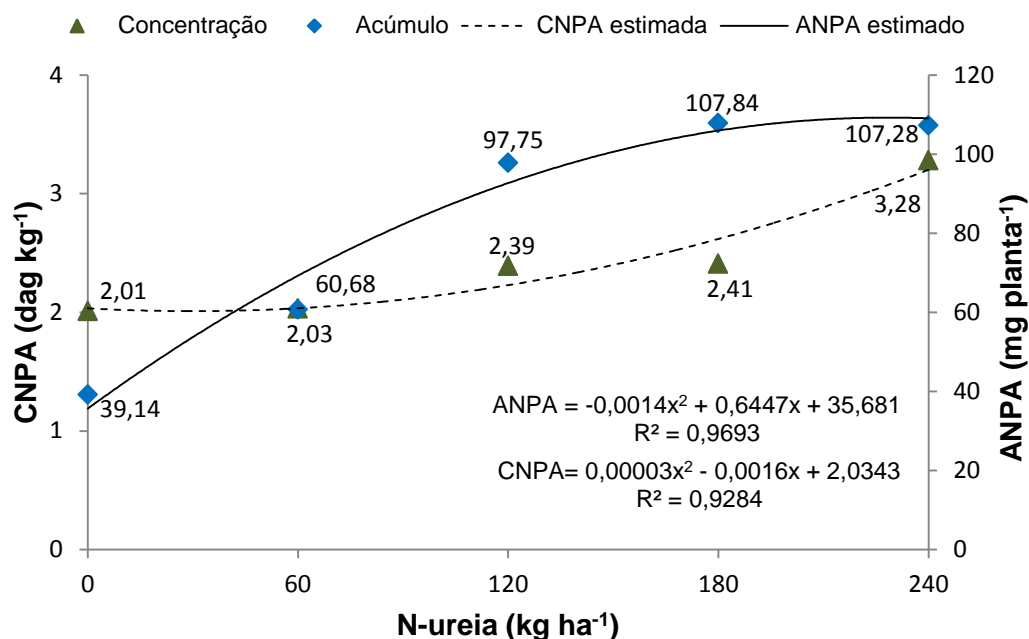


Figura 2 – Concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de nitrogênio na parte aérea de mucuna preta em função da aplicação de N em doses crescentes (n=5).

Os resultados mostram claramente o efeito positivo do maior fornecimento de nitrogênio à mucuna preta, promovendo incrementos de MSPA, CNPA e ANPA, até determinado ponto (Figura 1 e 2; Tabela 6). Portanto, a inoculação de estirpes com maior capacidade de fixação do N₂ pode maximizar a produção de fitomassa e o acúmulo de N para a espécie.

Quanto à nodulação observou-se que o tratamento sem inoculação e sem aplicação de N (nativa) apresentou formação de nódulos, mas de baixa massa seca (MSN), 38 mg planta⁻¹, significativamente inferior comparado aos demais isolados estudados e a inoculação da mistura de duas estirpes de referência (SEMIA6156-6158), exceto para os isolados T3.16L, com 70 mg planta⁻¹; e T3.16N, com 61 mg planta⁻¹, não diferindo estatisticamente (Tabela 6). Isso mostra a presença de uma população estabelecida no solo com capacidade de nodular mucuna preta, mas em baixo número, estimado em 390 células de rizóbio g de solo⁻¹ (Tabela 3). No tratamento nitrogenado não houve formação de nódulos em nenhuma das doses aplicadas, provavelmente devido ao efeito da aplicação do fertilizante nitrogenado restringindo a nodulação espontânea, também observado por Melo & Zilli (2009) avaliando a fixação biológica de nitrogênio em cinco cultivares de feijão-caupi em casa de vegetação e em campo, no qual o tratamento com N teve redução na nodulação em relação ao controle.

Tabela 6 - Massa seca de nódulo (MSN), raiz (MSR), parte aérea (MSPA), concentração (CNPA) e acúmulo de N (ANPA) na parte aérea, eficiência relativa (ER) e dose N (DOSE N) de 39 isolados rizobianos avaliados e dos tratamentos controles: nitrogenado (60, 120, 180 e 240 kg de N ha⁻¹), mistura de estirpes referências (SEMIA6156-6158) e absoluto (nativa)

Tratamento	MSPA	MSR	MSN	CNPA	ANPA	¹ ER	² DOSE N
	---- g planta ⁻¹ ----		(mg planta ⁻¹)	(dag kg ⁻¹)	(mg planta ⁻¹)	(%)	(kg ha ⁻¹)
C4.8A	3,23a ± 0,32	1,93a ± 0,09	217a ± 83	1,99a ± 0,09	64,59b ± 9,22	66,07b ± 10,25	81,34a ± 15,50
T1.17M	4,06a ± 0,05	1,56a ± 0,04	276a ± 10	2,13a ± 0,08	86,42a ± 2,00	88,40a ± 3,94	137,05a ± 5,00
T1.17C	3,40a ± 0,47	1,27b ± 0,10	246a ± 18	2,86a ± 0,25	97,75a ± 19,33	100,00a ± 26,35	92,75b ± 24,00
T1.17F	3,28a ± 0,87	1,42a ± 0,38	265a ± 10	2,40a ± 0,16	77,25a ± 15,60	79,02b ± 8,57	84,69a ± 49,50
T1.17G	3,14a ± 0,71	1,47a ± 0,53	198a ± 40	2,47a ± 0,22	75,46a ± 9,92	77,19a ± 11,32	75,30a ± 43,12
T1.17I	3,07a ± 0,12	1,37a ± 0,43	112b ± 42	2,07a ± 0,63	62,55b ± 16,30	63,98b ± 19,15	70,60b ± 5,33
T1.17Q	3,02a ± 0,21	1,22b ± 0,34	144b ± 44	2,55a ± 0,49	76,28a ± 12,62	78,03a ± 14,00	67,24b ± 9,25
T1.17D	3,01a ± 0,55	1,10b ± 0,24	213a ± 49	2,57a ± 0,38	77,32a ± 16,63	79,09a ± 17,35	66,57b ± 27,63
T1.17R	2,70b ± 0,85	1,07b ± 0,07	108b ± 88	2,06a ± 0,85	62,68b ± 40,41	64,12b ± 33,47	45,77b ± 35,00
T1.17T	2,20b ± 0,46	0,80b ± 0,06	115b ± 44	2,43a ± 0,43	53,74b ± 14,44	54,97b ± 17,97	12,21b ± 6,67
T2.19E	4,20a ± 0,63	1,56a ± 0,37	244a ± 81	2,15a ± 0,13	89,70a ± 8,28	91,76a ± 7,43	146,44a ± 5,00
T2.19A	3,89a ± 0,30	1,84a ± 0,38	275a ± 60	2,22a ± 0,33	85,54a ± 7,63	87,50a ± 11,30	125,60a ± 24,00
T2.19X	3,73a ± 0,33	1,41a ± 0,11	262a ± 54	2,55a ± 0,13	94,75a ± 8,12	96,93a ± 6,27	114,89a ± 25,68
T2.19T	3,48a ± 0,75	1,11b ± 0,17	190a ± 42	2,26a ± 0,12	78,42a ± 16,20	80,22a ± 13,70	98,12a ± 35,25
T2.16D	3,30a ± 0,43	1,22b ± 0,20	236a ± 40	2,24a ± 0,08	78,67b ± 7,36	80,48b ± 2,32	86,04a ± 22,50
T2.19I	3,26a ± 0,40	1,16b ± 0,07	206a ± 51	2,32a ± 0,22	76,15a ± 15,05	77,90a ± 10,02	83,35a ± 20,75
T2.19AG	3,20a ± 0,67	1,09b ± 0,42	157a ± 46	2,66a ± 0,30	82,84a ± 6,85	84,74a ± 8,79	79,32a ± 44,00
T2.19H	3,16a ± 0,42	1,30b ± 0,17	196a ± 24	2,73a ± 0,15	86,15a ± 12,90	88,13a ± 10,30	76,64a ± 20,25
T2.19Z	3,03a ± 0,18	0,96b ± 0,13	130b ± 47	2,29a ± 0,20	69,01b ± 2,21	70,59a ± 3,04	67,91b ± 8,22
T2.19U-2	2,93a ± 0,15	1,39b ± 0,08	210a ± 35	2,59a ± 0,08	76,22a ± 6,21	77,97a ± 5,26	61,20a ± 7,50
T2.19O	2,74b ± 0,59	1,09b ± 0,20	125b ± 76	2,41a ± 0,17	65,90b ± 13,11	67,41b ± 12,61	48,45b ± 26,44
T2.19U-1	2,65b ± 0,37	1,16b ± 0,36	194a ± 52	2,58a ± 0,21	66,46b ± 10,33	67,98b ± 7,66	42,41b ± 14,40
T2.19P	2,35b ± 0,12	0,79b ± 0,08	88b ± 61	2,28a ± 0,31	53,67b ± 8,79	54,90b ± 7,99	22,28b ± 4,25
T2.19C	2,34b ± 0,24	1,05b ± 0,30	101b ± 41	2,03a ± 0,13	47,20b ± 1,88	48,28b ± 1,62	21,61b ± 8,75
T2.19AF	2,32b ± 1,12	0,89b ± 0,34	132b ± 44	2,81a ± 0,20	66,52b ± 35,62	68,05b ± 42,61	20,26b ± 17,56
T3.12A	3,44a ± 1,13	1,74a ± 0,19	193a ± 113	2,26a ± 0,45	80,55a ± 33,56	82,40a ± 31,83	95,43a ± 34,89
T3.18G	3,34a ± 0,66	1,30b ± 0,17	203a ± 31	2,36a ± 0,20	80,47a ± 23,76	82,32a ± 24,84	88,72a ± 21,13
T3.16P	3,34a ± 0,20	1,32a ± 0,36	189a ± 82	2,51a ± 0,28	83,92a ± 12,60	85,85a ± 15,87	88,72b ± 8,67
T3.12C	3,27a ± 0,60	1,67a ± 0,30	178a ± 82	2,16a ± 0,42	73,26a ± 26,15	74,94a ± 29,83	84,02a ± 31,00
T3.16Q	3,22a ± 0,54	1,21b ± 0,27	132b ± 42	2,07a ± 0,23	67,63b ± 18,12	69,18b ± 20,06	80,67a ± 27,25
T3.16D	3,18a ± 0,86	1,29b ± 0,46	172a ± 107	2,24a ± 0,34	74,34a ± 28,95	76,05a ± 32,73	77,98a ± 35,60
T3.16E	3,17a ± 0,78	1,13b ± 0,21	161a ± 63	2,47a ± 0,23	76,95a ± 16,23	78,72a ± 13,35	77,31a ± 46,50
T3.16I	2,92a ± 0,37	1,26b ± 0,27	157a ± 41	2,36a ± 0,15	68,38b ± 6,73	69,95b ± 6,15	60,53b ± 14,88
T3.16G	2,80b ± 0,20	1,50a ± 0,19	214a ± 36	2,27a ± 0,06	63,39b ± 2,97	64,84b ± 3,65	52,48b ± 8,50
T3.16H	2,55b ± 0,69	0,90b ± 0,15	142b ± 25	2,31a ± 0,23	58,14b ± 16,51	59,47b ± 12,64	35,70b ± 27,52
T3.16F	2,38b ± 0,36	0,96b ± 0,23	127b ± 45	2,32a ± 0,21	55,03b ± 8,37	56,29b ± 7,75	24,29b ± 13,04
T3.16N	2,28b ± 0,33	0,93b ± 0,23	61c ± 57	2,00a ± 0,30	51,09b ± 11,61	52,26b ± 15,40	17,58b ± 11,56
T3.18F	2,17b ± 0,24	0,95b ± 0,20	130b ± 59	2,19a ± 0,16	47,05b ± 2,43	48,13b ± 5,66	10,20b ± 8,25
T3.16L	1,29b ± 0,25	0,72b ± 0,12	70c ± 25	2,14a ± 0,13	27,33b ± 4,28	27,95b ± 3,77	0,00b ± 0,00
SEMIA 6156-6158	3,94a ± 0,58	1,70a ± 0,32	295a ± 18	2,20a ± 0,18	85,63a ± 7,63	87,60a ± 12,26	128,99a ± 25,25
60kg	2,96a ± 0,34	1,06b ± 0,16	-	2,03a ± 0,40	60,68b ± 15,33	62,07b ± 18,83	63,22b ± 15,52
120kg	4,12a ± 0,20	1,70a ± 0,05	-	2,39a ± 0,26	97,75a ± 7,21	100,00a ± 0,00	141,07a ± 15,12
180kg	4,47a ± 0,21	1,70a ± 0,45	-	2,41a ± 0,22	107,84a ± 10,03	110,32a ± 14,40	164,56a ± 11,52
240kg	3,38a ± 0,36	1,23b ± 0,24	-	3,28a ± 0,75	107,28a ± 20,45	109,74a ± 23,87	91,40a ± 23,63
nativa	1,88b ± 0,95	0,90b ± 0,22	36c ± 5	2,01a ± 0,31	39,14b ± 20,11	40,04b ± 22,03	0,00b ± 0,00
CV (%)	22,8	27,5	45,7	21,2	30,1	31,6	58,0

Médias, na coluna, seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Skott-Knott. ¹ER = ANPA de cada tratamento/ANPA do tratamento nitrogenado(dose de 120 kg ha⁻¹). ²Dose de N estimada pela regressão gerada da MSPA das plantas em função da aplicação de crescentes doses de N.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a CNPA (Tabela 6). Entretanto, excetuando os isolados T3.16N e C4.8A, todas as plantas inoculadas com os demais isolados apresentaram CNPA acima do tratamento sem inoculação e sem aplicação de N. Além disso, a CNPA das plantas inoculadas com os isolados testados não diferiram das diferentes doses de N aplicadas, inclusive a mais alta 240 kg ha⁻¹, e da inoculação com a mistura das estirpes de referência (SEMIA6156-6158).

A MSN apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Destaque para a inoculação com os isolados T1.17M (276 mg planta⁻¹), T2.19A (275 mg planta⁻¹), T1.17F (265 mg planta⁻¹), T2.19X (262 mg planta⁻¹) e T2.19E (244 mg planta⁻¹) não diferindo da inoculação com a mistura das estirpes de referência SEMIA6156-6158 (295 mg planta⁻¹), mas estatisticamente superiores ao tratamento sem inoculação e aplicação de N. Observou-se também ampla variação no potencial de nodulação dos diferentes isolados avaliados, variando de 61 a 276 mg planta⁻¹ (Tabela 6). Além disso, a maior produção de massa seca de nódulos não esteve necessariamente associada a maior produção de MSPA e maior concentração de N na parte aérea, o que era esperado. Rodrigues et al. (1994) testando estirpes de *Rhizobium* em mucuna preta e feijão de porco, em casa de vegetação com aplicação de diferentes doses de calcário em solo, na presença e ausência de adubação básica, também não observaram diferença significativa na massa seca de nódulos na mucuna inoculada, além de observarem tendência de diminuição da MSN conforme o aumento da dose de N aplicada.

Para MSPA, 26 dos 39 isolados, apresentaram desempenho semelhante à dose de 240 kg ha⁻¹ e a inoculação com a mistura das estirpes de referência, não diferindo significativamente, e superiores ao tratamento nativa. Destaque para os cinco isolados mais eficientes T2.19E; T1.17M; T2.19A; T2.19X e T2.19T com produção de MSPA de 4,20; 4,06; 3,89; 3,73 e 3,48 g planta⁻¹ (Tabela 6). Os dois isolados mais eficientes, mesmo não apresentando diferença significativa para a inoculação com a mistura das estirpes de referência, ainda promoveram acúmulo de massa seca de parte aérea superior em 6,6% e 3,1% a esta mistura. No que se refere ao tratamento nativa os incrementos em MSPA promovido por esses dois isolados foram excepcionais 123,4% e 115,9%. Isso mostra sua grande capacidade simbiótica e a importância da inoculação em mucuna preta.

Santos et al. (2005) também observaram menor produção de biomassa seca da parte aérea para o tratamento sem N e sem inoculação em amendoim, provavelmente devido ao baixo teor de N do solo, favorecendo os tratamentos com inoculação dos rizóbios e da adubação mineral. A MSPA, em solos com baixos teores de N e na ausência de fertilizantes nitrogenados, representa um dos principais indicativos das condições nutricionais da soja (Souza et al., 2008). Ainda de acordo com esses autores, essa variável vem sendo usada como critério de seleção, essencialmente desde que foi feita a primeira seleção de estirpes. Assim, os cinco isolados que apresentaram os maiores valores foram selecionados para o teste de eficiência agronômica a campo.

A massa seca da raiz (MSR) apresentou diferença significativa nos diferentes tratamentos, com os maiores valores associados aos tratamentos que apresentaram, também, produção de MSPA significativamente superior, exceto para o isolado T3.16G. Efeito significativo da inoculação na produção de MSR também foi observado por Chagas Júnior et al. (2014) estudando a promoção de crescimento em feijão-caupi inoculado com rizóbio e *Trichoderma spp.* no cerrado, quando as plantas inoculadas apresentaram MSR significativamente superior do controle sem inoculação. A existência de algumas espécies de rizóbio promotoras de crescimento de plantas, segundo Gray & Smith (2005), pode explicar a produção significativa de MSR promovida pela inoculação de alguns isolados, produzindo reguladores de crescimento auxiliando no desenvolvimento radicular. Lima et al. (2012) avaliando a diversidade e capacidade simbiótica de isolados bacterianos de nódulos de mucuna cinza e anã, em casa de vegetação utilizando como substrato areia e vermiculita autoclavados, também apontaram a produção de reguladores de crescimento vegetal para explicar o aumento do desenvolvimento radicular em tratamentos com alguns isolados avaliados.

A CNPA foi a única variável no qual o efeito dos tratamentos não apresentou diferença significativa, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) (Tabela 6). As plantas inoculadas, mesmo com MSN significativamente superior para alguns isolados, não diferiram quanto ao conteúdo de N da parte aérea comparado aos tratamentos sem inoculação e sem N, inoculação com as estirpes de referência (SEMIA6156-6158) e aplicação das diferentes doses de N (60; 120; 180 e 240 kg ha⁻¹). Com valores próximos do encontrado por Ambrosano et al. (1997), de 2,76 dag kg⁻¹.

O ANPA apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). Destaque para os isolados T1.17C (97,75 mg planta⁻¹); T2.19X (94,75 mg planta⁻¹); T2.19E (89,70 mg planta⁻¹); T1.17M (86,42 mg planta⁻¹) e T2.19H (86,15 mg planta⁻¹), não diferindo das doses de N: 120 (97,75 mg planta⁻¹); 180 (107,84 mg planta⁻¹) e 240 kg ha⁻¹ (107,28 mg planta⁻¹). Os mesmos isolados que apresentaram maior ANPA também foram os que atingiram as maiores ER (%): 100,0; 96,9; 91,7; 88,4 e 88,1 não diferindo estatisticamente entre si e também em relação as doses de 180 e 240 kg ha⁻¹, e superior à dose de 60kg ha⁻¹. Apenas o isolado T3.16L (27,5%) apresentou eficiência relativa inferior ao tratamento NATIVA (40,0%).

Com relação à dose de N que seria necessária aplicar para corresponder ao N fixado biologicamente, estimada pela regressão MSPA em função das doses crescentes de N (Figura 1), os isolados que se destacaram em proporcionar as maiores doses foram os mesmos que apresentaram maior produção de MSPA: T2.19E; T1.17M; T2.19A; T2.19X e T2.19T, com doses estimadas em 146,4; 137,0; 125,6; 114,8 e 98,1 kg ha⁻¹, superior ao tratamento nativa que não proporcionou ganho, devido à baixa produção de massa seca da parte aérea, e superior 2,3; 2,2; 1,9; 1,8 e 1,6 vezes ao tratamento nitrogenado adubado com a dose de 60kg ha⁻¹, respectivamente.

Avaliando a correlação de Pearson, é possível observar que ela foi positiva para a maioria das variáveis, exceto para a variável CNPA em relação à MSR (Tabela 7). Destaque para o alto coeficiente de correlação entre o ANPA e as variáveis MSPA e ER, com 81,7 e 96,7 %, respectivamente. Além da MSPA com DOSEN, 94,0 %.

Tabela 7 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis: massa seca de nódulo (MSN), raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), concentração (CNPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA), eficiência relativa (ER) e dose N (DOSE N)

	MSR	MSN	CNPA	ANPA	ER	DOSE N
MSPA	0,668	0,400	0,105	0,817	0,773	0,940
MSR	-	0,213	-0,137	0,430	0,409	0,647
MSN	-	-	0,142	0,365	0,332	0,351
CNPA	-	-	-	0,645	0,644	0,086
ANPA	-	-	-	-	0,967	0,765
ER	-	-	-	-	-	0,714

Valores negativos correspondem à correlação negativa.

3.2 EFICIÊNCIA AGRONÔMICA A CAMPO

De maneira geral pôde-se observar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) da inoculação com cada um dos cinco isolados selecionados em casa de vegetação comparado aos demais tratamentos, para as variáveis MSN, MSR, MSPA e ER (Tabela 8).

Contudo, o isolado T2.19A apresentou a maior MSN, $3,11 \text{ g planta}^{-1}$, em média 2,0; 1,9 e 1,5 vezes maior que o controle nitrogenado (80 kg ha^{-1}), o controle sem nitrogênio e sem inoculação (nativa) e a inoculação com a mistura de duas estirpes de referência (SEMIA6156-6158), respectivamente. As plantas que não foram inoculadas nem receberam a aplicação de N (nativa) apresentaram nodulação, com MSN de $1,62 \text{ g planta}^{-1}$ (Tabela 8), similar a todos os tratamentos, e população estimada em $6,7 \times 10^2$ células de rizóbio g de solo⁻¹ (Tabela 5). Esse resultado mostra a existência de uma população nativa estabelecida de simbioses de mucuna preta, em baixa população, mas de elevada eficiência simbiótica. Além do tratamento nativa, o controle nitrogenado também apresentou nodulação, com massa seca de nódulos de $1,52 \text{ g planta}^{-1}$ (Tabela 8), menor valor, mas não diferente significativamente, evidenciando nodulação mesmo com aplicação da dose de $80 \text{ kg de N ha}^{-1}$, na forma de ureia.

Tabela 8 - Massa seca de nódulo (MSN), raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), concentração (CNPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA), e eficiência relativa (ER) dos cinco isolados rizobianos avaliados em campo e dos tratamentos adubação nitrogenada ($80 \text{ kg de N ha}^{-1}$), inoculação da mistura de estirpes de referência (SEMIA6156-6158) e controle sem inoculação e sem N (nativa)

Tratamento	MSN	MSR	MSPA	CNPA	ANPA	ER
	----- g planta ⁻¹ -----			(dag kg ⁻¹)	(mg planta ⁻¹)	(%)
T2.19A	3,11a±1,85	0,99a±0,08	44,03a±3,41	2,42a±0,31	1066,25a±140,03	164,70a±45,35
T1.17M	1,79a±0,09	1,17a±0,18	40,16a±9,54	2,29a±0,09	1025,84a±206,35	140,82a±49,74
T2.19E	1,91a±0,28	1,10a±0,23	37,65a±1,77	1,93b±0,24	729,38b±112,05	113,26a±28,72
T2.19X	1,77a±0,84	1,05a±0,14	37,95a±7,10	1,88b±0,24	694,96b±55,12	114,49a±3,99
T2.19T	2,12a±1,01	1,04a±0,06	36,36a±8,95	1,62b±0,15	573,63b±94,27	83,31a±1,71
SEMIA6156-6158	2,06a±0,33	1,06a±0,14	34,63a±6,02	1,52b±0,21	537,26b±134,45	87,63a±18,52
80 kg	1,52a±1,34	0,85a±0,06	32,14a±5,49	2,12a±0,21	675,87b±104,86	100,00a±0,00
nativa	1,62a±0,44	1,01a±0,23	28,69a±2,65	1,78b±0,25	502,93b±31,98	83,49a±8,90
CV (%)	68,7	22,5	22,9	15,0	25,8	30,2

Médias, na coluna, seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott. ER = ANPA de cada tratamento/ANPA do tratamento nitrogenado correspondente à dose de 80 kg ha^{-1} .

Para MSPA, a inoculação com os cinco isolados pré-selecionados em casa de vegetação não diferiram ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. Entretanto, os isolados T2.19A e T1.17M apresentaram desempenhos superiores, com produção de MSPA de 44,03 e 40,16 g planta⁻¹, promovendo incrementos de 15,34 (1943 kg ha⁻¹); 11,89 (1506 kg ha⁻¹) e 9,4 g de MSPA planta⁻¹ (1191 kg ha⁻¹), e de 11,47 (1453 kg ha⁻¹); 8,02 (1016 kg ha⁻¹) e 5,53 g de MSPA planta⁻¹ (701 kg ha⁻¹) em relação aos tratamentos nativa, nitrogenado (80 kg ha⁻¹) e inoculação com a mistura das estirpes SEMIA6156-6158 (Tabela 8), respectivamente. Esse resultado mostra a importância da inoculação com estirpes mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio para mucuna preta.

O tratamento sem inoculação e aplicação de N, com produtividade de MSPA de 3,6 t ha⁻¹ e acúmulo de 63,7 kg de N ha⁻¹, apresentou resultados inferiores aos encontrados por Favero et al. (2000), com 6,8 t de MSPA ha⁻¹ e acúmulo de N de 205 kg ha⁻¹, e Teodoro et al. (2009), com produção de matéria seca de parte aérea de 7,5 t ha⁻¹ e acúmulo de N de 199,87 kg ha⁻¹, ambos com colheita das plantas em pleno florescimento, entre 140 e 180 dias. Esse resultado se deve à colheita precoce das plantas, realizada aos 45 dias.

Entretanto, mesmo com a colheita antecipada, as plantas inoculadas com os isolados selecionados em casa de vegetação apresentaram alta produção de MSPA e acúmulo de N, destaque para os isolados T2.19A promovendo produção de 5,6 t ha⁻¹ e acúmulo de 135,1 kg de N ha⁻¹, e o isolado T1.17M com produção de 5,1 t ha⁻¹ e acúmulo de 113,8 kg de N ha⁻¹, valores inferiores, mas próximos aos encontrados para a espécie, variando de 6 a 9 t ha⁻¹ de matéria seca e acúmulo de N entre 180 e 350 kg ha⁻¹, com cultivo durante 140 a 180 dias, segundo Formentini (2008).

Com desempenho superior aos demais isolados testados, ao tratamento nativa, à adubação com 80 kg de N ha⁻¹ e a mistura das estirpes SEMIA6156-6158, ainda que não diferindo estatisticamente, os isolados T2.19A e T1.17M se mostraram bastante promissores para recomendação de inoculação em mucuna preta.

Para a variável CNPA houve diferença significativa entre os tratamentos. Destaque para as plantas inoculadas com os isolados T2.19A e T1.17M, com os maiores teores de N na parte aérea, diferindo significativamente dos demais isolados

testados e da inoculação com mistura das estirpes de referência, com concentração de 2,42 e 2,29 dag kg⁻¹, e não diferindo da aplicação de 80kg de N ha⁻¹.

Em relação ao ANPA, esses isolados também apresentaram os melhores desempenhos, significativamente superiores aos demais tratamentos, com acúmulo de 1066,25 (135,1 kg ha⁻¹) e 1025,85 (113,8 kg ha⁻¹) mg planta⁻¹, respectivamente (Figura 3). Incremento médio de N promovido com a inoculação do isolado T2.19A de 563,32 (71,4 kg ha⁻¹); 528,99 (67,0 kg ha⁻¹) e 390,38 mg planta⁻¹ (49,5 kg ha⁻¹), e pelo isolado T1.17M de 522,91 (50,1 kg ha⁻¹); 488,58 (45,7 kg ha⁻¹) e 349,97 mg planta⁻¹ (28,2 kg ha⁻¹), comparado ao tratamento nativa, a inoculação com a mistura das estirpe de referência e a adubação nitrogenada (80 kg ha⁻¹), respectivamente. Vale ressaltar que o maior acúmulo de N na parte aérea também está associado à maior produção de MSPA.

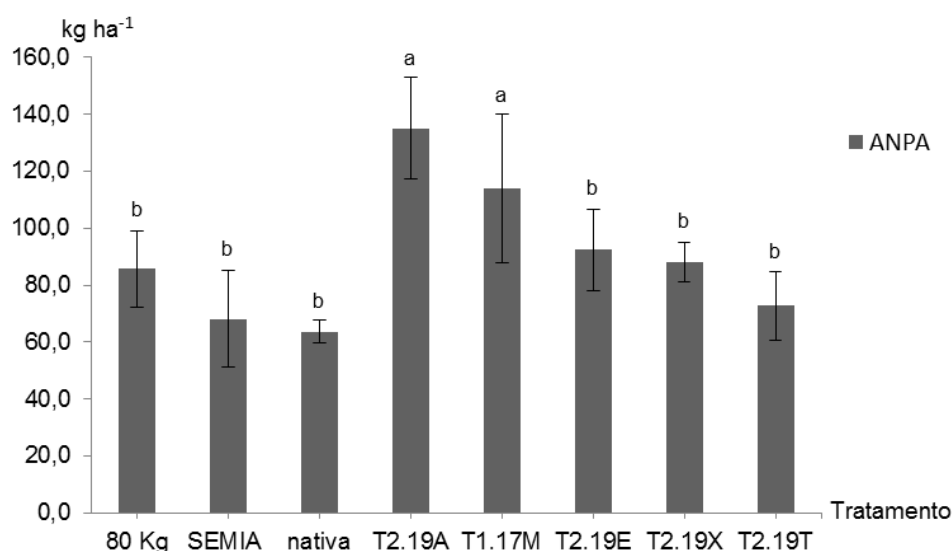


Figura 3 – Acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) em kg ha⁻¹, de plantas de mucuna preta aos 45 dias de cultivo, inoculadas com a mistura de duas estirpes recomendadas pelo MAPA para a espécie (SEMIA6156-6158), cinco isolados rizobianos pré-selecionados em casa de vegetação, além de dois tratamentos controles: nitrogenado (80 kg de N ha⁻¹ na forma de ureia) e nativa (sem inoculação e sem N). Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Segundo Giller (2011), em média, 70 % do N acumulado em mucuna preta é proveniente da fixação biológica do N₂. Com base nessa afirmativa, pode-se estimar que o incremento médio de N oriundo da FBN com a inoculação do isolado T2.19A foi de 50,0; 46,9 e 34,7 kg ha⁻¹, e pelo isolado T1.17M de 35,1; 32,0 e 19,7 kg ha⁻¹, comparado ao tratamento nativa, a inoculação com a mistura das estirpe de referência e a adubação nitrogenada (80 kg ha⁻¹), respectivamente.

Para ER não houve diferença significativa entre os tratamentos, embora os mesmos isolados que apresentaram produção de MSPA significativamente superior, também apresentaram maior ER, de 164,7% (T2.19A) e 140,8% (T1.17M) comparado à adubação com 80kg de N ha⁻¹.

Quanto à correlação entre as variáveis, foi positiva entre todas, destaque para a alta correlação entre ANPA e as variáveis MSPA e ER com 90,6 e 76,6%, respectivamente (Tabela 9). Isso se deve à relação direta entre MSPA e ANPA, e ainda, a ER usa como base de cálculo o ANPA dos tratamentos com os diferentes isolados rizobianos em relação ao tratamento nitrogenado. Além disso, mesmo positiva, a correlação entre as variáveis MSN e CNPA foi a mais baixa (4,3%).

Tabela 9 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis: massa seca de nódulo (MSN); raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA); concentração (CNPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER)

	MSR	MSPA	CNPA	ANPA	ER
MSN	0,098	0,427	0,043	0,400	0,329
MSR	-	0,400	0,212	0,171	0,164
MSPA	-	-	0,045	0,766	0,593
CNPA	-	-	-	0,659	0,675
ANPA	-	-	-	-	0,906

Valores negativos correspondem à correlação negativa.

Esses resultados mostram o alto potencial de fixação biológica de nitrogênio dos isolados T2.19A e T1.17M tanto em casa de vegetação quanto, ainda mais, em campo, promovendo grande produção de MSPA e acúmulo de N em menor tempo de cultivo da leguminosa, importante em espécies usadas na adubação verde. Esse resultado evidencia a importância da inoculação em mucuna preta com rizóbios eficientes potencializando seu uso como adubo verde, favorecendo também, sua inserção em cultivos com rotação e sucessão de culturas. De acordo com Teodoro et al. (2011), isso seria inviabilizado devido a permanência dessa espécie por longo período na área de cultivo, por seu ciclo ser mais longo comparado a outras espécies de adubo verde promovendo menor otimização da área.

4 CONCLUSÕES

A inoculação com os isolados T2.19E, T1.17M, T2.19A, T2.19X e T2.19T promoveram as maiores produções de MSPA em mucuna preta cultivada em vasos com solo em casa de vegetação sendo selecionados para avaliação da eficiência agronômica a campo.

Os isolados T2.19A e T1.17M apresentaram grande potencial para a produção de inoculantes por promoverem acúmulo de nitrogênio na parte aérea, no campo, significativamente superior à aplicação de 80kg de N ha⁻¹, à inoculação com a mistura das estirpes recomendadas SEMIA6156 e SEMIA6158 e ao tratamento sem inoculação e sem adubação nitrogenada. Porém, outros experimentos de campo, por um período maior, ainda são necessários para melhor avaliação do potencial de FBN desses isolados.

5 REFERÊNCIAS

ALBERGONI, L. & PELAEZ, V. Da Revolução Verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas? **Revista de Economia**, v.33, n.1, p.31-53, 2007.

ALVES, A. J. de O.; RIBEIRO, M. R. Classificação e aptidão agrícola dos solos da Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, Caderno Omega, n.6, p.35-55, jul. 1994.

ANDRADE-LIMA, D. Estudos Fitogeográficos de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas**, Recife, v.4, p.243-274, 2007.

ANDRADE NETO, R. C.; MIRANDA, N. O.; DUDA, G. P.; GOÉS, G. B.; LIMA, A. S. Crescimento e produtividade do sorgo forrageiro BR 601 sob adubação verde. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.2, p.124-130, 2010.

ANDRADE, D. S. & HAMAKAWA, P. J. 1994. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas, p.63-94. In: HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R. S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - SPI, Brasília, Distrito Federal.

AMADO, T. J. C. Adubação verde de inverno para o Alto Vale do Itajaí. In: AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 26:241-248, 2002.

AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 26:241-248, 2002.

AMBROSANO, E. J.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G. M. B.; SCHAMMAS, E. A.; et al. Produtividade da cana-de-açúcar após o cultivo de leguminosas. **Bragantia**, Campinas, v.70, n.4, p.810-818, 2011.

AMBROSANO, E. J.; FOLTRAN, D. E.; CAMARGO, M. S.; ROSSI, F.; SCHAMMASS, E. A.; SILVA, E. C. da; AMBROSANO, G. M. B.; DIAS, F. L. F. Acúmulo de biomassa e nutrientes por adubos verdes e produtividade de cana-planta cultivada em sucessão, em duas localidades de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**. 8(1): 199-209, 2013.

AMBROSANO, E. J.; TRIVELIN, P. C. O.; MURAOKA, T. Técnica para marcação dos adubos verdes crotalária júncea e mucuna-preta com ^{15}N para estudos de dinâmica do nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v.56, n.1, 1997.

BARROS, D. L. de; GOMIDE, P. H. O.; CARVALHO, G. J. de. Plantas de cobertura e seus efeitos na cultura em sucessão. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.29, n.2, p.308-318, 2013.

CALEGARI, A.; MONDARDO, A.; BULISANI, E. A.; WILDNER, L. P.; COSTA, M. B. B. et al. Adubação verde no Sul do Brasil. In: AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 26:241-248, 2002.

CALHEIROS, A. S.; LIRA JUNIOR, M. de A.; SANTOS, M. V. F.; LYRA, M. do C. C. P. Symbiotic effectiveness and competitiveness of calopo rhizobial isolates in an ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO under three vegetation covers in the dry forest zone of Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 39:367-376, 2015.

CAMPO, R. J. & HUNGRIA, M. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. In: XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologias de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE). **Documento n. 290**. Embrapa Soja, Londrina, PR, p. 89, 2007.

CHADA, S. de S. & DE-POLLI, H. Nodulação de leguminosas tropicais promissoras para adubação verde em solo deficiente em fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 23(11) : 1197-1202, 1988.

CHAGAS JÚNIOR, A. F. C.; OLIVEIRA, A. G. de; SANTOS, G. R. dos; REIS, A. F. de B.; CHAGAS, L. F. B. Promoção de crescimentos em feijão-caupi inoculado com rizóbio e *Trichoderma* spp. no cerrado. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.27, n.3, p.190-199, 2014.

COSTA, D. B. da; ANDRADE, P. K. B. de; SILVA, S. A. M. da; SIMÕES NETO, D. E.; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, E. C. A. de. Adubação Fosfatada em cana planta e soca em argissolos do nordeste de diferentes texturas. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.27, n.4, p.47-56, out./dez. 2014.

EIRAS, P. P. & COELHO, F. C. Adubação verde na cultura do milho. **Niterói: Programa Rio Rural**, p.14, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Solo. **Manual de métodos de análises de solo**. Rio de Janeiro: CNPS, 1997. 212p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes, Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Mucuna preta *Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy leguminosa para adubação verde do solo e alimentação de bovinos. **Recomendação Técnica Nº15**. Embrapa Amazônia Oriental, Altamira, Pará, 2000.

EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (IPA). **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco**. 2. ed.. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 2008. 198p.

FAO STATISTICAL YEARBOOK. World food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2013.

FAVERO, C.; JUCKSCH, I.; COSTA, L.M.; ALVARENGA, R.C.; NEVES, J.C.L. Crescimento e acúmulo de nutrientes por plantas espontâneas e por leguminosas utilizadas para adubação verde. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 24: 171-177, 2000.

FORMENTINI, E. A. Cartilha sobre adubação verde e compostagem. **INCAPER** - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Vitória, 2008.

FREITAS, A. D. S. de; SILVA, T. O. da; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. de S. B.; ARAÚJO, E. R.; FRAGA, V. da S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.9, p.1856-1861, 2011.

GILLER, K. E. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. In: TEODORO, R. B.; OLIVEIRA, F. L. de; SILVA, D. M. N. da; FÁVERO, C.; QUARESMA, M. A. L. Aspectos agronômicos de leguminosas para adubação verde no Cerrado do Alto Vale do Jequitinhonha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.35, n.2, 2011.

GRAY, E. J. & SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.395-412, 2005.

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

HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Berkeley: California Agricultural Experiment Station Circular**, 347:1-32, 1950.

HOLDERBAUM, J. F.; DECKER, A. M.; MEISINGER, J. J.; MULFORD, F. R.; VOUGH, L. R. Fall-seeded legume cover crops for no-tillage corn in the humid East. In: AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 26:241-248, 2002.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. 2006. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and

bradyrhizobial inoculants. CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Symbiosis**, v.48, p.154-163.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. 2005. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Symbiosis**, v.48, p.154-163.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Fixação Biológica do Nitrogênio na Cultura da Soja. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p. (**Embrapa Soja. Circular Técnica, 35**)

HUNGRIA, M. & STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: Basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biol. Biochem.** v.29, n. 5/6, p. 819-830, 1997.

KASCHUK, G.; KUYPER, T. W.; LEFFELAAR, P. A.; HUNGRIA, M.; GILLER, K. E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses?. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, p.1233-1244, jun. 2009.

KEATING, B. A.; HERRERO, M.; CARBERRY, P. S.; GARDNER, J.; COLE, M. B. Food wedges: Framing the global food demand and supply challenge towards 2050. **Global Food Security**, v.3, ed. 3-4, p.125-132, nov. 2014.

KEATING, B. A. & CARBERRY, P. S. Sustainable production, food security and supply chain implications. **Aspects Applied Biology**, v.102, p. 7-20, 2010.

KOBORI, N. N.; MASCARIN, G. M.; CICERO, S. M. Métodos não sulfúricos para superação de dormência de sementes de mucuna-preta (*Mucuna aterrima*). **Informativo ABRATES**, v.23, n.1, 2013.

LIMA, A. A. de; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S. de; NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M.; GERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversidade e Capacidade Simbiótica de Rizóbios Isolados de Nódulos de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 36:337-348, 2012.

MAEDA, J. A. A. & LAGO, A. A. do. Germinação de sementes de mucuna-preta após tratamentos para superação da impermeabilidade do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.8, n.1, p. 79-84, 1986.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 319p, 1997.

MELO, S. R. de; ZILLI, J. É. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.9, p. 1177-1183, 2009.

NASCIMENTO, C.S. do; LIRA JUNIOR, M. de A.; STAMFORD, N.P.; FREIRE, M.B.G.S.; SOUZA, C.A. Nodulação e produção do Caupi (*Vigna unguiculata* L.) sob efeito de plantas de cobertura e inoculação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 32: 579-587, 2008.

NASCIMENTO, A. F. do & MATTOS, J. L. S. de. Produtividade e de biomassa e supressão de plantas espontâneas por adubos verdes. **Agroecologia**, v.2, p.33-38, 2007.

OLIVARES, J.; BEDMAR, E.J.; SANJUÁN, J. Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. **The American Phytopathological Society**, Molecular Plant-Microbe Interactions, v.16, n.5, p. 486-494, 2013.

QUEIROZ, L. R.; GALVÃO, J. C. C.; CRUZ, J. C.; OLIVEIRA, M. F.; TARDIN, F. D. Supressão de plantas daninhas e produção de milho-verde orgânico em sistema de plantio direto. **Planta Daninha**, Viçosa, v.28, n.2, 2010.

RELARE - Anais da XIII Reunião de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola. **Documentos Nº 290**. Embrapa Soja, Londrina, PR, 212p, 2007.

RODRIGUES, E.F. da G.; DE-POLLI, H.; EIRA, P.A. da. Inoculação, calagem e adubação para mucuna-preta e feijão-de-porco num solo podzólico Vermelho-Amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.5, p. 807-814, 1994.

SANTOS, C. E. R. e S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. de M. B.; SOUTO, S. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANECK, N. G. Efetividade de rizóbios

isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum**. Agronomia, Maringá, v.27, n.2, p. 301-307, 2005.

SDA/MAPA, SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº13, de 24 de março de 2011. Disponível em: < <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1229256> >. Acesso em: 16 de abril de 2014.

SILVA, G.; LIMA, A.; NOSOLINE, S.; RUMJANEK, N.; XAVIER, G. Seleção de inoculante rizobiano para feijão-de-porco. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p. 1232-1235, 2007.

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

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

SOUZA, C. A de. **Diversidade e seleção rizobiana para leguminosas usadas como adubo verde em solos da região canavieira nordestina**. 2014. 84f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife.

TEODORO, R. B.; OLIVEIRA, F. L. de; SILVA, D. M. N. da; FÁVERO, C. Acúmulo de fitomassa e ciclagem de nutrientes por leguminosas Herbáceas no município de Turmalina-MG. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, 2009.

TEODORO, R. B.; OLIVEIRA, F. L. de; SILVA, D. M. N. da; FÁVERO, C.; QUARESMA, M. A. L. Aspectos agrônômicos de leguminosas para adubação verde

no Cerrado do Alto Vale do Jequitinhonha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.35, n.2, 2011.

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

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

ZILLI, J. É.; PEREIRA, G. M. D.; JÚNIOR, I. F.; SILVA, K. da; HUNGRIA, M.; ROUWS, J. R. C. Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. **Acta Amazonica**, Manaus, v.43, n.2, 2013.