

**ALINE MEDEIROS DE ARRUDA**

**AVALIAÇÃO DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI QUANTO À EFICIÊNCIA  
PARA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO COM ESTIRPES ISOLADAS DE  
SOLOS DO SEMIÁRIDO DE PERNAMBUCO**

**RECIFE-PE**

**2016**

**ALINE MEDEIROS DE ARRUDA**

**AVALIAÇÃO DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI QUANTO À EFICIÊNCIA  
PARA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO COM ESTIRPES ISOLADAS DE  
SOLOS DO SEMIÁRIDO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia: Melhoramento Genético de Plantas, para a obtenção do título de mestre.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador: Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior

Co - Orientador: Dr. Antônio Félix da Costa

Dra. Adeneide Candido Galdino Saraiva

**RECIFE-PE  
2016**

Ficha catalográfica

A779a Arruda, Aline Medeiros de  
Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à  
eficiência para fixação biológica de nitrogênio com estirpes  
isoladas de solos do semiárido de Pernambuco / Aline  
Medeiros de Arruda. – Recife, 2016.  
64 f. : il.

Orientador: Mario de Andrade Lira Junior.  
Dissertação (Mestrado em Melhoramento genético de  
plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Agronomia, Recife, 2016.  
Referencias.

1. BRS Marataoã 2. BRS Guariba 3. IPA 206  
4. Nitrogênio I. Lira Junior, Mario de Andrade, orientador  
II. Título

CDD 630

ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação..

**AVALIAÇÃO DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI QUANTO À EFICIÊNCIA  
PARA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO COM ESTIRPES ISOLADAS DE  
SOLOS DO SEMIÁRIDO DE PERNAMBUCO**

**ALINE MEDEIROS DE ARRUDA**

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em:

**ORIENTADOR:**

---

Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior - UFRPE

**EXAMINADORES:**

---

Prof. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto - UFRPE

---

Dr. José Nildo Tabosa - IPA

**RECIFE – PE  
2016**

ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação..

A Deus e toda minha família,

**Ofereço**

Às minhas avós Maria das Graças de Medeiros e Odete Gonçalves de Arruda (in memorian), pelo apoio e amor em todos os momentos que precisei.

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus por estar sempre presente em minha vida, proporcionando paz, alegria e realização dos meus sonhos.

Aos meus pais, Washington Arruda e Maria Elizabete por todo o apoio, incentivo e conselhos que me guiaram e ajudaram a construir o meu caráter, tornando meu sonho virar realidade. Ao meu irmão Allan Medeiros, pelo carinho, companheirismo e motivação.

À minha segunda família que me deu muito carinho e sempre me apoiaram. À minha sogra Jandira, ao sogro Luciano e aos cunhados Leonardo e Luana.

Ao meu noivo Leandro Valeriano, pelo amor, apoio e companheirismo, dedicados todos os dias. Por várias vezes me ajudou, não apenas me incentivando a seguir em frente nos momentos difíceis, mas também, presencialmente, nas montagens e coletas dos experimentos conduzidos em casa de vegetação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela minha formação profissional, bem como a Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Às minhas amigas Cybelle Souza e Jacilene Santana que lutaram junto comigo para a construção deste trabalho, bem como ensinamentos, alegria e risadas proporcionadas, por isso meu eterno e sincero agradecimento.

Às minhas amigas Millena Ítala, Manoela Pino, Laís Menezes, Camila Brito, Sabrina Lopes, Débora Magalhães e Elisângela Alves que sempre dividiram comigo as alegrias e tristezas e sempre estarão comigo.

Aos colegas de mestrado Merian, Esmael, João Carlos, Laís, Marta, Ítalo, João Paulo, Roneilson, Robson, Thuany, Yrlania, pelo aprendizado e prazeroso convívio.

A Clayton Albuquerque de Souza pela grande ajuda com os cálculos estatísticos.

Aos professores de mestrado Dr. Gerson Quirino, Dra. Vivian Lages, Dr. Edson Ferreira e Dr. José Luis, pelos ensinamentos e dedicação ao programa de pós-graduação em Melhoramento Genético de Plantas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior, pelos ensinamentos repassados.

ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação..

Ao meus co-orientadores, Dr. Antônio Félix da Costa, do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) e Dra. Adeneide Cândido, pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dr. José Nildo Tabosa e Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto, por terem aceitado o convite a contribuir com este trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram pelo meu sucesso e êxito neste trabalho.

Meu muito obrigada!

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO II

- Figura 1. Caracterização morfológica de isolados obtidos de caupi IPA-206, provenientes do grupo de solo de alta fertilidade do semiárido pernambucano ..... 37
- Figura 2. Caracterização morfológica de isolados obtidos de caupi IPA-206, provenientes do grupo de solo de baixa fertilidade do semiárido pernambucano..... 38
- Figura 3. Dendrograma de similaridade baseada nas características morfológicas dos isolados de rizóbio provenientes do grupo de solo de alta fertilidade do semiárido pernambucano..... 39
- Figura 4. Dendrograma de similaridade baseada nas características morfológicas dos isolados de rizóbio provenientes do grupo de solos de baixa fertilidade do semiárido pernambucano..... 40

### CAPÍTULO III

- Figura 1. Nodulação a partir dos grupos de solos de alta e de baixa fertilidade, oriundos do semiárido de Pernambuco. .... 53



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Características climáticas, classes de solos e cobertura vegetal das áreas amostradas (Lira 2014).....	31
Tabela 2. Características químicas e físicas dos grupos de solos utilizados para obtenção de nódulos com médias e intervalos de confiança a 95% (Lira 2014) .....	31
Tabela 3. Descrição das características morfofisiológicas utilizadas para a caracterização fenotípica dos isolados bacterianos, oriundos do semiárido pernambucano. ....	33
Tabela 4. Índices de diversidades (Shannon - Weaver), equitabilidade (Pielou), riquezas de espécies (Margalef) e dominância (Simpson) dos isolados obtidos dos grupos de solos de alta e baixa fertilidade do semiárido pernambucano .....	42

### CAPÍTULO III

Tabela 1. Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA) de diferentes isolados das cultivares BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.....	53
Tabela 2. Valores médios da matéria seca da raiz (MSR) de diferentes isolados da cultivar BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.....	54
Tabela 3. Valores médios da matéria seca dos nódulos (MSN) de diferentes isolados da cultivar BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.....	55
Tabela 4. Valores médios dos números de nódulos (NN) de diferentes isolados da cultivar BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.....	56
Tabela 5. Valores médios do acúmulo de nitrogênio da parte aérea (ANPA) de diferentes isolados da cultivar BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.....	57
Tabela 6. Valores médios da eficiência relativa (ER) de diferentes isolados da cultivar BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.....	58

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
<b>CAPITULO I</b>	
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1. Importância das leguminosas .....	14
1.2. Feijão-caupi.....	14
1.3. Cultivares de feijão-caupi.....	16
1.4. Fixação Biológica de Nitrogênio.....	17
1.5. Importância da diversidade de estirpes rizobianas.....	18
1.6. Inoculação e seleção de estirpes.....	18
1.7. FBN e Melhoramento Genético de Plantas.....	19
1.8. Referências .....	21
2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS PROVENIENTES DE SOLOS DO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI.....	27
2.1. RESUMO.....	27
2.2. ABSTRACT .....	28
2.3. INTRODUÇÃO .....	29
2.4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
2.4.1. Origem do material .....	30
2.4.2. Isolamento e caracterização .....	32
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
2.6. CONCLUSÃO.....	42
2.7. REFERÊNCIAS .....	42
3. EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES RIZOBIANAS EM CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI .....	47
3.1. RESUMO.....	47
3.2. ABSTRACT .....	48
3.3. INTRODUÇÃO .....	49
3.4. MATERIAL E MÉTODOS .....	50
3.4.1. Autenticação dos isolados .....	50
3.4.2. Teste de eficiência simbiótica .....	51
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
3.6. CONCLUSÃO.....	60
3.7. REFERÊNCIAS .....	61

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI QUANTO À EFICIÊNCIA PARA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO COM ESTIRPES ISOLADAS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO DE PERNAMBUCO**

Devido às condições de adaptabilidade e valor nutritivo, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) tornou-se importante fonte de proteína em algumas regiões do país, permitindo ampla perspectiva no agronegócio brasileiro. Esta leguminosa granífera possui alta capacidade de fixar N em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, da qual podem dispensar total ou parcialmente os fertilizantes nitrogenados, o que reduz os custos de produção, além de servir como alicerce ao programa de melhoramento vegetal. A avaliação de populações nativas destas bactérias em cultivares de feijão-caupi permite a seleção de estirpes eficientes, adaptados às condições locais, resultando no aumento de produtividade do feijão-caupi. Este trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência simbiótica de populações rizobianas, provenientes de solos do semiárido pernambucano (Brazil), como método mais eficiente para seleção de estirpes rizobianas para recomendação para produção de inoculantes em três variedades de feijão-caupi: BRS Marataoã, BRS Guariba e IPA 206. Amostras de solos foram coletadas na camada de 0-0,1m de profundidade em diferentes municípios pernambucanos, provenientes de dois grupos de solos, um com alta fertilidade e outro de baixa fertilidade. Um experimento foi conduzido para a obtenção de nódulos para isolamento e os isolados foram caracterizados morfológicamente em meio YMA. Os índices de diversidade de Shannon-Weaver, dominância de Simpson, riqueza de Margalef e uniformidade de Pielou, foram calculados para cada grupo de solo. As populações de rizóbios foram avaliadas em vasos de Leonard em casa de vegetação utilizando o delineamento experimental de blocos casualizados com quatro repetições. As necessidades nutricionais do feijão-caupi foram supridas com solução nutritiva. Foram observadas e avaliadas as seguintes variáveis: Massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR), número (NN) e massa de nódulos secos (MSN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER). Estas variáveis foram submetidas à análise de variância com as médias comparadas pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.3. A maioria dos isolados mais eficientes foram oriundos do grupo de solo de baixa fertilidade, com destaque para o isolado 49. A menor diversidade rizobiana no grupo de solo de alta fertilidade pode ter sido devida a uma menor dependência destas plantas da fixação

ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação... 11  
biológica de nitrogênio enquanto os solos menos férteis podem ter efetuado uma  
pressão seletiva, permanecendo os isolados mais eficientes. A cultivar BRS Guariba  
apresentou maior desempenho na eficiência relativa, demonstrando uma boa  
especificidade simbiótica entre as estirpes.

**Palavras-chave:** inoculantes, seleção, especificidade, biodiversidade.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF COWPEA CULTIVARS FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION WITH STRAINS ISOLATED FROM PERNAMBUCO SEMIARID SOILS

Due to its adaptability and nutritive value, cowpea (*Vigna unguiculata*) is an important protein source in some regions of Brazil, with good perspectives in the Brazilian agribusiness. This pulse, in symbiosis with nitrogen fixing bacteria, has a high nitrogen fixation potential, and may dispense completely or partially nitrogen fertilizers, reducing production costs. The evaluation of native populations of these bacteria in cowpea cultivars allows the selection of efficient strains, adapted to local conditions, and leading to higher cowpea yields. This work aims to evaluate the symbiotic efficiency of rhizobial populations from Pernambuco State semiarid soils as a more efficient method for the selection of rhizobial strains for inoculant production, using three cultivars of cowpea (BRS Marataoã, BRS Guariba and IPA 206). Soil samples were collected from the 0-0.1 m depth layer in different Pernambuco municipalities from two groups of soil, one high and one low fertility. An experiment was done to collect nodules for isolation, and isolates were morphologically characterized in YMA media. Shannon-Weaver's diversity, Simpson's dominance, Margalef's richness and Pielou's uniformity indexes were calculated for each soil group. Rhizobial populations were evaluated in Leonard jars in a greenhouse. Shoot (MSPA), root (MSR) and nodules (MSN) dry masses, nodule number (NN), shoot nitrogen accumulation (ANPA) and relative efficiency (ER) were determined and submitted to analysis of variance and means comparison by the Scott-Knott test at 5% probability. Most of the more efficient isolates were from the low fertility soil, in special isolate 49. The lower diversity from the high fertility soils may be due to a reduced dependence of the legumes on biological nitrogen fixation, while the higher dependency of lower fertility soils may have applied a selective pressure towards more efficient strains. BRS Guariba had higher ER, showing good symbiotic specificity with the strains.

**Keywords:** inoculants, selection, specificity, biodiversity

## **CAPÍTULO I**

---

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Importância das leguminosas

A família botânica Fabaceae é a terceira maior família de angiospermas (Carneiro et al. 2013) expondo representantes herbáceos, arbustivos e arbóreos (Nogueira et al. 2012). Possui distribuição cosmopolita, apresentando mais de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies (Barella & Karsburg 2007). As leguminosas são muito importantes como fonte de N na agricultura, como adubação verde, na reintegração de solos degradados e na pecuária, e fonte de proteína para alimentação humana (Fontenele et al. 2009). A grande competitividade dessa família é devido a sua capacidade de se associar simbioticamente às bactérias fixadoras de nitrogênio.

A família Fabaceae apresenta alta capacidade de adaptação aos mais diferentes biomas brasileiros, sua associação com bactérias fixadoras de nitrogênio permite que em solos pobres em nutrientes, espécies capazes de alcançar significativas contribuições da fixação biológica de nitrogênio (FBN) podem se estabelecer e completar seu ciclo com bons níveis de produtividade (Resende et al. 2003).

Uma dessas leguminosas que fixa o nitrogênio em maior quantidade é o feijão-caupi, extraíndo uma quantidade superior a 100 kg de N.ha<sup>-1</sup> (Nascimento et al. 2012).

### 1.2. Feijão-caupi

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é também conhecido como feijão macassar, feijão-de-corda e feijão-de-praia, originário da África, foi introduzido no Brasil por volta do século XVI por colonizadores portugueses e espanhóis (Freire Filho et al. 2011).

O caupi é uma leguminosa que apresenta elevado valor protéico, além de todos os aminoácidos essenciais, superando as propriedades nutritivas do feijão comum (Freire Filho et al. 2005). Em consequência disto, é cultivado principalmente para a produção de grãos secos ou verdes, visando a utilização humana *in natura*, forma de conserva ou desidratado. Pode também ser utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal, adubo verde e proteção do solo

(Freitas et al. 2013). Seu cultivo, geralmente, é de caráter de subsistência, sendo desempenhado por pequenos produtores rurais, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde constituem o segundo maior mercado de feijão-caupi fora da África (Freire Filho et al. 2011).

A área ocupada com feijão-caupi, no mundo, está em torno de 12,5 milhões de ha, com 64% da área na parte oeste e central da África. A outra parte da área está localizada na América do Sul, América Central e Ásia, com pequenas áreas distribuídas pelo sudoeste da Europa, sudoeste dos Estados Unidos e da Oceania. Os principais produtores mundiais são: Nigéria, Niger, Brasil, Mali e Tanzânia. Estima-se, através de dados dos anos 2005 a 2009, que esta cultura tenha sido responsável pela geração de 1.113.109 empregos por ano no Brasil, fornecendo suprimento alimentar para 28.205.327 pessoas, e gerando uma produção anual no valor de 684.825.333 reais (Freire Filho et al. 2011).

O feijão-caupi é uma das leguminosas graníferas mais adaptadas a diferentes condições ambientais, possuindo genes de resistência a estresses, conferindo-lhe grande adaptação edafoclimática e alta capacidade de fixar N em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, formando estruturas denominadas de nódulos, da qual podem dispensar fertilizantes nitrogenados (Gualter et al. 2011).

A cultura do feijão-caupi geralmente apresenta baixa produtividade. Dentre as principais causas que restringem a produtividade do feijão-caupi no Nordeste, merece grande destaque o emprego de cultivares tradicionais com baixa capacidade produtiva e ao cultivo sucessivo, ano após ano, onde ocorre uma degeneração genética, a cada cultivo e, portanto uma diminuição na capacidade produtiva desses materiais (Santos et al. 2013).

A recomendação de cultivares de feijão-caupi adaptadas às condições ofereceria maior segurança ao produtor, facilitando a obtenção de crédito e aceitação do produto no mercado (Santos et al. 2013). Para recomendação de cultivares é necessário avaliar o seu desempenho agrônomo nas condições edafoclimáticas das regiões para onde serão cultivadas (Santos et al. 2009) e produtividade, uma vez que as cultivares respondem de forma diferenciada a essas condições (Neves et al. 2011). Atualmente são recomendadas para cultivo na região Nordeste mais de dez cultivares de feijão-caupi. Entre elas, as cultivares BRS Guariba, BRS Marataoã e IPA-206.

A cultivar BRS Guariba é recomendada para cultivo de sequeiro nos estados do Piauí e Maranhão. Foi testada principalmente em áreas de transição caatinga-



ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação... 16 cerrado e cerrado, apresentando uma média de produtividades de 1.475 kg.ha<sup>-1</sup> no Piauí e de 1.508 kg.ha<sup>-1</sup> no Maranhão, revelando potencial genético para alta produtividade (Gonçalves et al. 2009).

A cultivar BRS Marataoã foi avaliada em uma rede de ensaios na região Nordeste, destacando-se nos estados do Piauí, Paraíba e Bahia. Os ensaios foram realizados em áreas de caatinga, transição caatinga-cerrado e cerrado, apresentando produtividades médias que variaram de 831 kg.ha<sup>-1</sup> a 1.807.kg.ha<sup>-1</sup> (Freire Filho et al. 2004)

A cultivar IPA-206 foi recomendada em 1989, destacando-se no estado de Pernambuco. Demonstrou boa produtividade em regime de sequeiro, irrigado e conjunto dos ambientes, apresentando respectivamente 680 kg.ha<sup>-1</sup>, 1.487,2 kg.ha<sup>-1</sup> e 1.047,1 kg.ha<sup>-1</sup> (Santos et al. 2007).

### **1.3. Cultivares de feijão-caupi**

A escolha correta da cultivar de feijão-caupi para um determinado ambiente e sistema de produção é de grande importância para a obtenção de uma boa produtividade. Entretanto, também é necessário que a cultivar tenha características que atendam às exigências de comerciantes e consumidores (Teixeira et al. 2010).

As cultivares de feijão-caupi apresentam características genéticas, fisiológicas e morfológicas intrínsecas e, portanto, respondem de forma diferenciada as condições edafoclimáticas locais. Diante disto, estudos foram desenvolvidos objetivando avaliar a eficiência simbiótica entre cultivares de feijão-caupi e rizóbio, visando o aumento do rendimento desta cultura (Santos et al. 2009).

Alguns parâmetros diretamente relacionados com a FBN avaliam esta eficiência simbiótica, sendo recomendados para programas de melhoramento, entre eles o peso de nódulos e o N total acumulado (Alcântara et al. 2009). Estudos realizados por Vieira et al. (2010) com diferentes cultivares de feijão-caupi vinculadas com estirpes pré-selecionadas demonstraram uma grande variabilidade de respostas quanto ao N total acumulado e ao peso de nódulos.

Resultados similares foram encontrados em outro experimento realizado em casa de vegetação com duas cultivares de feijão-caupi plantadas em solo arenoso. Foram verificadas diferenças quanto ao número de nódulos eficientes e à matéria seca acumulada na parte aérea (Freire Filho et al. 2005).

Linhares (2007), avaliando o comportamento de cultivares de caupi, constatou que as cultivares apresentaram respostas diferenciadas à fertilidade do solo, nos diferentes períodos de avaliação, para a massa seca, assim como para o peso seco de grãos, número de vagens por planta e número de grãos por vagem.

As diferenças observadas quanto à contribuição da FBN por diferentes associações de cultivares de feijão-caupi/rizóbio podem proporcionar a maximização dos ganhos com a fixação biológica de nitrogênio nessa cultura (Freire Filho et al. 2005).

#### **1.4. Fixação Biológica de Nitrogênio**

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo bioquímico e essencial, realizado por bactérias que possuem a enzima nitrogenase. Estes organismos são encontrados em vários ambientes e vivendo livremente, associados ou em simbiose com outros seres vivos. As bactérias fixadoras de nitrogênio, também denominadas de rizóbios, possuem um papel importante, convertendo o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), não utilizável pelas plantas, em amônia ( $NH_4^+$ ), forma utilizável por estas (Moreira & Sousa 2011).

A relevância desta atividade deve-se ao fato de que o nitrogênio (N) é o quarto elemento na matéria viva, e um elemento essencial na constituição de aminoácidos e proteínas, ácidos nucleicos, entre outros componentes vitais à célula. Em regiões tropicais, é um dos fatores que mais limitam a produção agrícola, pois os solos geralmente são deficientes neste nutriente (Moreira & Sousa 2011).

A FBN minimiza o custo da produção, ao reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, esse processo traz benefícios para o meio ambiente e propicia aumentos na fertilidade e na matéria orgânica do solo. A estimativa da contribuição da FBN em feijão-caupi está na ordem de US\$ 13 milhões somente para a região Nordeste. Práticas de baixo uso de insumos, como a aplicação biotecnológica de rizóbios, têm contribuído para aumentar a produtividade da cultura em até 50% em algumas áreas (Gualter et al. 2011).

No entanto, a simbiose entre feijão-caupi e rizóbio é relatada frequentemente como sendo de baixa especificidade, pois esta leguminosa é capaz de nodular com diversas espécies de bactérias do grupo rizóbio, especialmente dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (Melo et al. 2010).

A eficiência das bactérias fixadoras de nitrogênio, que estabelecem simbiose com leguminosas, e sua capacidade de sobreviver e formar nódulos no solo depende de fatores genéticos dos simbioss e da interação com fatores edafoclimáticos (Lima et al. 2005). A população destas bactérias no solo pode ser extremamente variada, tanto na composição como nas características simbióticas, possuindo uma grande diversidade taxonômica e fenotípica (Feitoza et al., 2015).

### **1.5. Importância da diversidade de estirpes rizobianas**

As diversas espécies do grupo rizóbio, tais como as dos gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Cupriavidus*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* mostram grande diversidade genética, tornando difícil a descrição completa de todas as espécies (Barros 2012).

As informações a cerca da diversidade da população bacteriana do solo e competitividade entre as espécies de rizóbio, bem como a eficiência da FBN no campo auxiliam na eficiência dos sistemas agrícolas (Nyfeler et al 2011). Contudo, para a utilização destas na agricultura se faz necessário uma prévia seleção de bactérias com melhores potenciais na FBN (Almeida et al. 2010).

A identificação e o agrupamento de bactérias em condições edafoclimáticas diversificadas contribuem para a identificação de mais gêneros nativos de rizóbios e aumenta a probabilidade de encontrar espécies altamente tolerantes a condições ambientais altamente desfavoráveis com maior capacidade de fixar nitrogênio no solo e que possam apresentar melhores respostas em simbiose com uma determinada espécie de leguminosa (Barros 2012).

### **1.6. Inoculação e seleção de estirpes**

A utilização de inoculantes rizobianos em leguminosas graníferas tem sido responsável por expressivas economias no custo da produção agrícola, por meio da diminuição do uso de adubos nitrogenados, proveniente dos benefícios do processo da FBN (Alcântara et al. 2006).

Determinadas estirpes de rizóbio e algumas espécies de leguminosas podem diferenciar de extremamente específicas a altamente promíscua. A ausência ou o baixo número de estirpes específicas do hospedeiro no solo ou a presença de populações rizobianas eficazes que podem competir pelos sítios de nodulação com estirpes eficientes, tornam necessária a inoculação com estirpes selecionadas quanto à eficiência, competitividade e adaptação às condições edafoclimáticas

locais. Quando a espécie nodulífera é promíscua, como o feijão-caupi, torna-se mais difícil a introdução, estabelecimento e desenvolvimento da simbiose com populações eficientes. Desta forma, este tem sido uma das principais barreiras à maximização da FBN nesta cultura (Araújo 2014).

Na cultura do feijão-caupi, a inoculação das sementes normalmente não é adotada e a fixação biológica do nitrogênio é decorrente da nodulação por estirpes nativas (Martins et al. 2003). Entretanto, o feijão-caupi também responde à inoculação por estirpes recomendadas, como exemplo, a BR 3267/SEMIA 6462 (RELARE 2004), que pertence ao gênero *Bradyrhizobium* (Silva Júnior et al. 2014).

A promiscuidade das estirpes torna difícil a introdução de estirpes selecionadas, restringindo a contribuição potencial da fixação biológica e nitrogênio no feijão-caupi, devido essas estirpes serem incapazes de competir com estirpes de rizóbio nativas ou com a microbiota do solo (Fernandes Júnior & Reis 2008).

A avaliação de populações nativas de rizóbio torna possível a seleção de estirpes eficientes já adaptadas às condições local, que atendam aos requisitos específicos desta leguminosa, e assim possa aumentar o seu potencial produtivo. A caracterização e identificação de estirpes de rizóbio eficientes no fornecimento do nitrogênio essencial ao desenvolvimento adequado da leguminosa resultarão em aumento de produtividade sem o recurso da aplicação de adubos nitrogenados nos sistemas agrícolas, demonstrando uma diminuição nos custos de produção (Rahmeier 2009).

Resultados de pesquisas já demonstraram que o feijão-caupi pode se beneficiar da FBN, com aumentos significativos. Isso tem sido comprovado em estudos de campo, por meio da inoculação com estirpes selecionadas e adubação com fósforo no Sul de Minas, onde os rendimentos variaram de cerca de 900 kg.ha<sup>-1</sup> a 1.300 kg.ha<sup>-1</sup> (Sousa & Moreira 2011).

Na literatura existem cepas de bactérias recomendadas para a cultura do feijão-caupi BR3267, UFLA 03-84 (BR 3302) e INPA 03-11b (BR 3301) (Almeida et al. 2010), regulamentadas e recomendadas pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA 2006).

### **1.7. FBN e Melhoramento Genético de Plantas**

O desenvolvimento da fixação biológica de nitrogênio por meio do melhoramento vegetal não é um conceito novo (Alcântara et al. 2009). Segundo Herridge and Rose (2000), na década de 40, na Europa foram iniciados estudos de

ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação... 20  
seleção e melhoramento de frevo (*Trifolium pratense*) para aumentar a nodulação e a fixação de nitrogênio. Estudos similares foram realizados nas décadas de 60 e 70 com fava (*Vicia faba*), soja (*Glycine max*), alfafa (*Medicago sativa*) e ervilha (*Pisum sativum*) (Alcântara 2011).

Herridge and Rose (2000) indicam também áreas de pesquisas consideradas na década de 70 como referências para configuração dos programas de melhoramento vegetal objetivando a FBN, com principal foco nas culturas de alfafa (*Medicago sativa*) e soja (*Glycine max* L.).

No Brasil, a importância da FBN no melhoramento genético de plantas, tem como maior exemplo a cultura da soja. Mesmo a FBN não sendo considerada como fator para a seleção no programa de melhoramento da soja, a maximização da FBN foi beneficiada pela condução da seleção e do melhoramento de experimentos em solos com baixo teor de N, nos quais as sementes foram inoculadas com estirpes e sem aplicação do fertilizante com N (Alves et al. 2003).

Em 1960, a Comissão Nacional da Soja, baseada nas pesquisas com inoculação, enfatizou a necessidade de dar prioridade à FBN como parte integrante do programa de melhoramento. A partir de então, fertilizantes nitrogenados foram substituídos pela inoculação com estirpes de bactérias diazotróficas simbióticas. Atualmente todas as cultivares melhoradas de soja possuem eficiência na FBN dispensando o uso de adubos nitrogenados (Alcântara et al. 2014).

Devido à variabilidade encontrada entre genótipos quanto à eficiência do processo de FBN, tem sido ressaltada a importância do melhoramento genético do feijão-caupi para maximizar o fornecimento de N via fixação biológica (Alcântara et al. 2009).

Os melhoristas já verificaram a necessidade de integrar no melhoramento, genótipos com potencial para fixação de altas quantidades de nitrogênio. Tomando-se como exemplo o caso de êxito da FBN na soja e seus resultados no agronegócio brasileiro, afirma-se que é muito importante e necessário que a perspectiva nas pesquisas atuais do melhoramento genético do feijão-caupi esteja agregado à FBN. Constata-se que 68 cultivares de feijão-caupi já foram lançadas e que não houve nenhuma influência de melhoramento enfatizando a FBN (Alcântara 2011).

Essas ocorrências fundamentam a necessidade de que os estudos com a FBN estejam reunidos ao melhoramento genético, como foi com o melhoramento da soja, onde houve seleção de rizóbios específicos para diversas condições edafoclimáticas, tornando o Brasil em um dos principais produtores mundiais, sem a

ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação... 21  
necessidade de utilização de qualquer fertilizante nitrogenado industrializado, cuja  
impactação são recorrentes no agronegócio e nos números vantajosos da balança  
comercial brasileira (Alcântara 2011).

## 1.8. Referências

Alcântara RMCM; Fortaleza JM; Xavier GR; Souza JS (2006) Inoculação de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) com rizóbio BR 3267 em Teresina, PI. **Embrapa anais conac**.

Alcântara RMCM; Rocha MM; Xavier GR; Rumjanek NG (2009) Estado atual da arte quanto ao melhoramento de genótipos para a otimização da FBN. (**Embrapa-Documentos n 196**).

Alcântara RMCM (2011) Fixação Biológica de Nitrogênio em Genótipos Ancestrais de Feijão-caupi. Seropédica RJ. **Tese** (Doutorado em Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Alcântara RMCM; Xavier GR; Rumjanek NG; Rocha MM; Carvalho JS (2014) Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica** v 45 n 1 p 1-9.

Almeida ALG; Alcântara RMCM; Nóbrega RSA; Leite LFC; Silva JAL; Nóbrega JCA (2010). Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** 5(3): 364-366.

Alves BJR; Boddey RM; Urquiaga S The success of BNF in soybean in Brazil. (2003) **Plant and Soil** v 252 p 1-9.

Barella APW; Karsburg IV (2007) Caracterização morfológica dos cromossomos mitóticos de *Parkia pendula* (WILLD.) BENTH ex WALP. **Revista de Ciências Agroambientais** v 5 n 1 p 85-93.

Barros VDC (2012) Diversidade rizobiana de caupi em solos de diferentes classes e origens. Pernambuco PE **Dissertação** ( Mestrado em Ciência do Solo) Universidade Federal de Rural de Pernambuco.

Carneiro SMG; Oliveira EB; Neves MJC; Santos AS; Nascimento MGP; Silva MFS; Costa MCA; Andrade IM (2013) Família Fabaceae no município de Buriti dos Lopes Piauí - Brasil. **Resumo Congresso Nacional de Botânica**.

Fernandes Júnior PI; Reis VM (2008) Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas (**Embrapa- Documentos n 252**).

Fontenele ACF; Aragão WM; Rangel JHA; Almeida SA (2009) Leguminosas tropicais: *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. Uma forrageira promissora: **Revista Brasileira Agrociência** v 15 p 121-123.

Freire Filho, FR; Lima JAA; Viana FMP; Ribeiro VQ (2005) Feijão caupi: avanços tecnológicos. Brasília. DF: **Embrapa Informação Tecnológica** p 519.

Freire Filho FR; Ribeiro VQ; Alcantara JP; Belarmino Filho J; Rocha MM (2004) BRS Marataoã: cultivar de feijão-caupi com grão sempre verde. Teresina: **Embrapa Meio-Norte 1 Folder**.

Freire Filho FR; Ribeiro VQ; Rocha MM; Damasceno-Silva KJ; Nogueira MSR; Rodrigues EV (2011) Feijão-caupi: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: **Embrapa Meio-Norte p 84**.

Freitas RMO; Torres SB; Nogueira NW; Leal CCP; Farias RM (2013) Produção e qualidade de sementes de feijão-caupi em qualidade de sementes de feijão-caupi em função de sistemas de plantio e estresse hídrico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v43 n4 p 370-376.

Gonçalves JRP; Fontes JRA; Dias MC; Rocha MM; Freire Filho FR (2009) BRS Guariba – Nova cultivar de feijão-caupi para o estado do Amazonas. **Embrapa- Comunicado Técnico 76**.

Gualter RMR; Rumjanek NG; Freitas ACR; Xavier GR (2011) Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v 46 n 3 p 303-308.

Herridge DF; Rose I (2000) Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. **Field Crops Research** v 65 p 229-248.

Lima AS; Pereira JPAR; Moreira FMD (2005) Phenotypic diversity and symbiotic efficiency of Bradyrhizobium spp. strains from Amazonian soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v 40 n 11 p 1095-1104.

Linhares LCF (2007) Comportamento de três cultivares de caupi, submetidas à omissão de nutrientes, cultivados em amostras de Gleissolo de Várzea do rio Pará. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal Rural da Amazônia Belém.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução normativa DAS** art. 2º. do decreto no. 5741 de 30 de março de 2006.

Martins, LM; Xavier GR; Rangel FW; Ribeiro JRA; Neves MCP; Morgado LB; Rumjanek NG (2003) Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil: **Biology and Fertility of Soils** v 38 n 6 p 333-339.

Melo SR; Silva Neto ML; Zilli JE (2010) Desempenho da fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para Roraima. (**Embrapa-Documentos n 45**).

Nascimento R; Nascimento DAM; Silva DA; Alves AG (2012) Alterações nos teores de clorofilas em plantas de feijão-caupi cultivadas sob diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Educação Agrícola Superior** v.27 n.2 p 94-96.

Nogueira NO; Oliveira OM; Martins CAS; Bernardes CO (2012) Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. **Enciclopédia biosfera** Centro Científico Conhecer 8: 2121-2131.



Nyfelner D (2011) Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. Agriculture, **Ecosystems and Environment** 155-163.

Rahmeier W (2009) Caracterização de isolados e eficiência de estirpes de rizóbio em feijão-caupi no Cerrado. Gurupi TO. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal de Tocantins p 77 p.

RELARE. **Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola.** Disponível em: <[HTTP://relare.org.br](http://relare.org.br)> Acesso em: novembro de 2014.

Resende AS; Xavier RP; Quesada DM; Urquiaga S; Alves BJR; Boddey RM (2003) Use of green manures in Increase inputs of biological nitrogen fixation to sugar cane. **Biology and Fertility of Soils** v 37 p 215-220.

Santos JF; Grangeiro JIT; Brito CH; Santos MCCA (2009) Produção e componentes produtivos de variedades de feijão-caupi na microrregião cariri paraibano. **Engenharia Ambiental** v 6 n 1 p 214-222.

Santos JF; Cardoso MJ; Bastos EA (2013) Desempenho produtivo de cultivares de feijão-caupi no agreste paraibano. In: III Congresso Nacional de feijão-caupi: **Anais Recife.**

Silva VN; Silva LESF; Figueiredo MVB; Carvalho FG; Silva MLRB; Silva AJN (2007) Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical** v 37 p16-21.

Silva Júnior EB; Silva K; Oliveira PI; Boddey RM; Zilli JE; Xavier GR (2014) Nodulação e produção de feijão-caupi em resposta à inoculação com diferentes densidades rizobianas. **Pesquisa agropecuária brasileira** v 49 n10 p 804-812.

Soares ALL; Pereira JPAR; Ferreira PAA; Vale HMM; Lima AS; Andrade MJB; Moreira FMS (2006) Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade

ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação... 25  
de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG) I – Caupi. **Revista Brasileira de  
Ciência do Solo** v 30 n 5 p 795-802.

Teixeira IT; Silva GC; Oliveira JPR; Silva AG; Pelá A (2010) Desempenho  
agronômico e qualidade de sementes de cultivares de feijão-caupi na região do  
cerrado. **Revista Ciência Agronômica** v 41 n 2 p 300-307.

Vieira CL; Freitas AD; Silva AF; Sampaio EV; Araújo MS (2010) Inoculação de  
variedades locais de feijão macassar com estirpes selecionadas de rizóbio. **Revista  
Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v 14 n 11 p 1170-1175.

## CAPÍTULO II

---

### **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI, PROVENIENTES DE SOLOS DO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO**

## **2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS PROVENIENTES DE SOLOS DO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI**

### **2.1. RESUMO**

O feijão-caupi é uma leguminosa que pode ter sua demanda de N suprida pela associação com bactérias fixadoras de nitrogênio. Devido à baixa especificidade na associação com estirpes de rizóbio, o feijão-caupi é muito utilizado em estudos que objetivam determinar a diversidade de rizóbios nativos tropicais. A avaliação da diversidade de rizóbios é de grande importância, já que é uma fonte de recursos genéticos para seleção de isolados adaptados às condições locais, o que ajuda a maximizar a Fixação Biológica de Nitrogênio. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e avaliar a diversidade fenotípica de isolados rizobianos de feijão-caupi, provenientes de solos do semiárido pernambucano. Amostras de solos foram coletadas na camada de 0-0,1m de profundidade em diferentes municípios pernambucanos (Brazil), sendo selecionadas amostras de dois grupos de solos, um com alta e outro de baixa fertilidade. Os experimentos para obtenção de nódulos foram conduzidos em vasos de Leonard em casa de vegetação, contendo como substrato areia e vermiculita, esterilizados por autoclavagem. Foram obtidos 184 isolados, sendo 53 isolados do grupo de alta fertilidade e 131 isolados do grupo de baixa fertilidade. Foi feita a caracterização morfofisiológica dos isolados para obtenção dos dendrogramas e calculados os índices de diversidade de Shannon-Weaver, dominância de Simpson, riqueza de Margalef e uniformidade de Pielou, para cada grupo de solo. Observou-se maior diversidade no grupo de solo de baixa fertilidade com 26 grupos de 131 isolados, enquanto no grupo de alta fertilidade com 26 grupos de 53 isolados. A maior diversidade no grupo de baixa fertilidade pode ser devido a pressão seletiva devido à maior dependência na fixação biológica de N nestas condições.

**Palavras-chave:** seleção de isolados, índices de diversidade, fertilidade.

## 2.2. ABSTRACT

### **COWPEA RHIZOBIAL PHENOTYPICAL CHARACTERIZATION AND DIVERSITY FROM PERNAMBUCO STATE SEMIARID SOILS**

Cowpea is a legume which may have its N demand supplied by association with nitrogen fixing bacteria. Due to its low specificity for this symbiosis, cowpea is frequently used for tropical native rhizobial diversity research. This evaluation is highly important, since it is a source of genetical resources for the selection of strains better adapted to local conditions, helping to maximize biological nitrogen fixation. So this work aims to isolate and evaluate phenotypical diversity of cowpea rhizobial isolates, from soils of the Pernambuco State semiarid. Soil samples were collected at the 0-0.1 m layer in different Pernambuco State municipalities, with samples selected from two groups of soils, one high-fertility and the other low-fertility. Experiments to obtain nodules were done in Leonard jars in greenhouse. 184 isolates were obtained, with 53 from the high-fertility and 131 from the low-fertility soil groups. Morphophysiological characterization was conducted and dendrograms, and Shannon-Weavers's diversity, Simpson's dominance, Margalef's richness and Pielou's uniformity indexes were determined for each soil group. Higher diversity was seen in the low fertility soil group, with 26 groups for 131 isolates, than in the high-fertility group, with 26 groups for 53 isolates. This higher diversity for the low fertility soil group may result from selective pressure due to a stronger dependence on biological nitrogen fixation under these conditons.

**Keywords:** isolate selection, diversity indexes, fertility

### 2.3. INTRODUÇÃO

A grande diversidade de rizóbios nativos capaz de nodular o feijão-caupi pode ser útil para a seleção de isolados eficientes e adaptados às condições edafoclimáticas locais (Chagas Junior et al., 2010). Os rizóbios podem ser identificados com base em características culturais e morfológicas (Feitoza et al. 2015).

Os principais parâmetros utilizados são: tempo de crescimento, reação básica ou ácida, diâmetro de colônia, produção de polissacarídeos extracelulares e coloração da colônia. Estes parâmetros fenotípicos de análise possuem a vantagem de serem rápidos e de baixo custo, permitindo uma análise prévia da diversidade (Chagas Junior et al. 2009).

O conceito de diversidade de espécies pode ser estimado por meio de dois componentes: (1) riqueza das espécies, baseada no número total de espécies presentes, e (2) uniformidade, baseada na abundância relativa de espécies e no grau de dominância (Santos et al. 2007).

Essa diversidade pode ser calculada por meio de índices matemáticos, que levam em consideração informações relacionadas à avaliação das características culturais do rizóbio. Alguns índices, como os de diversidade de Shannon-Weaver, uniformidade de Pielou, de dominância de Simpson e riqueza de Margalef, fornecem dados importantes acerca do padrão da distribuição de espécies microbianas dentro do ecossistema (Hammer et al. 2001).

Leite et al. (2009) em estudos com 581 isolados rizobianos e cinco cultivares de feijão-caupi em solos com diferentes sistemas de uso da terra do Vale do São Francisco, Pernambuco, observaram que apesar de 62% dos isolados apresentarem crescimento rápido, esses apresentaram menor diversidade que os isolados de crescimento lento, os quais formaram maior número de grupos com base nas características morfológicas.

A partir de análises com diferentes coberturas vegetais em sete solos da Zona da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco, Santos et al. (2007) constataram a ocorrência de uma elevada diversidade de rizóbios capazes de nodular as espécies estudadas e concluíram que a elevada diversidade encontrada na região Nordeste do Brasil pode contribuir para a seleção de estirpes de rizóbios mais adaptadas, competitivas e mais eficientes na FBN.

Este estudo teve como objetivo estimar a diversidade de grupos de rizóbios através de características morfológicas a partir do isolamento dos rizóbios de nódulos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), provenientes de solos do semiárido pernambucano.

## **2.4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.4.1. Origem do material**

Este trabalho foi executado a partir de material coletado em março de 2010, conforme descrito em Lira (2014). O solo foi coletado de onze municípios do semiárido pernambucano: Santa Cruz, Parnamirim, Serra Talhada, Sertânia, Petrolina, Floresta, Tupanatinga, Jataúba, Santa Cruz do Capibaribe, Bom Jardim e Caetés, com amostras obtidas em cada classe de solo do município com base no Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco – ZAPE (Silva et al. 2001).

As amostras de solos foram coletadas na camada de 0-0,1m de profundidade, sendo coletado de três a cinco pontos em cada área selecionada por município, totalizando-se 299 pontos de coletas. Foi realizado por Lira (2014) as análises químicas do solo após mistura e peneiramento das amostras. Uma subamostra de cada área foi conservada em refrigerador a aproximadamente 4°C até a inoculação das plantas para a obtenção de nódulos. As características de precipitação, temperatura, classe de solos e cobertura vegetal das áreas de amostragem estão na (Tabela 1), e os dados climáticos das áreas estudadas foram obtidos através da agência Pernambucana de Águas e Clima/ APAC.

Foi realizada uma análise de agrupamento com base nas características químicas e físicas do solo para a seleção de amostras representativas para a fase de isolamento, utilizando o SAS 9.2. Ao nível de 50% de similaridade foi obtido oito grupos de solos, dos quais dois apresentaram as maiores diferenças em relação às características químicas e físicas (Lira 2014). Um grupo de solo com alta fertilidade formada por amostras de solos dos municípios de Floresta, Santa Cruz do Capibaribe e Parnamirim. E outro grupo de solo com baixa fertilidade formada por amostras de solos dos municípios de Caetés, Petrolina, Sertânia, Santa Cruz e Tupanatinga (Tabela 2).

Tabela 1. Características climáticas, classes de solos e cobertura vegetal das áreas amostradas (Lira 2014)

Grupos de Solos	Classe de solos	Cobertura vegetal	Precipitação (mm)	Temperatura °C (Max)	(Min)
<b>Alta Fertilidade</b>			(mm)	(Max)	(Min)
Floresta Santa Cruz	T	Stylosanthes Solo	566	36,3	19,1
Floresta do Capibaribe	T	Solo	715	34	18,3
Floresta	PVA	Solo	566	36,3	19,1
Floresta	S	Solo	566	36,3	19,1
Parnamirim	RL	Macroptilium	488	34,8	17,6
Parnamirim	T	Macroptilium	488	34,8	17,6
X±Y			564,8± 88,67	35,41± 1,07	18,46± 0,7
<b>Baixa Fertilidade</b>			(mm)	(Max)	(Min)
Petrolina	S	Macroptilium	322	36,3	18,8
Sertânia	PVA	Stylosanthes	647	34,7	15,4
Tupanatinga	RR	Macroptilium	1116	32,3	11,7
Caetés	RQ	Stylosanthes	1116	32,3	11,7
Santa Cruz	LA	Stylosanthes	684	34,9	18,8
Tupanatinga	RQ	Stylosanthes	1116	32,3	11,7
X±Y			833,5± 35,7	33,8± 1,8	14,6± 3,7

Legenda: X±Y, onde X = médias e Y= Intervalo de confiança; T: Luvissole; PVA: Argissolo Vermelho-Amarelo; S: Planossolo; RL: Neossolo Litólico; RR: Neossolo Regolítico; RQ: Neossolo Quartzarênicos; LA: Latossolo Amarelo.

Tabela 2. Características químicas e físicas dos grupos de solos utilizados para obtenção de nódulos com médias e intervalos de confiança a 95% (Lira 2014)

GRUPOS DE SOLOS	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS											
	PH Água	K	Ca	Mg	Na	Ca+Mg	H+Al	SB	T	P	M.O	V
	Cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>								mg dm <sup>-3</sup>	g kg <sup>-1</sup>	%	
Alta Fertilidade	7,7±0,2	0,3±0,2	14,4±4,8	1,5±2,9	0,4±0,2	13,7±7,6	2,3±0,3	16,9±5,9	19,2±5,7	33,3±41,3	12,4±5,6	86,9±5,9
Baixa Fertilidade	5,04±0,6	0,15±0,12	1,9±1,3	0,8±0,7	0,08±0,1	2,4±1,7	3,2±0,9	2,9±1,8	6,2±1,4	7,6±5,3	8,2±3,9	45,3±22,3
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS												
	AREIA			SILTE			ARGILA			CLASSE TEXTURAL		
	%											
Alta Fertilidade	68,45±16,71			20,60±6,94			10,95±8,99			Franco arenoso		
Baixa Fertilidade	81,71±8,35			10,30±5,24			7,99±6,17			Areia franca		



Um experimento foi conduzido por Lira (2014) em fevereiro de 2013 para a obtenção de nódulos, com seis amostras para cada grupo de solo. Sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) variedade IPA 206, foram imersas em álcool 95% por 30 segundos e posteriormente em hipoclorito de sódio a 5% por 3 minutos, e lavadas com água destilada esterilizada por 10 vezes.

Quatro sementes foram colocadas para germinar em vasos de Leonard (Santos et al., 2009), contendo areia e vermiculita (proporção 2:1) autoclavada na parte superior e solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio (Hoagland & Arnon, 1950) na parte inferior. Cada semente foi inoculada com dois gramas de solo das amostras selecionadas anteriormente. Após 45 dias, as plantas foram colhidas, separadas em parte aérea, raízes e nódulos. Os nódulos foram separados e acondicionados em tubos com sílica gel para a secagem, conservação e posterior isolamento.

#### **2.4.2. Isolamento e caracterização**

O isolamento foi realizado no laboratório de Diversidade Microbiana da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizados todos os nódulos de cada planta, seguindo o procedimento padrão como sintetizado em Hungria (1994). Estes nódulos foram reidratados, e em seguida imersos em álcool 95% por dez segundos, para quebra da tensão capilar superficial e, posteriormente desinfetados por imersão em hipoclorito de sódio 5% por cinco minutos, seguido de oito lavagens em água destilada. Os nódulos foram amassados e esmagados com auxílio de pinça e alça de platina e riscados em placas de Petri com meio YMA, com azul de bromotimol (Vincent 1970).

Os isolados foram purificados em placas de Petri com meio YMA com azul de bromotimol, envolvidas com filme plástico PVC e incubadas a 28° C por sete dias. Após obter isolados únicos em cada placa, os mesmos foram caracterizados morfofisiologicamente de acordo com a tabela 3.

Tabela 3. Descrição das características morfofisiológicas utilizadas para a caracterização fenotípica dos isolados bacterianos, oriundos do semiárido pernambucano.

Características	Possíveis valores
Velocidade de aparecimento (dias)	>3, < 3
Diâmetro (mm)	>2, < 2
Cor	Incolor, branca, creme, amarela, rosa
Forma	Circular, irregular, puntiforme
Elevação	Plana, lente, convexa, drop-like, umbilicada, umbanada
Modificação do pH do meio de cultura	Ácido, neutro, alcalino
Transparência	Transparente, opaca
Superfície	Rugosa, lisa, papilosa
Produção de muco	Escasso, pouco, moderado, abundante
Consistência do muco	Seca, aquosa, gomosa, viscosa, butírica
Elasticidade do muco	Sem, com
Borda	Inteira, ondulada, filamentosa, lobada, denteada, nenhuma

Após a caracterização morfológica dos isolados foi realizada uma matriz binária com presença (1) e ausência (0) das características, sendo posteriormente realizados os agrupamentos com os isolados dos grupos de alta e baixa fertilidade, com agrupamento pelo método Paired Group usando o índice de distâncias de Jaccard, calculado através do software PAST (Hammer et al. 2001).

Foi escolhido o nível de 60% de similaridade para observar a formação de grandes grupos, como descrito por Melloni et al. (2006).

A diversidade para os grupos de isolados foi avaliada pelo índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) (Shannon; Weaver 1949), com a seguinte equação:

$$H' = - \sum \pi \log \pi$$

Onde:  $\pi = n_i/n$  ( $n_i$  = número de isolados de cada grupo;  $n$  = número total de isolados).

Quanto maior for o valor obtido, maior será a diversidade da população estudada (Calheiros 2012).

A relação entre as espécies detectadas foi avaliada pelo índice de uniformidade de Pielou ( $J'$ ) (Pielou 1959), que é um índice de uniformidade derivado

ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação... 34  
do índice de diversidade de Shannon-Weaver proporcional à diversidade e inversamente proporcional à dominância e com uma amplitude que vai de 0 a 1 para a mínima e máxima uniformidade, respectivamente, sendo calculado pela seguinte equação:

$$J' = H/\log S$$

Onde: S = número de grupos detectados; H = índice de Shannon Weaver.

Determinou-se a riqueza de espécies através do índice de Margalef (Margalef 1958), este índice é essencialmente uma medida do número total de espécies observadas na comunidade (Biassio & Crespo 2014). A riqueza de Margalef é calculada pela seguinte equação:

$$\alpha = s - 1/\log N$$

Onde: s = número de espécie amostrada; N = o número total de indivíduos em todas as espécies.

Verificou-se também a dominância de espécies através do índice de dominância de Simpson (Simpson, 1949), que reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Este índice varia de 0 a 1 e quanto maior for o valor obtido, maior será a probabilidade de serem da mesma espécie, ou seja, maior será a dominância das espécies que formam a diversidade (Biassio & Crespo 2014). A dominância de Simpson é calculada pela seguinte equação:

$$I_s = \sum \frac{ni(ni - 1)}{N(N - 1)}$$

Onde:  $n_i$  = número de indivíduos de cada espécie;  $N$  = o número total de indivíduos.

Os índices de diversidade de Shannon, uniformidade de Pielou, riqueza de Margalef e dominância de Simpson foram calculados pelo software PAST (Hammer et al. 2001).

## 2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 184 isolados, em que, 53 isolados foram provenientes do grupo de solo de alta fertilidade e os outros 131 foram oriundos do grupo de solo de baixa fertilidade.

Observam-se colônias com diâmetro maior que 2 mm em 73% dos isolados do grupo de solo de alta fertilidade (figura 1) e em 76% dos isolados do grupo de solo de baixa fertilidade (figura 2). A maioria das colônias apresentou translucidez para ambos os grupos de solo. Resultados semelhantes, a partir de 304 isolados de nódulos de caupi, foram encontrados por Medeiros et al. (2009) com a maioria das colônias apresentando-se translúcidas.

Em relação ao crescimento das colônias, tanto os isolados do grupo de solo de alta fertilidade quanto os do grupo de solo de baixa fertilidade apresentaram rápido crescimento, com 98% e 97% respectivamente (figura 1 e figura 2), fato comum em bactérias encontradas em regiões semiáridas (Silva et al. 2014). Esta característica constitui uma estratégia de sobrevivência, já que se multiplicam com mais rapidez em curto espaço de tempo úmido (Santos et al. 2007).

No que se refere à formação de ácidos e de álcalis, 26% dos isolados do grupo de alta fertilidade acidificaram o pH do meio de cultura e apenas 17% promoveram a alcalinização (figura 1). Com relação ao grupo de baixa fertilidade, 34% dos isolados acidificaram o meio de cultura (figura 2). Esse comportamento de acidificação do meio de cultura também foi verificado por Leite et al. (2009) em estudos com cinco cultivares de feijão caupi em diferentes solos da Bahia.

A maior parte dos isolados provenientes dos grupos de solos de alta e baixa fertilidade apresentaram crescimento rápido e acidificação do meio de cultura. Sendo que para o grupo de solo de baixa fertilidade, foi observado um maior número de isolados de crescimento lento, com reação de pH neutro e alcalino, comparando ao

número de isolados do grupo de alta fertilidade (figura 1 e 2). A presença de alguns isolados com crescimento lento e reação de pH neutro e alcalino no grupo de solos da baixa fertilidade, indica que estes isolados tiveram a capacidade de adaptação e sobrevivência a estas condições de solo e clima. Os rizóbios de crescimento lento que alcalinizam o meio são uma forma ancestral e estão associados a leguminosas tropicais que apresentam baixa eficiência simbiótica e habitam solos ácidos de baixa fertilidade, já os rizóbios de crescimento rápido, que acidificam o meio, são mais eficientes e apresentam maior especificidade hospedeira, colonizando solos neutros a alcalinos (Santos et al. 2007).

Quanto à produção e elasticidade do muco, 37% dos isolados do grupo de solo de alta fertilidade apresentaram muco abundante, enquanto de baixa fertilidade 58% produziram muco moderado, e não apresentaram elasticidade com 43% e 94% (figura 1 e figura 2). A produção abundante de muco representaria um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência do rizóbio em condições adversas de solo e clima, (Medeiros et al. 2009) como ocorreu com a maioria dos isolados do grupo de solo de baixa fertilidade.

Tem sido realizadas pesquisas com base em características fenotípicas visando à caracterização de diferentes populações de rizóbio nodulando feijão-caupi (Silva et al. 2005; Leite et al. 2009; Chagas Junior et al. 2010; Pinheiro et al. 2014). Muitas destas não são só estudadas com a finalidade de caracterização, mas de verificar a provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais predominantes no ecossistema para o qual visa-se a seleção do rizóbio-inoculante (Rahmeimer 2009).

No grupo de solo de alta fertilidade, observou-se a formação de 26 grupos a 60% de similaridade (Figura 3). O maiores foram os grupos 4, 7 e 21 com 4 isolados, e foi caracterizado por: crescimento rápido, diâmetro maior que 2 mm, cor amarelo, forma circular, translúcida, superfície lisa, abundante muco com elasticidade e pH do meio neutro.

Já no grupo de solo de baixa fertilidade, observou-se a formação de 26 grupos a 60% de similaridade (Figura 4). O maiores grupos foram o 2 e o 12, com 14 isolados e foi caracterizado por crescimento rápido, diâmetro maior que 2 mm, forma circular, elevação convexa, borda inteira, translúcida, superfície lisa, moderado muco sem elasticidade e pH do meio ácido.

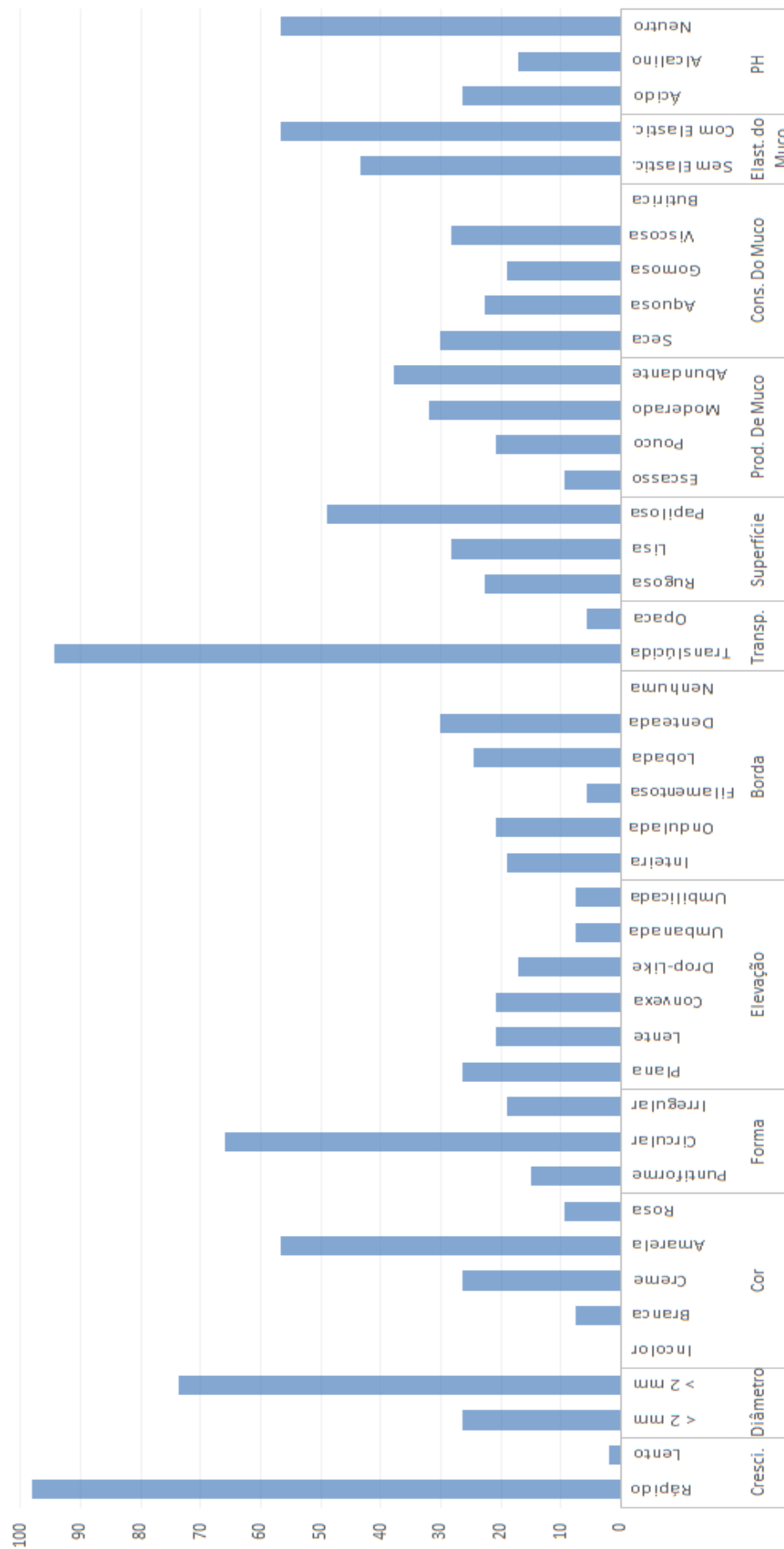


Figura 1. Caracterização morfológica de isolados obtidos de caupi IPA-206, provenientes do grupo de solo de alta fertilidade do semiárido pernambucano.

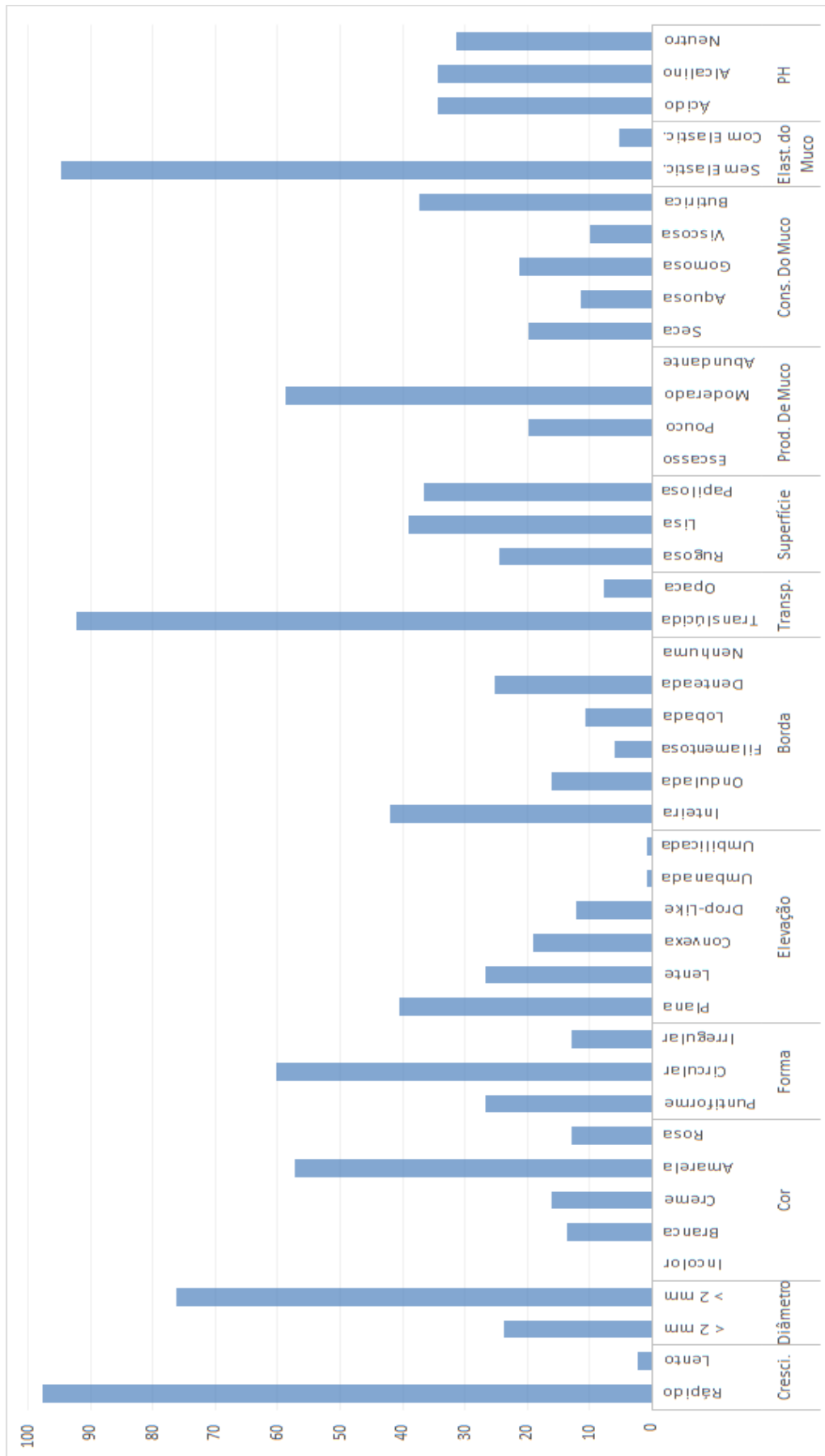


Figura 2. Caracterização morfológica de isolados obtidos de caupi IPA-206, provenientes do grupo de solo de baixa fertilidade do semiárido pernambucano.

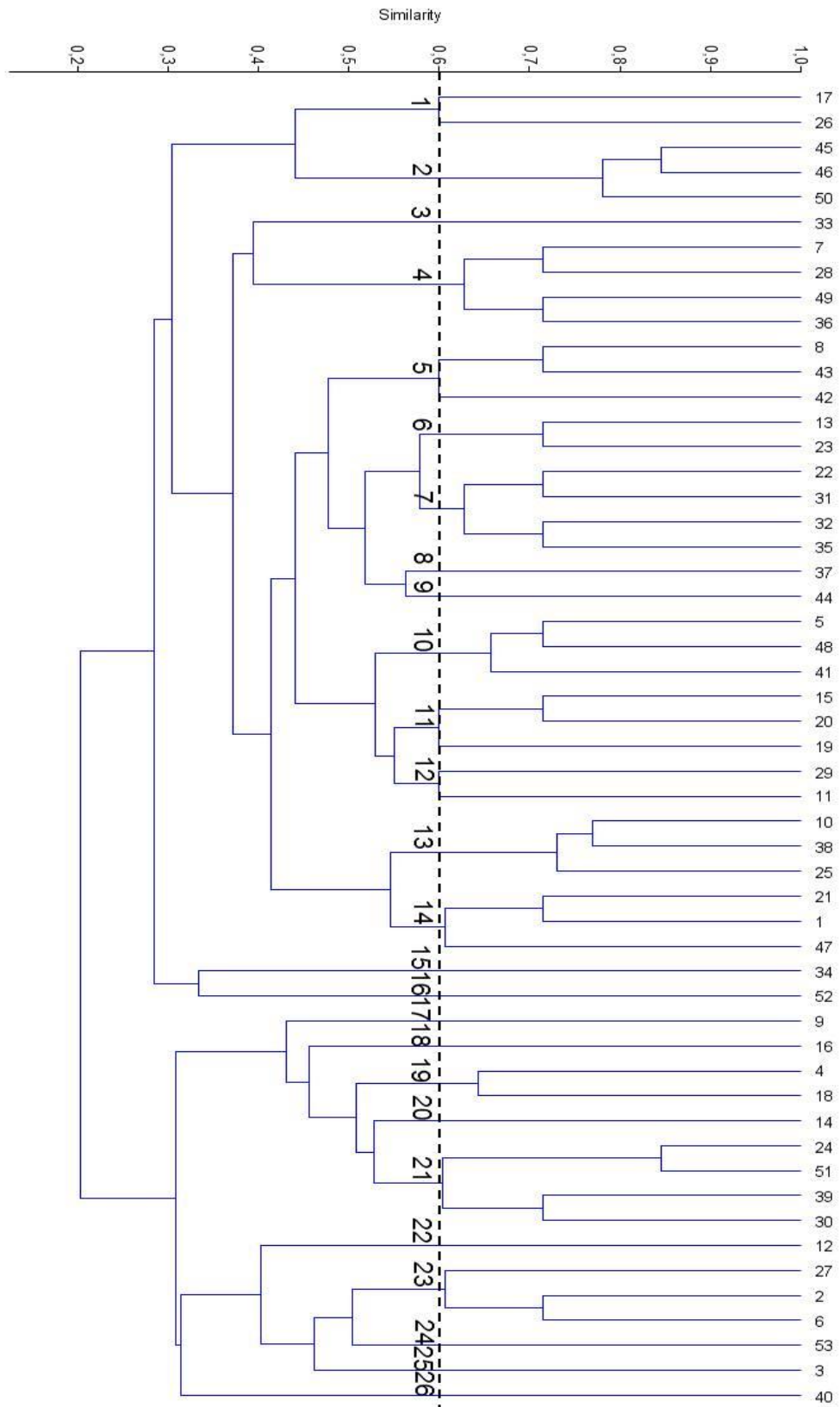


Figura 3. Dendrograma de similaridade baseada nas características morfológicas dos isolados de rizóbio provenientes do grupo de solo de alta fertilidade do semiárido pernambucano.



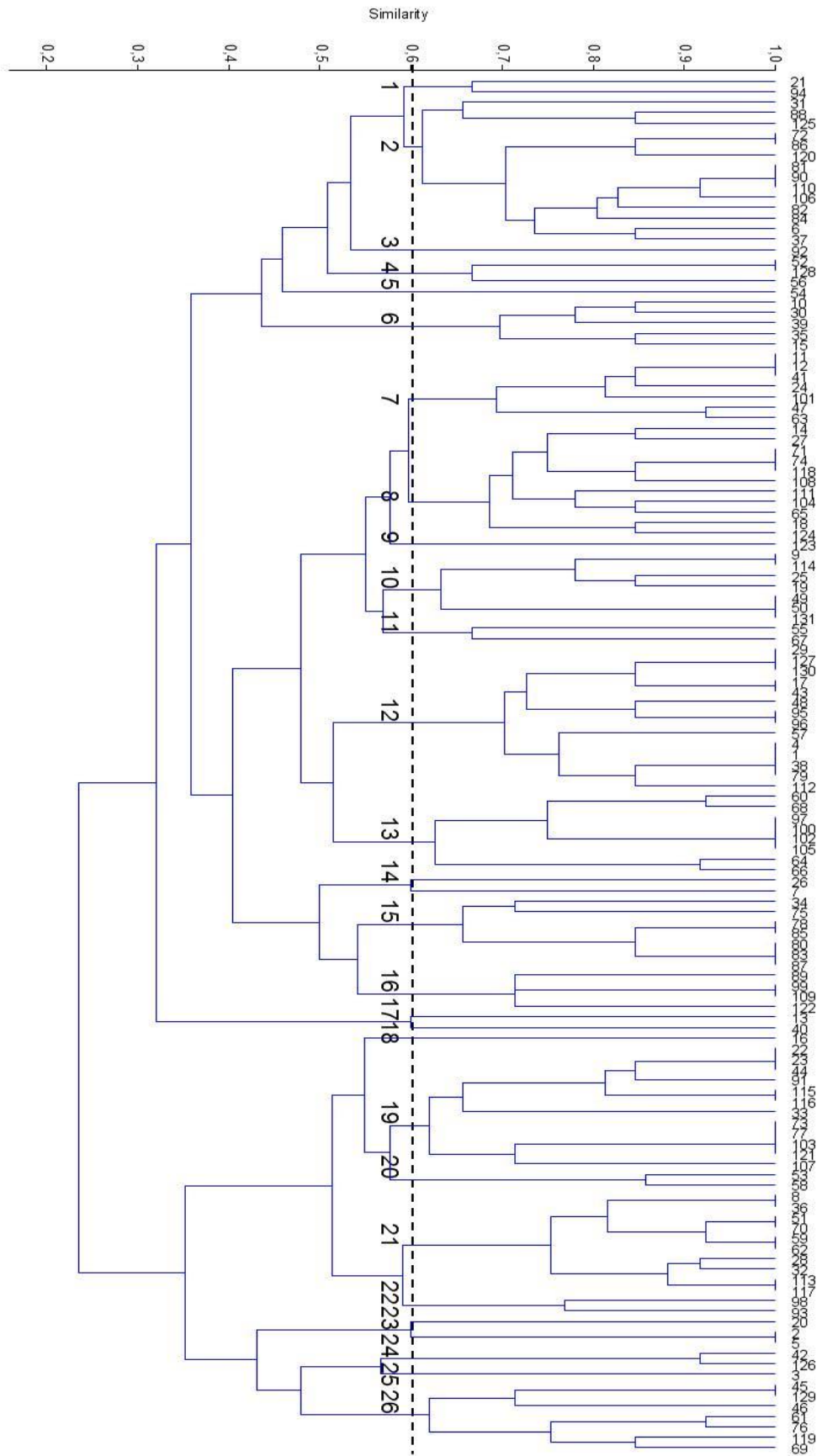


Figura 4. Dendrograma de similaridade baseada nas características morfológicas dos isolados de rizóbio provenientes do grupo de solos de baixa fertilidade do semiárido pernambucano.

O índice de diversidade de Shannon-Weaver (H) demonstrou alta diversidade no grupo de baixa fertilidade (H= 4,86) e menor no grupo de alta fertilidade (H= 3,95). Na riqueza de Margalef também houve maior diversidade no grupo de solo de baixa diversidade (1,28), comparado ao de alta diversidade (0,51). Para os índices de Pielou e Simpson não foi observado grandes diferenças entre os grupos de solos (Tabela 4).

Lira (2014) estudando a influência de fatores edafoclimáticos sobre a diversidade de isolados rizobianos proveniente de solos da região semiárida de Pernambuco, também observou maior diversidade nos isolados do grupo de baixa fertilidade (H= 4,03), sem grandes diferenças entre os grupos de solo para os índices de Pielou e Simpson. Para a riqueza de Margalef houve maior valor (13,27) para os isolados do grupo de solo de baixa fertilidade, diferindo-se do resultado deste estudo (1,28).

Leite et al. (2009), pesquisando sobre a diversidade rizobiana em solos coletados no Vale do São Francisco, estado de Pernambuco, verificaram Índices de diversidade de Shannon variando entre 2,47 e 3,88 e de riqueza de Margalef entre 3,44 e 5,03, valores inferiores comparados a este estudo. Pelos resultados obtidos neste estudo, é provável que as diferenças entre as propriedades químicas e físicas dos grupos de solos tenham exercido influência na diversidade rizobiana. Alguns estudos descrevem a influência de fatores edafoclimáticos sobre a diversidade de bactérias no solo, incluindo bactérias fixadoras de nitrogênio, por exemplo, Zhang et al. (2006) analisando a diversidade molecular de bactérias fixadores de nitrogênio em diferentes locais da China, verificaram maior diversidade para o local que apresentou maior concentração de carbono orgânico e nitrogênio, este resultado contrasta com o deste estudo em que o grupo de solo de alta fertilidade com maior conteúdo de matéria orgânica revelou menor diversidade. Isto pode ser justificado pela mineralização desta matéria orgânica resultando na liberação de nutrientes, entre estes, o nitrogênio que pode limitar a FBN, propiciando uma redução na simbiose entre rizóbios e plantas com uma diminuição da diversidade rizobiana (Lira 2014).

A região semiárida possui características próprias, estando em constante estresse, seja de temperatura ou de baixa precipitação pluviométrica. Essas condições podem afetar a eficiência e sobrevivência dos rizóbios desse ecossistema e também é possível que a alta diversidade encontrada no grupo de solo de baixa fertilidade seja uma indicação da capacidade do sistema de manter o grupo

funcional sob condições de estresse; portanto, a grande diversidade de rizóbios encontrada nesse grupo, obtida a partir do feijão-caupi, sugere estabilidade dos solos de baixa fertilidade quanto à fixação de N<sub>2</sub>, tolerando seus estresses; isto pode ser resultado de um processo de adaptação dos rizóbios juntamente com a grande diversidade do feijão-caupi (Santos et al. 2007).

Tabela 4. Índices de diversidades (Shannon - Weaver), equitabilidade (Pielou), riquezas de espécies (Margalef) e dominância (Simpson) dos isolados obtidos dos grupos de solos de alta e baixa fertilidade do semiárido pernambucano.

ÍNDICES DE DIVERSIDADE				
Grupos de solos	Shannon-Weaver	Pielou	Margalef	Simpson
Alta fertilidade	3,95	0,99	0,51	0,98
Baixa fertilidade	4,86	0,99	1,28	0,99

## 2.6. CONCLUSÃO

Foi obtida grande diversidade entre os isolados do grupo de solo de baixa fertilidade comparado ao grupo de alta fertilidade. A alta diversidade encontrada pode ajudar na seleção de estirpes adaptadas, competitivas e aptas a proporcionar uma FBN alta visando a obtenção de inoculantes para caupi.

## 2.7. REFERÊNCIAS

Bezerra RV (2009) Biodiversidade e efetividade de rizóbios nativos de solos do semiárido de Pernambuco em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). Pernambuco PE **Dissertação** ( Mestrado em Ciência do Solo) Universidade Federal de Rural de Pernambuco.

Calheiros AS (2012) Diversidade e eficiência de isolados rizobianos para calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) originados de um argissolo sob diferentes coberturas vegetais Pernambuco PE **Tese** ( Doutorado em Ciência do Solo) Universidade Federal de Rural de Pernambuco.

Chagas Junior AF; Oliveira LA; Oliveira AN; Willerding AL (2009) Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central. **Acta Amazonica** v 39 p 489-494.

Chagas Junior AF; Oliveira LA; Oliveira NA (2010) Caracterização fenotípica de rizóbios nativos de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum Agronomy** v 32 p 161-169.

Feitoza RM; Silva LL; Pinheiro MS; Martins SCS; Martins CM (2015) Diversidade fisiológica e bioquímica de estirpes de rizóbio no semiárido. **Enciclopédia Biosfera-Centro Científico Conhecer** v 11 n 21 p 794.

Freire Filho FR; Lima JAA; Ribeiro VQ (2005) Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília DF: **Embrapa Informação Tecnológica** p 519.

Hammer; Harper DAT; Ryan PD (2001) Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica [S.I.]** v 4 n 1 p XIX-XX.

Hoagland DR; Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. **Berkeley: California Agricultural Experiment Station** p 32.

Hungria M (1994) Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. IN: Hungria M; Araújo RS: **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**: Brasília Embrapa p 45-62.

Leite J; Seido SL; Passos SR; Xavier GR; Rumjanek NG; Martins LMV (2009) Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v 33 p 1215-1226.

Lira TP (2014) Diversidade e eficiência simbiótica de isolados rizobianos provenientes de solos com diferentes condições edafoclimáticas Pernambuco PE **Dissertação** ( Mestrado em Ciência do Solo) Universidade Federal de Rural de Pernambuco.

Margalef R (1958) Information theory in ecology. **Gen. Systems** 3: 36-71.

Medeiros EV; Martins CM; Lima JAM; Fernandes YTD; Oliveira VR; Borges WL (2009) Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy** 31(3):529-535.

Melloni R; Moreira FMS; Nóbrega RSA; Siqueira JO (2006) Eficiência e Diversidade Fenotípica de Bactérias Diazotróficas que Nodulam Caupi [*Vigna Unguiculata* (L.) Walp] e Feijoeiro (*Phaseolus Vulgaris* L.) em Solos de Mineração de Bauxita em Reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v 30 p 235-246.

Pielou EC (1959) The use of point to plant distances in the study of the pattern of plant populations. **Journal of Ecology [S.I.]** v 47 n 3 p 607-613.

Pinheiro MS; Sousa JB; Bertini CHCM; Martins SC; Martins CM (2014) Isolamento e seleção de estirpes de rizóbio nativas do semiárido tolerantes a estresses ambientais. **Enciclopédia Biosfera** v 10 n 18 p 2071-2082.

Rahmeier W (2009) Caracterização de isolados e eficiência de estirpes de rizóbio em feijão-caupi no Cerrado. Gurupi TO. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal de Tocantins p 77 p.

Santos CERS; Stamford NP; Neves MCP; Rumjanek NG; Borges WL; Bezerra RV; Freitas ADS (2007) Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** v 2 p 249-256.

Shannon CE; Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. **Urbana: University of Illinois Press.**

Silva FBR; Santos JCP; Silva AB; Cavalcanti AC; Silva FHBB; Burgos N; Parahyba RB V; Oliveira Neto MB; Souza Neto NC; Araújo Filho JC; Lopes OF; Luz LRQP; Leite AP; Souza LGMC; Silva CP; Varejão-Silva MA; Barros AHC (2001) **Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco. Recife: Embrapa Solos**

ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação... 45  
- Unidade de Execução de Pesquisa e Desenvolvimento/Governo do Estado de Pernambuco (Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária).

Silva A F; Nascimento LRS; Santos CERS; Freitas ADS; Lyra M CCP; Sampaio EVS B (2005) Isolamento e caracterização morfofisiológica de isolados de rizóbio em associação com caupi oriundos do Estado da Paraíba. In: XXX Congresso Brasileiro de Ciências do Solo **Anais Recife** CD ROOM.

Silva LS; Pinheiro MS; Sousa JB; Martins SCS; Martins CS (2014) Diversidade de rizóbio da unidade de rizóbio da unidade de conservação Parque Nacional de Ubajara no estado do Ceará. **Enciclopédia Biosfera – Centro Científico Conhecer** v 10 n 19 p 2141.

Simpson EH (1949) Measurement of diversity. **Nature** v 163 p 688.

Vincent JMA (1970) Manual for the practical study of root-nodule bacteria. **Oxford Blackwell** p 164.

Zhang Y; Li D; Wang H; Xiao Q; Liu X (2006) Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan Plateau. China **FEMS Microbiol** v 260 p 134-142.

### **CAPÍTULO III**

---

## **EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES RIZOBIANAS INOCULADAS EM CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI**

### 3. EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES RIZOBIANAS EM CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI

#### 3.1. RESUMO

A interação do feijão-caupi com bactérias fixadoras de N atmosférico pode elevar a produtividade e diminuir os custos de produção. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a existência de variação entre cultivares quanto à FBN e sua interação com diferentes estirpes rizobianas. Foram obtidos 184 isolados, sendo 53 isolados de um grupo de solos de alta fertilidade e 131 isolados de um grupo de solos de baixa fertilidade. A autenticação foi realizada em casa de vegetação com as plantas recebendo solução nutritiva de Hoagland sem N. Aos 45 dias após a inoculação, as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea, raízes e nódulos, que foram secos em estufa até massa constante e em seguida pesados. As 10 melhores e as 10 piores estirpes foram selecionadas com base na matéria seca da parte aérea e inoculadas nas cultivares BRS Guariba, BRS Marataoã e IPA-206, que também foram inoculadas com a estirpe BR-3267 receberam 90 Kg N. ha<sup>-1</sup>. A matéria seca da parte aérea das plantas e os teores de N foram quantificados. Praticamente todos os isolados mais eficientes foram oriundos do grupo de solo de baixa fertilidade, possivelmente as condições de baixa fertilidade dos solos podem ter exercido uma pressão seletiva, permanecendo apenas as estirpes mais eficientes quanto à fixação de nitrogênio nestes solos. Também foi demonstrado que a cultivar BRS Guariba obteve maior desempenho na eficiência relativa, demonstrando uma boa especificidade simbiótica com a estirpe 49.

**Palavras-chave:** interação cultivar estirpe, seleção de estirpes, fixação biológica de N



### 3.2. ABSTRACT

#### SYMBIOTIC EFFICIENCY OF RHIZOBIAL STRAINS IN COWPEA CULTIVARS

Cowpea interaction with nitrogen fixing bacteria may increase yield and reduce production costs. Due to this, this work aimed to evaluate the existence of variability between cultivars as to biological nitrogen fixation and their interaction with different rhizobial strains. 184 isolates were obtained, with 53 from a high-fertility soil group and 131 from a low-fertility soil group. Authentication was in a greenhouse, with plants receiving Hoagland nutritive solution without N. 45 days after inoculation the plants were harvested and shoot, roots and nodules dry masses were determined. The 10 best and 10 worst strains were selected based on shoot dry mass and inoculated in BRS Guariba, BRS Marataoã and IPA-206 cultivars which were also inoculated with BR-3267 strain, recommended for cowpea, or received the equivalent to 90 kg N.ha<sup>-1</sup>. Shoot dry mass and nitrogen content were determined. Almost all of the most efficient isolates were from the low-fertility soil group, likely due to selective pressure in these soils. Cultivar BRS Guariba had higher relative efficiency, and good symbiotic specificity with strain 49.

**Keywords:** cultivar strain interaction, strains selection, fixação biológica de N

### 3.3. INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo realizado por microorganismos, denominados diazotróficos, que captam o nitrogênio atmosférico e o converte em amônia, forma disponível para as plantas. Este processo é o principal meio de incorporação do nitrogênio atmosférico ao solo, sendo responsável por cerca de 65% do nitrogênio anualmente fixado na Terra. Quando comparada ao uso de adubos nitrogenados, a FBN apresenta vantagens como baixo custo e abundância do nitrogênio na atmosfera (Nascimento et al. 2010).

A observação de características relativas à especificidade é relevante na seleção de estirpes que visem obtenção de um inoculante com maior afinidade com a planta hospedeira e que seja capaz de colonizar as raízes mais eficientemente do que as estirpes nativas (Nascimento et al. 2010). No entanto, leguminosas tropicais, como o feijão-caupi, normalmente são capazes de nodular com uma ampla faixa de rizóbios, o que dificulta a introdução de inoculantes contendo rizóbios eficientes, uma vez que as bactérias nativas são mais adaptadas e competitivas. (Santos et al. 2007). Por esta razão, é importante estudar a contribuição de estirpes de rizóbios nativos do solo, bem como sua interação com seu hospedeiro (Zilli et al. 2006).

Tadini et al. (2008), pesquisando a interação entre estirpes de *Bradyrhizobium* (BR 3267 e BR 3299) e cultivares de feijão-caupi (Mauá, Canapu, Corujinha, Olho de Peixe, IPA-206, BR 17 Gurgueia, BRS Marataoã, BRS Milênio, BRS Mazagão) observaram que os cultivares de feijão-caupi respondem de maneira diferenciada à inoculação com a mesma estirpe. A seleção e o melhoramento de cultivares de feijão-caupi para otimizar a FBN pode propiciar aumentos de produtividade, principalmente quando realizada em conjunto com estirpes rizobianas previamente selecionadas quanto à eficiência e à competitividade (Alcântara 2011).

A característica mais visada em programas de melhoramento é o rendimento de grãos, devido ao seu valor econômico, mas existem indicações de que, em feijão-caupi, a distribuição de N nas vagens é dependente da estirpe de rizóbio formadora de nódulos, o que demonstra as limitações de programas que não levem em consideração os dois parceiros simbióticos (Alcântara et al. 2009).

Alguns parâmetros relacionados com a FBN têm sido recomendados para programas de melhoramento, entre eles o peso de nódulos e o N total acumulado pela parte aérea. Esses parâmetros revelam correlações significativas com a quantidade de N fixado e oferecem uma diminuição substancial no tempo, em custos e materiais dos programas de melhoramento vegetal (Alcântara 2011).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a existência de variação entre cultivares quanto à FBN e sua interação com diferentes estirpes rizobianas.

### **3.4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.4.1. Autenticação dos isolados**

Para a autenticação dos 184 isolados, provenientes da fase de caracterização morfológica, foi conduzido um experimento em casa de vegetação da UFRPE, adotando-se o delineamento em blocos casualizados com três repetições. Sementes de feijão-caupi IPA-206 foram imersas em álcool 95% por 30 segundos e posteriormente foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 5% por 2 minutos, sendo em seguida lavadas com água destilada esterilizada por 10 vezes. As sementes foram colocadas para germinar em vasos de Leonard, contendo areia e vermiculita (proporção 1:1) receberam diariamente solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio (Hoagland and Arnon 1950).

Dois dias após o transplântio foi realizada a inoculação das plantas com um ml de caldo bacteriano. Além dos tratamentos inoculados com os isolados selecionados, foram incluídos tratamentos sem N e sem inoculação e outro recebendo solução nutritiva de Hoagland completa (Hoagland and Arnon 1950), além de um tratamento com a estirpe inoculante de *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (SEMIA 6462) proveniente da EMBRAPA-CNPAB, isolada da região semiárida do Estado de Pernambuco e recomendada pela Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) para a produção de inoculante comercial para a cultura do feijão-caupi no Brasil (Silva et al. 2012).

Após 45 dias, as plantas foram separadas em parte aérea, raízes e nódulos. Os nódulos foram contados, e parte aérea e raízes secas em estufa de ventilação forçada de ar a 65 °C até massa constante.

Foram determinados o número e massa seca de nódulos (NN e MSN) após secagem em tubos com sílica-gel. As massas secas da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) foram determinadas após secagem em estufa de ventilação forçada de ar a 65 °C até massa constante. Adotou-se a análise descritiva da média e intervalo de confiança a 95% de significância utilizando-se o Statistix 9.

Após a determinação da média da parte aérea, foram selecionadas as 10 melhores e as 10 piores estirpes inoculadas no processo de autenticação para a utilização das mesmas no teste de eficiência simbiótica.

### **3.4.2. Teste de eficiência simbiótica**

Foi montado um experimento em areia:vermiculita esterilizada na proporção (1:1) em vasos de polietileno contendo 1,5 kg desse substrato recebendo solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio (Hoagland and Arnon 1950). Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, esquema fatorial 3x23, com 4 repetições. Os termos do fatorial referem-se as três cultivares de feijão-caupi (BRS Marataoã, BRS Guariba e IPA 206) e as vinte e uma estirpes.

Sementes dessas cultivares foram obtidas de forma similar à fase de autenticação e foram colocadas para germinar diretamente em sacos de polietilenos, contendo 0,8 kg da mistura areia e vermiculita (1:1) autoclavada e base em polipropileno recebendo solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio. Dois dias após a germinação foram inoculadas com um mL de meio YMA contendo os melhores e piores isolados de rizóbio referente a cada tratamento por planta, com um tratamento controle absoluto sem N e sem inoculação e um tratamento nitrogenado de 90 kg ha<sup>-1</sup> de N, sendo esta dose calculada com base na massa do substrato, e em dose equivalente a (96 mg vaso<sup>-1</sup> de N), além de um tratamento com a estirpe referência de Bradyrhizobium, BR 3267 (SEMIA 6462).

A coleta do experimento ocorreu aos 45 dias após a inoculação das plantas, sendo a matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN) determinados conforme descrito para a fase de autenticação dos isolados.

A MSPA das plantas das três cultivares de feijão-caupi após a secagem e pesagem, foram passadas em moinho tipo Willey, sendo posteriormente quantificado as concentrações de N total, pelo método proposto por Kjeldahl (Embrapa 2009). O acúmulo de N na parte aérea (ANPA) foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca da parte aérea pelo teor de N (Soares et al. 2006).

A eficiência relativa (ER) foi calculada pela divisão da matéria seca da parte aérea dos tratamentos inoculados pela massa da matéria seca da parte aérea do tratamento nitrogenado com 90 kg ha<sup>-1</sup> de N de acordo com a seguinte equação:

$$ER = \left( \frac{\text{Acúmulo de N da MSPA de cada tratamento}}{\text{Acúmulo de N da MSPA da dose de 90 kg ha}^{-1} \text{ de N}} \right) \times 100$$

Os dados de MSPA, MSSR, MSN, NN, ANPA e ER foram submetidos à análise de variância com as médias comparadas pelo teste de Sckott Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.3 (Ferreira 2008).

### 3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 184 isolados, apenas 26 não nodularam, ou seja, cerca de 86% dos isolados estabeleceram simbiose com feijão-caupi. Dos 53 isolados do grupo de alta fertilidade, 20 não nodularam e dos 131 isolados do grupo de baixa fertilidade apenas 6 não nodularam (Figura 1). A autenticação das estirpes rizobianas nativas foi de relevante importância para determinar se o isolado obtido é de fato uma cultura de rizóbio, uma vez que foi avaliada a capacidade da estirpe em induzir a formação de nódulos eficientes ou não na planta sob condições controladas (Mascena 2015).

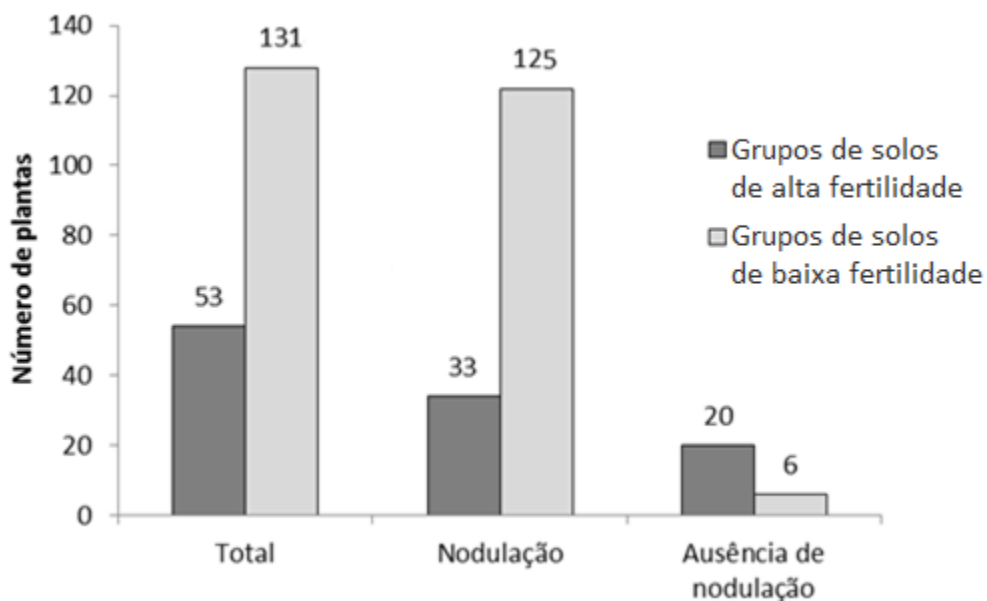


Figura 1. Nodulação a partir dos grupos de solos de alta e de baixa fertilidade, oriundos do semiárido de Pernambuco.

Destes 158 isolados que nodularam no processo de autenticação, foram selecionadas 10 das melhores e das piores estirpes, com base na média da matéria seca da parte aérea.

Em relação ao teste de eficiência simbiótica, os resultados apresentados na tabela 1 mostraram, com a cultivar Guariba, que para a variável matéria seca da parte aérea (MSPA), 7 isolados do grupo de solo de baixa fertilidade (21, 49, 63, 69, 107, 125, 127) e 3 isolados do grupo de alta fertilidade (19, 22, 26), se diferenciaram do controle não inoculado e sem nitrogênio, com maiores valores para o isolado 49 e estirpe referência 3267.

Tabela 1. Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA) de diferentes isolados das cultivares BRS Guariba, IPA-206 e BRS Maratão obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.

Inoculante	Variedades		
	BRS Guariba	IPA-206 MSPA (g)	BRS Maratão
1	1,0200b	0,9650b	3,2100a
15	1,7350b	1,8175a	2,2675a
19	2,1075a	1,1325b	2,8725a
20	1,5050b	2,2100a	3,2233a
21	1,8600a	1,3950b	1,5200b
22	2,1400a	0,5600b	3,4850a
26	2,3900a	0,8725b	2,0225b
32	1,5725b	1,6600a	2,3125a
40	0,6166b	1,3675b	1,8125b
49	3,0350a	2,0425a	2,8275a
50	1,4775b	1,5900a	1,6975b
54	1,6350b	0,7325b	2,0700b
57	1,6125b	1,9225a	1,3325b
59	0,9450b	2,2275a	3,2575a
63	2,6275a	1,1900b	2,0050b
69	1,9875a	1,4300b	1,3450b
107	2,2300a	2,1575a	3,0875a
118	1,5800b	2,3675a	2,1100b
125	2,3500a	0,2850b	2,2925a
127	1,9433a	0,9475b	2,7275a
BR3267	2,7575a	1,8800a	2,5975a
CN	1,8233a	2,2000a	1,5925b
CSN	0,3925b	0,6700b	0,3300b
CV(%)	44,41		

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente a 5% pelo teste de Skott Knott. CN= Tratamento com N (90 kg.ha<sup>-1</sup>); CSN= Controle sem N e sem inoculação.

Para a matéria seca da raiz (MSR) (Tabela 2) matéria seca dos nódulos (MSN) (Tabela 3) e número de nódulos (NN) (Tabela 4) todos os isolados, inclusive a estirpe referência, não se diferenciaram dos controles com nitrogênio e sem nitrogênio.

Tabela 2. Valores médios da matéria seca da raiz (MSR) de diferentes isolados da cultivar BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.

Inoculante	Variedades		
	BRS Guariba	IPA-206 MSR (g)	BRS Marataoã
1	0,1575a	0,1975b	0,3150a
15	0,2875a	0,2000a	0,3975a
19	0,2275a	0,2150b	0,3975a
20	0,2025a	0,3250a	0,3866a
21	0,2175a	0,1325b	0,1950b
22	0,2200a	0,1500b	0,3475a
26	0,3000a	0,1975b	0,1825b
32	0,2275a	0,3375a	0,2225b
40	0,0766a	0,2525a	0,2200b
49	0,2375a	0,2625a	0,3350a
50	0,1675a	0,2500a	0,2400b
54	0,2125a	0,1175b	0,2475b
57	0,1425a	0,2325b	0,1850b
59	0,1200a	0,3325a	0,4300a
63	0,2700a	0,1525b	0,2000b
69	0,3025a	0,2900a	0,1725b
107	0,2200a	0,3325a	0,3975a
118	0,1875a	0,3625a	0,2625b
125	0,2325a	0,0975b	0,3500a
127	0,3200a	0,1350b	0,3975a
BR3267	0,2700a	0,1975b	0,3275a
CN	0,2466a	0,3350a	0,2350b
CSN	0,1050a	0,1675b	0,0975b
CV(%)	48,83		

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente a 5% pelo teste de Skott Knott. CN= Tratamento com N (90 kg.ha<sup>-1</sup>); CSN= Controle sem N e sem inoculação.

O ANPA foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos inoculados com as estirpes 49, 63, 125, todas do grupo de baixa fertilidade. Pode ser verificado que estes isolados, proporcionaram acúmulo de N na parte aérea maior que o tratamento nitrogenado com a dose de 90 kg N há<sup>-1</sup>. O isolado 40 apresentou o pior desempenho para o ANPA, sem diferenças significativas com relação ao controle sem nitrogênio

(CSN), sendo este isolado pertencente do grupo de alta fertilidade e considerado como uma das piores estirpes (Tabela 5).

Tabela 3. Valores médios da matéria seca dos nódulos (MSN) de diferentes isolados da cultivar BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.

Inoculante	Variedades		
	BRS Guariba	IPA-206 MSN (g)	BRS Marataoã
1	0,1525a	0,1650a	0,3125a
15	0,1100a	0,1275a	0,2850a
19	0,2425a	0,0575a	0,4250a
20	0,1200a	0,3975a	0,1400b
21	0,1225a	0,1650a	0,0925b
22	0,2200a	0,1025a	0,3375a
26	0,0325a	0,2800a	0,1775b
32	0,1500a	0,1650a	0,2825b
40	0,0600a	0,0775a	0,2175b
49	0,1550a	0,1575a	0,2975a
50	0,1000a	0,1233a	0,1866b
54	0,2200a	0,0875a	0,1875b
57	0,2250a	0,1050a	0,1175b
59	0,1050a	0,2175a	0,1450b
63	0,1650a	0,1500a	0,3800a
69	0,1500a	0,1675a	0,1525b
107	0,1975a	0,2150a	0,5025a
118	0,0650a	0,2075a	0,2375b
125	0,1475a	0,0200a	0,2250b
127	0,2033a	0,0750a	0,3600a
BR3267	0,1400a	0,1475a	0,2100b
CN	0,0000a	0,0000a	0,0000b
CSN	0,0000a	0,0000a	0,0000b
CV(%)	84,07		

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente a 5% pelo teste de Skott Knott. CN= Tratamento com N (90 kg.ha<sup>-1</sup>); CSN= Controle sem N e sem inoculação.

Outros estudos indicam a presença e adaptação de isolados com bom desempenho em ANPA em condições de baixa fertilidade de solo, como, isolados nativos S-370 e S-372 de solo do cerrado com baixa fertilidade, proporcionaram maior teor de N por planta, respectivamente (108 e 97 mg de N planta<sup>-1</sup>) que a estirpe de *Bradyrhizobium Elkanii* SEMIA 566 (68 mg de N planta<sup>-1</sup>) em soja (Hungria et al. 1998).



Tabela 4. Valores médios dos números de nódulos (NN) de diferentes isolados da cultivar BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.

Inoculante	Variedades		
	BRS Guariba	IPA-206 NN (unid.)	BRS Marataoã
1	10,0000a	14,2500a	32,7500a
15	8,2500a	11,0000b	21,2500b
19	20,2500a	4,0000b	29,0000a
20	7,5000a	29,2500a	15,0000c
21	11,0000a	12,2500a	9,0000c
22	13,5000a	9,7500b	29,0000a
26	2,7500a	14,0000a	25,0000b
32	12,5000a	15,0000b	21,0000c
40	6,0000a	8,2500b	18,0000b
49	12,0000a	13,7500a	20,2500b
50	7,0000a	10,6666a	15,0000c
54	14,2500a	5,2500b	13,0000c
57	16,7500a	9,2500b	10,5000c
59	7,2500a	18,0000a	12,0000c
63	14,7500a	11,2500a	20,7500b
69	10,5000a	13,5000a	9,7500c
107	18,2500a	17,2500a	39,0000a
118	4,7500a	15,5000a	16,0000c
125	12,7500a	2,2500b	16,7500c
127	15,0000a	5,5000b	19,2500b
BR3267	12,7500a	15,2500a	18,2500b
CN	0,0000a	0,0000b	0,0000c
CSN	0,0000a	0,0000b	0,0000c
CV(%)	71,62		

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente a 5% pelo teste de Skott Knott. CN= Tratamento com N (90 kg.ha<sup>-1</sup>); CSN= Controle sem N e sem inoculação.

Em experimento de eficiência simbiótica em campo, em solo ácido de baixa fertilidade com feijão-caupi, a estirpe INPA 03-11b, apresentou melhor desempenho em ANPA (436,42 mg. planta<sup>-1</sup>), que outras estirpes avaliadas (Soares et al. 2006).

Para a ER (%) dos 20 isolados avaliados, 17 isolados apresentaram desempenhos similares ao tratamento com N (90 kg há<sup>-1</sup>). O pior desempenho foi apresentado pelo isolado 40, sendo inferior ao tratamento controle sem nitrogênio e sem inoculação (CSN) sem diferença significativa (p>0,05) (Tabela 6).

O isolado 49 apresentou maior valor para ER%, (800,0065%), sendo superado apenas pela estirpe referência 3267 (838,1026%). Em experimento de eficiência simbiótica com caupi em ensaio de campo em solo com limitações na fertilidade, as estirpes testadas BR 3302 e BR 3262, exibiram ER (%) superior a 100% e ao

tratamento nitrogenado de 50 kg há<sup>-1</sup> (Chagas Júnior et al. 2010). Já estirpes provenientes de solos ácidos e de baixa fertilidade da região Amazônica, obtiveram eficiência relativa entre 83 a 118%, equivalente ao controle nitrogenado e as estirpes recomendadas para caupi INPA 03-11B, UFLA 03-84 (Lima et al. 2005).

Tabela 5. Valores médios do acúmulo de nitrogênio da parte aérea (ANPA) de diferentes isolados da cultivar BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.

Inoculante	Variedades		
	BRS Guariba	IPA-206 ANPA (mg)	BRS Marataoã
1	232,0874b	162,3511a	446,0000a
15	301,0010b	129,8408a	347,7256a
19	367,5372b	102,1083a	420,8583a
20	327,2332b	754,8094a	410,2833a
21	251,1467b	467,2943a	261,4774a
22	291,3006b	18,0139a	563,1242a
26	387,5877b	296,5086a	222,1944a
32	317,3627b	203,9882a	356,6144a
40	106,0520b	177,3920a	242,3996a
49	881,0381a	233,5792a	447,8112a
50	426,9130b	233,8600a	182,6583a
54	359,8810b	81,0717a	253,6880a
57	283,4618b	222,6182a	86,0815a
59	140,6968b	219,0282a	358,3912a
63	602,5940a	137,2987a	269,3218a
69	349,8400b	193,1814a	164,7981a
107	241,5304b	375,2150a	430,7292a
118	277,0464b	228,9846a	303,1547a
125	552,5678a	48,2498a	360,2556a
127	368,4000b	239,7589a	471,3933a
BR3267	922,9929a	654,1328a	765,7721a
CN	110,1266b	224,4112a	269,1087a
CSN	113,8590b	32,9236a	2,7064a
CV(%)	105,08		

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente a 5% pelo teste de Skott Knott. CN= Tratamento com N (90 kg.ha<sup>-1</sup>); CSN= Controle sem N e sem inoculação.

Ao analisar a tabela 1, observa-se que a variável MSPA, para a cultivar IPA-206, apresentou maiores valores para os isolados 15, 20, 32, 49, 50, 57, 59, 107 e 118. Todos estes isolados, incluindo a estirpe referência e tratamento nitrogenado, apresentaram diferença significativa em relação ao controle sem nitrogênio e sem inoculação (CSN).

Tabela 6. Valores médios da eficiência relativa (ER) de diferentes isolados da cultivar BRS Guariba, IPA-206 e BRS Marataoã obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.

Inoculante	Variedades		
	BRS Guariba	IPA-206 ER %	BRS Marataoã
1	210,7416c	72,3453a	165,7326a
15	273,3171c	57,8584a	129,2138a
19	333,7337c	45,5005a	156,3897a
20	297,1366c	336,3509a	152,4566a
21	228,0480c	208,2312a	31,9876a
22	264,5089c	8,0272a	209,2553a
26	351,9402c	132,1273a	82,5668a
32	288,1739c	90,8992a	132,5168a
40	12,8400c	79,0400a	90,0749a
49	800,0065a	104,0853a	166,4053a
50	387,6486c	104,2133a	67,8753a
54	326,7817c	36,1264a	133,1771a
57	257,3910c	99,2010a	31,9876a
59	127,7565c	97,6012a	133,1771a
63	547,1717b	61,1817a	100,0792a
69	317,6642c	86,0836a	61,2385a
107	219,3161c	167,1997a	160,0577a
118	251,5656c	102,0379a	112,6514a
125	501,7466b	21,5006a	133,8699a
127	334,5166c	106,8391a	175,1683a
BR3267	838,1026a	291,4884a	284,5587a
CN	75,0000c	100,0000a	100,0000a
CSN	10,3387c	14,6711a	1,0057a
CV(%)	122,92		

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente a 5% pelo teste de Skott Knott. CN= Tratamento com N (90 kg.ha<sup>-1</sup>); CSN= Controle sem N e sem inoculação.

Para a matéria seca da raiz (MSR) destacaram-se com os maiores valores os mesmos isolados que apresentavam os melhores resultados de MSPA, com exceção dos isolados 40 e 69, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle sem nitrogênio e sem inoculação (Tabela 2).

Em relação a matéria seca dos nódulos (MSN), todos os isolados não se diferenciaram dos controles com nitrogênio e sem nitrogênio (Tabela 3).

Quanto ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER%), todos os isolados não se diferenciaram dos controles com nitrogênio e sem nitrogênio, com menores valores para os isolados 22, 54 e 19, pertencentes ao grupo de alta fertilidade, e o isolado 125, pertencente ao grupo de baixa fertilidade.

A falta de diferença entre o tratamento controle sem nitrogênio para as variáveis ANPA e ER na cultivar IPA-206 comprova a capacidade da população nativa em estabelecer a simbiose com feijão-caupi, leguminosa considerada promíscua (Almeida 2008).

Para a cultivar Marataoã, 7 isolados do grupo de solo de baixa fertilidade (15, 32, 49, 59, 107, 125 e 127) e 4 isolados do grupo de alta fertilidade (1, 19, 20 e 22) se diferenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) do controle com N e do controle não inoculado e sem nitrogênio, com maiores valores para os isolados 1, 20, 22, 59 e 107 (Tabela 1).

Para a matéria seca da raiz (MSR), destacaram-se com os maiores valores os mesmos isolados que apresentaram os melhores resultados de MSPA (Tabela 2).

Quanto à matéria seca dos nódulos (MSN), 5 isolados do grupo de solo de baixa fertilidade (15, 49, 63, 107 e 127) e 3 isolados do grupo de alta fertilidade (1, 19 e 22), se diferenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) do controle nitrogenado e do controle sem nitrogênio e sem inoculação. Para esta variável, os isolados 21, 57 e 50 possuem menores valores, sendo estes considerados como piores estirpes no estudo em questão (Tabela 3).

Houve grande variação nos valores para a variável número dos nódulos (NN), com 4 isolados diferenciando-se significativamente ( $p < 0,05$ ) dos controles com e sem nitrogênio, da qual possui como maiores valores os isolados 1, 19, 22 e 107, todos considerados como melhores estirpes (Tabela 4).

Diferenças significativas na MSN e no NN foram observados por Fernandes et al. (2003) em estudos de seleção de rizóbios nativos de feijão guandu, feijão-caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe, em casa de vegetação, por Vargas et al. (2007) com isolados de cinco municípios do Rio Grande do Sul em acácia-negra e por Antunes et al. (2011) em pesquisas com isolados de feijão-fava em casa de vegetação do IPA.

Quanto ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Tabela 5) e eficiência relativa (Tabela 6), todos os isolados não se diferenciaram dos controles com nitrogênio e sem nitrogênio, com menores valores para os isolados 57 e 21, pertencentes ao grupo de baixa fertilidade.

Comparando todas as variáveis em questão com as três cultivares, verifica-se que a cultivar Marataoã destaca-se das demais em relação ao MSPA, MSR, MSN e NN com valores (3,48 g, 0,43 g, 0,42 g e 39 unid.), respectivamente. Resultados

semelhantes foram observados por Gualter (2010) em estudos de efeito da inoculação com diferentes estirpes de rizóbio na FBN em três cultivares de feijão-caupi.

A massa de nódulos é um parâmetro intimamente relacionado com a FBN e tem sido indicado para programas de melhoramento vegetal que buscam o aumento da fixação de N<sub>2</sub>. As correlações entre esse parâmetro e a quantidade de N fixado promovem uma redução nos custos, tempo e materiais desses programas (Ankomah et al., 1996).

Não houve nodulação nos tratamentos não inoculados com ou sem N nas três cultivares, demonstrando não ter havido contaminação externa.

Quanto as variáveis ANPA e ER, a cultivar Guariba obteve maiores resultados em relação às demais cultivares, com valores de (881,03 mg e 800,00%), respectivamente. O ANPA tem sido considerado como indicador de estirpes com potencial para compor inoculantes com eficiência simbiótica (Alcântara et al. 2014). Portanto, considerando-se esta descrição, observa-se que a cultivar BRS Guariba apresentou potencial satisfatório para FBN.

Os resultados deste estudo confirmaram que houve variação de resposta entre as cultivares e que possivelmente isto ocorreu devido à especificidade do macrossimbionte em relação ao microssimbionte. Segundo Xavier et al. (2006), a FBN é influenciada por características genóticas da leguminosa e do rizóbio, haja vista que é um processo modulado por uma intensa troca de sinais moleculares, os quais se refletem nas distintas respostas em relação ao hospedeiro, à especificidade e à eficiência simbiótica.

### **3.6. CONCLUSÃO**

As condições de baixa fertilidade dos solos podem ter exercido uma pressão seletiva, permanecendo apenas as estirpes mais eficientes quanto à fixação de nitrogênio nestes solos.

A cultivar BRS Guariba apresentou maior desempenho na eficiência relativa, demonstrando uma boa interação simbiótica entre as estirpes.

A estirpe 49 proporcionou melhores resultados, semelhantes à estirpe de referência BR-3267, para a cultivar BRS Guariba, demonstrando um bom potencial para ser inoculante.

### 3.7. REFERÊNCIAS

Alcântara RMCM; Rocha MM; Xavier GR; Rumjanek NG (2009) Estado atual da arte quanto ao melhoramento de genótipos para a otimização da FBN. (**Embrapa-Documentos n 196**).

Alcântara RMCM (2011) Fixação Biológica de Nitrogênio em Genótipos Ancestrais de Feijão-caupi. Seropédica RJ. **Tese** (Doutorado em Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Alcântara RMCM; Xavier GR; Rumjanek NG; Rocha MM; Carvalho,JS (2014) Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras entre rizóbios de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica** v 45 n1 p 1-9.

Almeida ALG (2008) Diagnóstico da fertilidade dos solos cultivados com feijão-caupi e eficiência agronômica de estirpes de rizóbios para o estado do Piauí. **Dissertação** (Mestrado) UFPI.

Antunes JEL; Gomes ELF; Lopes ACA; Araújo ASF; Lyra MCCP; Figueiredo MVB (2011) Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**: v 35 p 751-757.

Ankomah AB; Zapata F; Hardarson G; Danso SKA (1996) Yield, nodulation, and N<sub>2</sub> fixation by cowpea cultivars at different phosphorus levels. **Biology and Fertility of Soils** v 22 p10-15.

Chagas Junior AF; Rahmeimer W; Fideles RR; Santos GR; Chagas LFB (2010) Eficiência agronômica de estirpes de rizóbios inoculadas em feijão-caupi no cerrado, Gurupi-TO. **Revista Ciência Agronômica** v 41 p 709-714.

Silva FC (2009) Análise química de tecido vegetal. In: Manual de Análises Químicas de Solo, Plantas e Fertilizantes. 2 ed. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica** p193-204.

Fernandes MF; Fernandes RPM; Hungria M (2003) Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v 38 p 835-842.

Ferreira DF (2008) SISVAR: Um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v. 6 p. 36-41.

Gualter RMR (2010) Efeito da inoculação com diferentes estirpes de rizóbio na nodulação, fixação biológica de nitrogênio e na produtividade em feijão-caupi. **Dissertação** (Mestrado em Ciências do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Hoagland DR and Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. **Berkeley: California Agricultural Experiment Station** p 32.

Hungria M; Boddey LH; Santos MA; Vargas MAT (1998) Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils** v 27 p 393-399.

Lima AS; Pereira JPAR; Moreira FMS (2005) Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v 40 p1095-1104, 2005.

Lira TP (2014) Diversidade e eficiência simbiótica de isolados rizobianos provenientes de solos com diferentes condições edafoclimáticas. Pernambuco PE **Dissertação** ( Mestrado em Ciência do Solo) Universidade Federal de Rural de Pernambuco.

Mascena AM (2015) Diagnóstico da ocorrência de micro-organismos simbiotes em áreas sob processo de desertificação no município de Irauçuba, Ceará. **Tese** ( Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) Universidade Federal do Ceará.

Nascimento LRS; Sousa CA; Santos CERS; Freitas ADS; Vieira IMMB; Sampaio EVSB (2010) Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** v 5 n1 p 36 - 42.

Rumjanek NG ; Martins LMV; Xavier GR; Neves MCP (2005) Fixação biológica de nitrogênio. In: Freire Filho FR; Lima JAA; Ribeiro VQ (Ed). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília DF: Embrapa p 281-335.

Santos CERS; Stamford NP; Freitas ADS; Neves MCP; Rumjanek NG; Souto SM (2005) Efetividade de rizóbios isolados de solos da região nordeste do Brasil, na fixação de N<sub>2</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea*). **Acta Scientiarum** v 27 n1 p 305-312.

Santos CERS; Stamford NP; Borges WL; Neves MCP; Rumjanek NG; Nascimento LRS; Freitas ADS; Vieira IMMB; Bezerra RV (2007) Faixa hospedeira de rizóbios isolados das espécies *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** v 2 n1 p 20-27.

Silva MF; Santos CERS; Sousa CA; Araújo RSL; Stamford NP; Figueiredo MVB (2012) Nodulação e eficiência da fixação do N<sub>2</sub> em feijão-caupi por efeito da taxa do inóculo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 36: 1418-1425.

Soares ALL; Pereira JPAR; Ferreira PAA; Vale HMM; Lima AS; Andrade MJB; Moreira FMS (2006) Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v 30 n 5 p 795-802.

Tadini TA; Guedes RE; Rumjanek NG; Xavier GR (2008) Interação entre estirpes de *Bradyrhizobium* e cultivares de feijão-caupi de feijão-caupi. In: Fertbio Londrina **Anais... Londrina SBCS**

Vargas LK; Lisboa BB; Scholles D; Silveira JRP; Jung GC; Granada CE; Neves AG; Braga MM; Negreiros T (2007) Diversidade genética e eficiência simbiótica de rizóbios noduladores de acácia negra de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v 31 p 647-654.



ARRUDA, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação... 64

Xavier GR; Martins LMV; Ribeiro JRA; Rumjanek NG (2006) Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Revista Caatinga** v 19 n1 p 25-33.

Zilli JE; Valicheski RR; Rumjanek NG; Simões-Araújo JL; Freire Filho FR; Neves MCP (2006) Eficiência simbiótica de estirpes de Bradyrhizobium isolados de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41(5):811-818.