

NODULAÇÃO E PRODUÇÃO DE GRÃOS EM FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp.) INOCULADO COM ISOLADOS DE RIZÓBIO¹

ENDERSON PETRÔNIO DE BRITO FERREIRA^{2*}, LINDETE MÍRIA VIEIRA MARTINS³, GUSTAVO RIBEIRO XAVIER⁴, NORMA GOUVÊA RUMJANEK⁴

RESUMO - Com o objetivo de avaliar a nodulação e a produção de grãos em feijão-caupi inoculado com isolados de rizóbio obtidos a partir de solos da região Nordeste Brasileira, foi conduzido um experimento em vasos Leonard, sob condição de casa-de-vegetação. Foi adotado o delineamento experimental de blocos ao acaso com cinco repetições e cinco épocas de coleta, realizadas aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE). Nove isolados de rizóbio e a estirpe BR 2001 foram inoculados em feijão-caupi. Além destes, foi usado um tratamento nitrogenado (T-N, aplicando-se 150 mg de N planta⁻¹) e uma testemunha absoluta (T0). Foram avaliados o número de nódulos por planta (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca da planta (MSP), N acumulado pelas plantas (N_{ac}), massa seca de grãos (MSG) e massa seca da palha das vagens (MSV). Os resultados revelaram que o NN, MSN, MSP e teor de N_{ac}, aumentaram até os 45 DAE. Embora pequenas variações nestes parâmetros tenham sido observadas a partir dos 60 DAE, só foi encontrada diferença significativa para o teor de N_{ac} aos 75 DAE. Os parâmetros avaliados (NN, MSN, MAP e N_{ac}) apresentaram alta correlação com a MSG. Apesar de não ter sido observada diferença estatística em relação à estirpe BR 2001, cinco dos nove isolados de rizóbio proporcionaram produção de MSG entre 1,6 a 2,4 vezes mais do que a estirpe recomendada, indicando grande potencial de uso destes isolados como inoculante, contudo, são necessários experimentos de campo para confirmação destes resultados.

Palavras-chave: Rizóbio. Eficiência simbiótica. FNB.

NODULATION AND GRAIN YIELD BY COWPEA (*Vigna unguiculata* L. Walp.) INOCULATED WITH RHIZOBIA ISOLATES

ABSTRACT - Aiming to evaluate the nodulation and grain yield by cowpea inoculated with rhizobia isolates obtained of soil samples from Brazilian Northeast region, an experiment was carried out in Leonard jars under greenhouse conditions. The experiment was performed on a randomized block design with five replicates and five sampling times, performed at 15, 30, 45, 60 and 75 days after emergence (DAE). Nine rhizobia isolates and the recommended strain (BR 2001) were inoculated on cowpea. Besides, it were used two control treatment: mineral nitrogen (TN, applying 150 mg N plant⁻¹) and an absolute control (T0). Evaluating the number of nodules per plant (NN), nodule dry mass (NDM), plant dry matter (PDM), Accumulated N (N_{ac}), grain dry mass (GDM) and straw dry mass of pods (DMP). Results showed that the NN, NDM, PDM and N_{ac} content increased until 45 DAE. Although variations had been occurred after 60 DAE for these parameters, significant difference was only found for N_{ac} content at 75 DAE. Evaluated parameters (NN, NDM, PDM and N_{ac}) showed a high correlation with GDM. Although no statistical difference had been observed to the strain BR 2001, five of the nine Bradyrhizobia isolates provided GDM production from 1.6 to 2.4 times more than the recommended strain, indicating high potential of use of these isolates as inoculant. However, further experiments are needed, mostly under field conditions to confirm these results.

Keywords: *Bradyrhizobium*. Symbiotic efficiency. BNF.

*Autor para correspondência.

¹Recebido para publicação em 07/12/2010; aceito em 15/05/2011.

²Laboratório de Biologia do Solo, Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375-000, Santo Antônio de Goiás - GO; enderson@cnpaf.embrapa.br

³Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, UNEB, Caixa Postal 171, 48905-680, Juazeiro - BA; mirialind@yahoo.com.br

⁴Laboratório de Ecologia Microbiana, Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR 465, Km 7, 23890-000, Seropédica - RJ; gustavo@cnpab.embrapa.br; norma@cnpab.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), é uma cultura de extrema importância para o semiárido brasileiro, uma vez que é usado pela população local como um dos seus principais alimentos e fonte protéica (ROCHA et al., 2008; SILVA et al., 2009). Da área total plantada com feijão-caupi e feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) no Nordeste do Brasil, esta leguminosa ocupa 60% da área, além de 26,8% da área total plantada com feijões no Brasil. Em alguns estados, como: Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte, o feijão-caupi é plantado de 95% a 100% do total das áreas cultivadas com feijão (ROCHA et al., 2008).

Esta planta é nodulada por bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico (N₂) e transferi-lo para a planta na forma de amônia. Este processo é conhecido como Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) e constitui-se em uma das formas de incrementar a produtividade de leguminosas, reduzindo ou eliminando os custos com adubos nitrogenados solúveis (FRANCO et al., 2002).

Estudos indicam que a obtenção da produção máxima de grãos em leguminosas que se beneficiam da fixação biológica de nitrogênio depende do fornecimento adequado deste nutriente para a parte aérea das plantas durante os períodos vegetativo e reprodutivo (OKOGUN et al., 2005; DI CIOCCO et al. 2008; MUSINGUZI et al., 2010), assim como, da eficiência da remobilização do nitrogênio fixado para as vagens. Nessas plantas, a manutenção da fixação do nitrogênio e do transporte do nitrogênio fixado durante o período de formação das vagens pode aumentar a produção de grãos e o teor de nitrogênio nestes (CAMPO et al., 2009).

Apesar da grande capacidade de obter N a partir da FBN (RUMJANEK et al., 2005), a inoculação do feijão-caupi com estirpes eficientes não resulta necessariamente em aumento de rendimento. Uma das razões para o fracasso de inoculação é que existem diferenças na especificidade simbiótica entre cultivares de feijão-caupi e estirpes de *Bradyrhizobium* (XAVIER et al., 2006). Além disso, muitas vezes as estirpes inoculadas não conseguem competir por sítios de nodulação das raízes com a população nativa do solo.

Contudo, pesquisas sobre a ecologia de *Bradyrhizobium* em áreas de terra firme da região do Semi-árido Brasileiro indicou uma resposta positiva à inoculação de feijão-caupi. Nesta região, a cultura é semeada no início da estação chuvosa, quando a população de *Bradyrhizobium* nativo é muito baixa devido ao severo estresse imposto pela seca. Nestas condições, a baixa população nativa de *Bradyrhizobium* não causa grande concorrência às estirpes usadas como inoculante, resultando em aumento no rendimento da cultura (MARTINS et al., 2003).

Desta forma, a seleção e avaliação de estirpes

de rizóbio eficientes quanto à FBN ainda constituem-se etapas importantes na busca pelo aumento de produção de grãos da cultura do feijão-caupi sem exigir uma maior quantidade de insumos. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a nodulação e a produção de grãos pelo feijão-caupi inoculado com isolados de rizóbio obtidos a partir de solos da região Nordeste Brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados estudados foram obtidos por Martins et al., (1997), que a partir do cultivo de feijão-caupi em diferentes tipos de solo da região Nordeste, obteve 536 isolados de nódulos, posteriormente agrupados em 78 diferentes grupos, usando como referência a morfologia da colônia e seu crescimento. Para este trabalho foram escolhidos 9 isolados com base nas distintas características morfológicas (MARTINS et al., 1997) e diferentes capacidades de resistência a antibióticos (XAVIER et al., 2003), de forma que cada isolado apresentasse uma característica que o diferenciasse dos demais (Tabela 1).

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, em vasos Leonard contendo areia e vermiculita na proporção 2:1 (v/v), em delineamento de blocos ao acaso com cinco repetições e cinco épocas de coletas, realizadas aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE), cobrindo toda a fase fenológica de desenvolvimento das plantas. Foram usados como inoculantes os isolados descritos na Tabela 1 e a estirpe BR 2001, recomendada até recentemente pela rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola (RELARE), para a inoculação na cultura do feijão-caupi. Além destes, foi usado um tratamento nitrogenado (T-N, aplicando-se 150 mg de N planta⁻¹) e uma testemunha absoluta (T0), perfazendo um total de 12 tratamentos e 300 vasos.

Por ocasião do plantio as sementes de feijão-caupi foram previamente lavadas com etanol (100%; 30 segundos) e peróxido de hidrogênio (2,5%; 3 minutos) para uma desinfestação superficial, seguindo de 10 lavagens sucessivas com água autoclavada. Em seguida foram colocadas quatro sementes em cada vaso e aos três DAE foi realizado o desbaste deixando-se uma planta por vaso. A inoculação foi feita aos três DAE, colocando-se um mL por planta de cada isolado usado como inoculante (cerca de 10⁸ ufc mL⁻¹). Solução nutritiva de Norris (NORRIS; T'MANNETJE, 1964), isenta de nitrogênio foi fornecida uma vez por semana e o volume dos vasos completado com água autoclavada conforme necessário.

A avaliação da nodulação foi realizada pela determinação do número de nódulos por planta (NN) e massa seca de nódulos (MSN), sendo avaliadas aos 15, 30, 45, 60 e 75 DAE, com exceção do NN, o

qual não foi determinado na última coleta devido ao avançado estado de senescência que estes se encontravam, impossibilitando a contagem. Em cada época de coleta, as plantas foram cuidadosamente retiradas dos vasos e a parte aérea e raízes foram separadas na altura do nó cotiledonar. Os nódulos foram destacados das raízes, contados e colocados para secar em estufa com ventilação (65 °C; 72 h) e posteriormente pesados para determinação da MSN.

A massa seca das plantas (MSP) e o N acumulado (N_{ac}) pelas plantas também foram avaliadas nas cinco épocas de coleta. Após a retirada dos nódulos, as raízes e a parte aérea das plantas foram colocadas para secar em estufa com ventilação (65 °C; 72 h) e posteriormente pesados. Em seguida, estas foram moídas em moinho tipo Willey equipado com peneira de 40 mesh e, então, determinado o teor de N_{ac} pelo método de Kjeldhal descrito por Tedesco et al. (1995).

Por ocasião do final do ciclo das plantas, aos 75 DAE, foram realizadas as avaliações da massa seca de grãos (MSG) e massa seca da palha das vagens (MSV). As vagens foram coletadas das plantas, retirados os grãos das vagens e, grãos e palhas das vagens, foram colocados separadamente em sacos de papel para secar em estufa com ventilação (65 °C; 72 h). Posteriormente os grãos e as vagens foram pesados para a determinação da massa seca.

Os dados foram submetidos a uma análise de

variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância usando o programa computacional SIVAR (FERREIRA, 2003). Também foi realizada uma análise de correlação de Pearson usando o programa computacional R para verificar a interdependência entre os parâmetros estudados (WESSA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média do número de nódulos por planta nas diferentes épocas de coleta revelou um crescente aumento da primeira para a última coleta. Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre as coletas realizadas aos 15 e 30 DAE, bem como entre as coletas realizadas aos 45 e 60 DAE, as plantas coletadas aos 45 e 60 DAE apresentaram maior número médio de nódulos do que aquelas coletadas aos 15 e 30 DAE (Tabela 2). Costa et al. (2006) relataram um aumento do número de nódulos em plantas de feijão-caupi dos sete DAE até a fase em que as plantas entraram em processo de formação de vagens, quando os nódulos mais velhos começaram a entrar em senescência e em seguida decomposição, resultando na diminuição do número de nódulos a partir dos 56 dias.

Tabela 1. Local de isolamento, características morfológicas em meio de cultura yeast manitol agar (YMA) e resistência a antibióticos dos isolados inoculados em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.).

Isolado	Local de isolamento	Velocidade de crescimento	pH do meio de cultura	Expressão da hidrogenase*	Resistência a antibióticos
BR 10100	Sertão	Lento	Neutro	Hup ^{hr}	Muito baixa
BR 3272	Sertão	Lento	Alcalino	Hup ^{hr}	Muito baixa
BR 3274	Sertão	Lento	Alcalino	Hup ^{hr}	Média
BR 3270	Sertão	Lento	Alcalino	Hup ^{hr}	Alta
BR 3289	Sertão	Lento	Alcalino	Hup ^{hr}	Muito alta
40A5	Sertão	Lento	Alcalino	Hup ⁻	Média
BR 3392	Sertão	Rápido	Ácido	Hup ^{hr}	Baixa
9A1	Sertão	Rápido	Ácido	Hup ⁺	Baixa
BR 10094	Mata	Lento	Alcalino	Hup ⁻	Muito baixa

*Atividade da hidrogenase positiva: Hup⁺, atividade da hidrogenase negativa: Hup⁻, atividade da hidrogenase dependente do hospedeiro: Hup^{hr}.

Aos 15 DAE, o isolado BR 10100 induziu uma maior formação de nódulos nas plantas de feijão-caupi que o isolado BR 3392 e maior indução de formação de nódulos que os isolados 9A1 e BR 3392 nas coletas realizadas aos 30, 45 e 60 DAE. Já a inoculação das plantas de feijão-caupi com o isolado BR 3270 resultou em maior número de nódulos nas plantas, aos 60 DAE, do que quando estas foram

inoculadas com os isolados 9A1 e BR 3392. Além disso, os isolados BR 10100 e BR 3270 apresentaram número de nódulos igual à estirpe BR 2001, estirpe recomendada como inoculante comercial para a cultura do feijão-caupi (Tabela 2).

Os resultados de massa seca de nódulos foram similares àqueles observados para o número de nódulos, ou seja, foi observado um aumento na mas-

sa seca de nódulos em função do desenvolvimento das plantas, sendo que os maiores valores de massa seca de nódulos foram observados aos 45, 60 e 75 DAE (Tabela 3). Xavier et al. (2007a) relataram um aumento significativo no número de nódulos até os 50 DAE, sofrendo uma redução no número a partir dos 60 DAE, enquanto que a massa seca dos nódulos e massa específica de nódulos aumentaram significa-

tivamente até os 70 DAE. Já em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), avaliado em dois tipos de solo, o aumento do número de nódulos, massa seca de nódulos e massa específica ocorrem até os 60 DAE, seguida de uma redução significativa para estes parâmetros aos 75 DAE (SANTOS et al., 2009).

Tabela 2. Número de nódulos (NN) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculadas com diferentes isolados de *Bradyrhizobium*, em diferentes épocas de coleta.

Tratamentos	NN (nódulos planta ⁻¹)			
	15 DAE	30 DAE	45 DAE	60 DAE
BR 10100	61,6 a	84,4 a	297,4 a	265,4 abc
BR 3270	44,4 ab	126,2 a	228,0 ab	325,6 a
BR 3289	41,0 ab	64,8 a	179,4 ab	253,0 abc
BR 10094	37,8 abc	48,2 a	179,6 ab	74,0 bcd
BR 2001	34,6 abc	58,0 a	307,80 a	327,6 a
40A5	31,4 ab	78,4 a	401,2 a	230,2 abcd
BR 3272	27,4 abc	111,6 a	295,8 a	318,8 a
BR 3274	21,2 abc	30,8 a	206,8 ab	313,8 ab
9A1	12,0 abc	0,0 b	0,0 c	0,0 d
BR 3392	9,6 bc	0,0 b	0,0 c	33,2 cd
TN	0,0 c	0,0 b	0,0 c	0,0 d
T0	0,0 c	0,0 b	0,0 c	0,0 d
Média	26,65 B	50,20 B	175,13 A	178,47 A
CV (%)	44,53	31,93	32,82	24,72

Valores seguidos de letras minúsculas na mesma coluna e, maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

De forma geral, os isolados BR 3270, BR 3289, 40A5, BR 3272, BR 3274 e a estirpe BR 2001 apresentaram, em pelo menos uma das coletas, maiores valores de massa seca de nódulos que os isolados 9A1 e BR 3392. Além disso, o isolado BR 3270 apresentou elevada MSN até os 75 DAE (Tabela 3), o que é uma característica interessante em bactérias que possam vir a ser usadas como inoculante, uma vez que a manutenção da nodulação durante a fase reprodutiva pode resultar em aumento de produtividade.

Os isolados 9A1 e BR 3392 são de crescimento rápido, acidificam o meio de cultura, apresentam baixa resistência a antibióticos e foram isoladas de solos do Sertão nordestino (Tabela 1). Segundo Xavier et al. (2007b), estirpes isoladas de solos do Sertão nordestino apresentam características morfológicas semelhantes a estas descritas para os isolados 9A1 e BR 3392, além de maior tolerância a temperaturas elevadas e a altas concentrações salinas, o que poderia conferir a estes isolados uma maior vanta-

gem competitiva em relação à população nativa de rizóbios em solos com tais característica.

Apesar disso, no presente estudo os isolados com estas característica (9A1 e BR 3392) apresentaram menor número e massa seca de nódulos, indicando menor eficiência simbiótica. Em um estudo com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* inoculadas em feijão-caupi, a média dos valores da análise de redução de acetileno (ARA) apresentou correlação significativa com a média da massa seca de nódulos, sendo que os maiores valores de ARA foram encontrados nos tratamentos com maiores valores de massa seca de nódulos (ZILLI et al., 2006). Isto sugere que plantas com maior número e massa de nódulos fixam mais N (XAVIER et al., 2007a), embora, de acordo com Hansen et al. (1983), essa correlação não seja linear e, portanto, é necessário não só muitos nódulos, mas nódulos grandes e com maior eficiência relativa.

A massa seca das plantas também aumentou em função dos diferentes estádios fenológicos, com

Tabela 3. Massa seca de nódulos (MSN) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculadas com diferentes isolados de *Bradyrhizobium*, em diferentes épocas de coleta.

Tratamentos	MSN (g planta ⁻¹)				
	15 DAE	30 DAE	45 DAE	60 DAE	75 DAE
BR 10100	0,015 a	0,094 abc	0,376 ab	0,325 abc	0,320 abc
BR 3270	0,023 a	0,117 abc	0,363 ab	0,489 a	0,599 a
BR 3289	0,011 a	0,152 a	0,339 ab	0,338 ab	0,392 ab
BR 10094	0,008 a	0,043 bc	0,187 ab	0,128 bcde	0,288 abc
BR 2001	0,009 a	0,074 abc	0,337 ab	0,351 ab	0,224 abc
40A5	0,014 a	0,107 abc	0,391 a	0,278 abcde	0,317 abc
BR 3272	0,009 a	0,182 ab	0,288 ab	0,429 ab	0,311 abc
BR 3274	0,009 a	0,035 bc	0,363 ab	0,310 abcd	0,415 ab
9A1	0,003 a	0,000 c	0,000 b	0,000 e	0,000 c
BR 3392	0,001 a	0,000 c	0,000 b	0,026 cde	0,026 bc
TN	0,000 a	0,000 c	0,000 b	0,000 e	0,000 c
T0	0,000 a	0,000 c	0,000 b	0,0 e	0,000 c
Média	0,009 B	0,067 B	0,221 A	0,223 A	0,241 A
CV (%)	7,82	2,86	7,50	5,97	7,06

Valores seguidos de letras minúsculas na mesma coluna e, maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 4. Massa seca da planta (MSP) de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculadas com diferentes isolados de *Bradyrhizobium*, em diferentes épocas de coleta.

Tratamentos	MSP (g planta ⁻¹)				
	15 DAE	30 DAE	45 DAE	60 DAE	75 DAE
BR 10100	0,381 ab	1,344 bcde	5,197 abc	5,761 abc	5,336 ab
BR 3270	0,428 ab	1,699 abc	5,257 a	7,204 a	6,159 a
BR 3289	0,344 b	2,613 a	5,252 ab	6,193 ab	6,910 a
BR 10094	0,366 ab	0,749 cde	2,159 abc	2,513 abc	4,676 ab
BR 2001	0,478 ab	1,067 cde	5,377 a	6,366 abc	4,571 abc
40A5	0,388 b	1,624 abcd	4,996 abc	5,494 abc	5,358 ab
BR 3272	0,505 ab	2,272 ab	4,721 abc	8,762 a	4,960 ab
BR 3274	0,358 ab	0,671 cde	4,895 abc	4,992 abc	3,679 abc
9A1	0,489 ab	0,469 e	0,490 c	0,370 c	0,511 c
BR 3392	0,524 a	0,541 de	0,426 c	0,759 bc	0,538 c
TN	0,391 ab	0,775 cde	1,342 abc	1,819 abc	1,765 bc
T0	0,458 ab	0,468 e	0,491 bc	0,541 bc	0,558 c
Média	0,426 B	1,191 B	3,384 A	4,231 A	3,752 A
CV (%)	20,65	11,10	27,29	30,09	22,35

Valores seguidos de letras minúsculas na mesma coluna e, maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

uma pequena redução, porém, não significativa estatisticamente, aos 75 DAE (Tabela 4). Em relação a este parâmetro, os valores foram maiores nas coletas realizadas aos 45, 60 e 75 DAE em comparação às duas primeiras épocas de coleta. Resultados semelhantes foram encontrados por Xavier et al. (2007a), contudo, os autores relataram uma redução significativa da massa seca da parte aérea a partir dos 60 DAE.

Os valores mais elevados de massa seca das plantas foram encontrados quando estas foram inoculadas com os isolados BR 3270 e BR 3289 e com a estirpe BR 2001, em comparação aos isolados 9A1 e BR 3392 (Tabela 4). Em algumas das coletas, os isolados BR 3270 e BR 3289 e a estirpe BR 2001 induziram um maior acúmulo de massa seca que o tratamento com N mineral (TN). Estes resultados corroboram os encontrados por Nascimento et al. (2010), que avaliando a eficiência de rizóbios isolados de solos do agreste paraibano, relataram diferença entre alguns isolados e o tratamento com N mineral, assim como os resultados encontrados por Santos et al. (2005) em estudos com amendoim.

Já os valores de N_{ac} acumulado pelas plantas aumentou até os 60 DAE, seguido de uma ligeira redução aos 75 DAE, sendo que os maiores valores foram observados nas coletas realizadas aos 45 e 60 DAE. Contudo, a última coleta (75 DAE) não diferiu estatisticamente das demais (Tabela 5). Aos 75 DAE as plantas já se encontravam no final da fase reprodutiva. Portanto, a redução dos teores de N_{ac} se deu em função da translocação do N para os grãos, por ocasião da fase fenológica em que as plantas se encontravam.

Brito et al. (2009), comparando as épocas de coleta 38 e 78 dias após a semeadura (DAS), com feijão-caupi, verificaram que houve ganho líquido de aproximadamente 2,5 vezes na quantidade de N_{ac} acumulada em favor da época 78 DAS, alcançando valor máximo nesta época, porém, com redução nos teores de N_{ac} a partir da mesma. Esse aumento provavelmente se deve à maior atividade simbiótica no final do ciclo da cultura, a exemplo do verificado em outros estudos (FRANCO et al., 2002; MARTINS et al., 2003).

Tabela 5. Nitrogênio acumulado pelas plantas (N_{ac}) de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculadas com diferentes isolados de *Bradryrhizobium*, em diferentes épocas de coleta.

Tratamentos	N_{ac} (mg g ⁻¹)				
	15 DAE	30 DAE	45 DAE	60 DAE	75 DAE
BR 10100	8,22 ab	30,07 abcd	198,7 a	187,2 abc	119,4 ab
BR 3270	9,58 a	40,68 abc	178,9 ab	227,3 ab	137,7 ab
BR 3289	6,77 ab	56,16 a	161,2 abc	203,6 abc	173,7 a
BR 10094	5,45 b	13,91 cde	65,82 bc	74,70 abcd	90,94 abc
BR 2001	6,60 ab	17,61 cde	180,5 a	205,0 abc	98,53 abc
40A5	5,92 ab	38,87 abc	177,8 ab	166,4 abc	111,7 ab
BR 3272	8,03 ab	51,22 ab	170,1 abc	266,1 a	98,69 abc
BR 3274	5,56 b	11,73 cde	179,1 ab	145,1 abcd	75,80 abc
9A1	5,50 b	4,88 e	8,63 c	5,16 d	8,53 c
BR 3392	5,81 ab	6,29 e	7,95 c	17,23 cd	8,69 c
TN	5,70 ab	22,43 bcde	22,18 bc	30,66 bcd	33,30 bc
T0	6,17 ab	7,31 de	6,79 c	6,86 d	7,67 c
Média	6,61 B	25,10 B	113,14 A	127,94 A	80,39 AB
CV (%)	12,60	28,28	33,60	35,32	38,66

Valores seguidos de letras minúsculas na mesma coluna e, maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Em pelo menos uma das épocas de avaliação as plantas inoculadas com os isolados BR 10100, BR 3270, BR 3289, 40A5, BR 3272 e com a estirpe BR 2001 apresentaram maior teor de N_{ac} que as plantas inoculadas com os isolados BR 3274, 9A1 e BR

3392. Além disso, em pelo menos uma das épocas de coleta as plantas inoculadas com os isolados BR 10100, BR 3289, BR 3272 e com a estirpe BR 2001 apresentaram maior teor de N_{ac} que o tratamento com N mineral (Tabela 5). Em experimento com

Tabela 6. Massa seca de grãos (MSG) e massa seca de vagens (MSV) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculadas com diferentes isolados de *Bradyrhizobium*.

Tratamentos	MSG	MSV
	(g planta ⁻¹)	
BR 10100	2,094 ab	0,590 ab
BR 3270	1,471 ab	0,674 ab
BR 3289	2,901 a	0,889 ab
BR 10094	1,393 ab	0,793 ab
BR 2001	1,249 ab	0,414 ab
40A5	2,164 ab	0,573 ab
BR 3272	3,037 a	1,025 a
BR 3274	2,315 ab	0,652 ab
9A1	0,000 b	0,000 b
BR 3392	0,000 b	0,000 b
TN	0,000 b	0,000 b
T0	0,000 b	0,000 b
CV (%)	13,42	15,29

Valores seguidos das mesmas letras e na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

cinco cultivares de feijão-caupi e duas estirpes de *Bradyrhizobium* conduzido sob condições de casa-de-vegetação, Melo e Zilli (2009) observaram interação entre as cultivares de feijão-caupi e estirpes de *Bradyrhizobium*, sendo que em algumas destas interações, maiores valores de N_{ac} foram encontrados em tratamento sob inoculação em relação ao tratamento com N mineral. Contudo, estes mesmos autores reportaram que em experimento de campo as estirpes de *Bradyrhizobium* apresentaram resultados iguais ou inferiores ao tratamento com N mineral, a depender da cultivar de feijão-caupi.

Os dados de componentes de produtividade revelaram que os isolados BR 3289 e BR 3272 proporcionaram maior massa seca de grãos (MSG) e o isolado BR 3272 maior massa seca de vagens (MSV) que os isolados 9A1 e BR 3392. As plantas de feijão-caupi inoculadas com os isolados BR 10100, BR 3289, 40A5, BR 3272 e BR 3274 produziram MSG entre 1,6 a 2,4 vezes maior que a estirpe BR 2001, contudo, estas diferenças não foram significativas (Tabela 6). Em um estudo conduzido em solo de Cerrado e de mata alterada em Roraima, Zilli et al. (2009) observaram diferenças no rendimento de grãos de feijão-caupi cv. Mazargão, onde a estirpe de *Bradyrhizobium* BR 3262 proporcionou maior produtividade que as demais, contudo, sem diferença significativa para os tratamentos com N mineral.

Todos os parâmetros estudados apresentaram correlação significativa com a massa seca de grãos. À medida que houve aumento no NN, MSN, MSP e N_{ac}, houve aumento na MSG, sendo encontrados altos coeficientes de correlação entre as variáveis (Figuras 1A a 1D). Embora a literatura relate que não há uma correlação linear entre os componentes da nodulação e a capacidade de fixação de N (HANSEN et al., 1983), em um estudo com cultivares de soja, Brandelero et al. (2009) relataram uma correlação estatisticamente significativa para o rendimento de grãos sobre os componentes da nodulação (número e massa matéria seca), demonstrando que mais de 40% dos resultados do rendimento se correlacionaram com a nodulação, seguidos de 36% para massa seca das folhas das plantas.

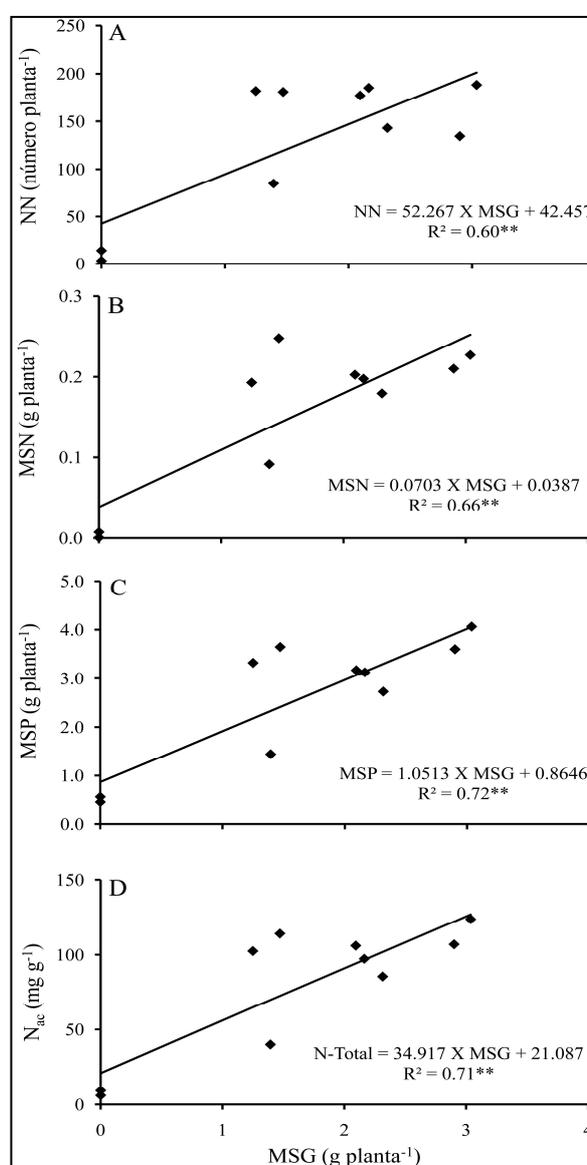


Figura 1. Análise de regressão entre massa seca de grãos e número de nódulos (A), massa seca de nódulos (B), massa seca das plantas (C) e o N_{ac} (D) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculadas com diferentes isolados de *Bradyrhizobium*. ** regressão significativa ($p < 0,01$).

Por outro lado, em plantas inoculadas com bactérias fixadoras de N, elevados valores de massa seca da planta (MSP) e de N_{ac} acumulado têm sido relacionados à maior capacidade de fixação de N por rizóbios mais eficientes (LIMA et al., 2005; FLORENTINO; MOREIRA, 2009), assim como indicativos de alta produtividade das culturas (ZILLI et al.; 2009; FERREIRA et al., 2009).

Dos nove isolados de *Bradyrhizobium* avaliados neste trabalho, em pelo menos duas das épocas de coleta e na avaliação de rendimento de grãos, 4 deles (BR 10100, BR 3272, BR 3270 e BR 3289) apresentaram resultados promissores e, na maioria das vezes, superiores ou iguais aos resultados da estirpe BR 2001. Os quatro isolados apresentam crescimento lento em meio de cultura e fenótipo Hup^{hr} (Tabela 1), ou seja, a depender do hospedeiro estes isolados podem apresentar o fenótipo Hup⁺. A literatura relata que estirpes de *Bradyrhizobium* com fenótipo Hup⁺ se beneficiariam de uma economia substancial de substratos de carbono, uma vez que a oxidação do H₂ liberado pela nitrogenase é realizada através de uma reação independente de ATP, reciclando H⁺ e liberando ATP (McRAE et al., 1978), o que poderia conferir uma maior eficiência simbiótica a estas bactérias. Contudo, o isolado 9A1, que apresenta tais características, neste trabalho não apresentou resultados expressivos.

Entretanto, por alguma razão ainda não conhecida, o fenótipo Hup⁺ é reprimido de acordo com o hospedeiro. Sendo assim, um terceiro fenótipo em termos de expressão da atividade da hidrogenase foi estabelecido e designado Hup^{hr} (hydrogen uptake host-regulated) (VAN BERKUM, 1990). Esta observação tem um significativo potencial para o aumento da eficiência da fixação biológica de nitrogênio pela população de *Bradyrhizobium* adaptada ao solo, uma vez que estirpes com este fenótipo predominam no solo e são altamente competitivas em relação à nodulação (VAN BERKUM, 1990).

Além de apresentar o fenótipo Hup^{hr}, dois dos quatro isolados (BR 3270 e BR 3289) também apresentam resistência alta ou muito alta a antibióticos (XAVIER et al., 2003). De acordo com Cuadrado et al. (2009), tais características conferem a estas bactérias a capacidade de crescer melhor em ambientes hostis e lhes conferem um maior potencial de uso como bioinoculantes.

CONCLUSÕES

O número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da planta e teor de N_{ac} aumenta até os 45 DAE;

O número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da planta, teor de N_{ac} apresentam alta correlação com a massa seca de grãos;

As plantas de feijão-caupi inoculadas com os isolados BR 10100, BR 3289, BR 3272, BR 3274 e 40A5 produzem entre 1,6 a 2,4 vezes mais MSG do que quando inoculadas com a estirpe BR 2001.

REFERÊNCIAS

BRANDELERO, E. M.; PEIXOTO, C. P.; RALISCH, R. Nodulação de cultivares de soja e seus efeitos no rendimento de grãos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 581-588, 2009.

BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de ¹⁵N. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, n. 4, p. 895-905, 2009.

CAMPO, J. R.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil. **Field Crops Research**, v. 110, n. 3, p. 219-224, 2009.

COSTA, J. V. T. et al. Desenvolvimento de nódulos e plantas de caupi (*Vigna unguiculata*) por métodos destrutivo e não destrutivo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 1, p. 11-19, 2006.

CUADRADO, B.; RUBIO, G.; SANTOS, W. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionadas de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinoculos. **Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas**, v. 38, n. 1, p. 78-104, 2009.

DI CIOCCO, C. et al. Biological fixation of nitrogen and N balance in soybean crops in the pampas region. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 1, p. 114-119, 2008

FERREIRA, D. F. **Sisvar 4.3**. 2003. <http://www.dex.ufla.br/danielff/sisvar>.

FERREIRA, P. A. A. et al. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2210-2212, 2009.

FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microissimbiote de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 215-226, 2009.

FRANCO, M. C. et al. Nodulation in Andean and Mesoamerican cultivars of dry bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1145-1150, 2002.

HANSEN, A. P. et al. Respiration and nitrogen fixation of hydroponically cultured *Phaseolus vulgaris* L. cv. OAC Rico and a supernodulating mutant. 1. Growth, mineral-composition and effect of sink removal. **Planta**, v. 189, n. 4, p. 538-545, 1983.

- LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.
- MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 1005-1010, 1997.
- MARTINS, L. M. V. et al. 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, 2003.
- McRAE, R. E.; HANUS, F. J.; EVANS, H. G. Properties of hydrogen system in *Rhizobium japonicum* bacteroids. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, v. 80, n. 2, p. 384-390, 1978.
- MELO, S. R.; ZILLI, J. É. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 9, p. 1177-1183, 2009.
- MUSINGUZI, P.; TENYWA, J. S.; BEKUNDA, M. A. Strategic nutrient management of field pea in southwestern Uganda. **African Journal of Food Agriculture, Nutrition and Development**, v. 10, n. 6, p. 2695-2706, 2010.
- NASCIMENTO, L. R. S. et al. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 1, p. 36-42, 2010.
- NORRIS, D. O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. In relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 29, n. 2, p. 214-235, 1964.
- OKOGUN, J. A. et al. On-farm evaluation of biological nitrogen fixation potential and grain yield of Lablab and two soybean varieties in the northern Guinea savanna of Nigeria. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 73, n. 2-3, p. 267-275, 2005.
- ROCHA, M. M. et al. **Purificação genética e seleção de genótipos de feijão-caupi para a região semi-árida piauiense**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2008. 14 p. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 136).
- RUMJANEK, N. G. et al. Fixação biológica do nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R. et al. (Eds). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA, 2005. p. 281-335.
- SANTOS, J. O. et al. Ontogenia da nodulação em feijão-fava (*Phaseolus lunatus*). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 4, p. 426-429, 2009.
- SANTOS, C. E. R. S. et al. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 301-307, 2005.
- SILVA et al. Desenvolvimento vegetativo do feijão caupi irrigado com água salina em casa de vegetação. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 3, p. 156-159, 2009.
- TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p.
- VAN BERKUM, P. Evidence for a third uptake hydrogenase phenotype among the soybean bradyrhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 3835-3841, 1990.
- WESSA P. Pearson Correlation (v1.0.3) in Free Statistics Software (v1.1.23-r4), Office for Research Development and Education, 2008. http://www.wessa.net/rwasp_correlation.wasp/
- XAVIER, G. R. et al. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n. 4, p. 386-392, 2003.
- XAVIER, G. R. et al. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 1, p. 25-33, 2006.
- XAVIER, T. F. et al. Ontogenia da nodulação de duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 561-564, 2007a.
- XAVIER, G. R. et al. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição *in vitro*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 4, p. 1-9, 2007b.
- ZILLI, J. E. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.
- ZILLI, J. E. et al. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 4, p. 749-758, 2009.