

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE
BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO
DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS EM
CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] E SUA
IDENTIFICAÇÃO**

BRUNO LIMA SOARES

2009

BRUNO LIMA SOARES

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE BACTÉRIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO DE DIFERENTES
PROCEDÊNCIAS EM CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] E
SUA IDENTIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora
Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Soares, Bruno Lima.

Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio de diferentes procedências em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] e sua identificação. / Bruno Lima Soares. – Lavras : UFLA, 2009.

49 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Eficiência simbiótica. 2. Caupi. 3. Fixação biológica de nitrogênio. 4. Sequenciamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.652

BRUNO LIMA SOARES

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE BACTÉRIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO DE DIFERENTES
PROCEDÊNCIAS EM CAUPI [VIGNA UNGUICULATA (L.)
WALP.] E SUA IDENTIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo, para a
obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. Messias José Bastos de Andrade

UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

UFLA

Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus pais, Hélio Lelis Soares e Maria das Graças de Lima Soares, pelo apoio e amor incondicional oferecidos durante todos esses anos de vida.

Ao irmão André, pela grandiosa amizade.

A namorada Patrícia, pela compreensão, amizade e paciência.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Ciência do Solo e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira, pela orientação, paciência, oportunidade concedidas e pelos ensinamentos passados.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia do Solo, Paulo, Sílvia, Márcia, Plínio, Cleide, Maíra, Gláucia, Leandro, Alice, Mauricio, Jerusa e a outros que posso ter esquecido o nome.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do Solo, Marlene e Manuel, pelo apoio.

A Daniela, sempre pela disposição em nos ajudar e pela amizade.

Ao Professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela amizade e oportunidade de trabalhar no Laboratório de Genômica na Universidade Federal de Viçosa, e aos colegas Klaus, Miki, Janaina, Tadeu, Luis, Edson e Júlio.

Aos amigos de Viçosa, Tonnis, Nado, Guigo, Dudu, Leandro, Renata, Flávia, Graziela, Sandra Regina, Bea, Prof. Renna, Dr. Antônio, Pompéia, Toninha e Sr. Renato e todos aqueles que me ajudaram na formação de cidadão.

Aos amigos do curso de Agronomia/UFV.

Aos amigos que formaram na UFV e moram em Lavras, Gervasio, Flavinha, Valquíria e Joice.

Essa publicação apresenta parte dos resultados do projeto internacional “Conservação e Manejo Sustentado da Biodiversidade do Solo”, implementado em sete países tropicais – Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Quênia, México e Uganda. Este Projeto é coordenado pelo Tropical Soil Biology and Fertility Institute do CIAT (TSBF-CIAT) com cofinanciamento do “Global Environmental Facility” (GEF), e suporte para implementação do “United Nations Environment Program” (UNEP). O componente brasileiro do projeto é denominado BiosBrasil e é coordenado pela UFLA (www.bios-brasil.ufla.br). As opiniões expressas nesta publicação são de seus autores e não necessariamente refletem aquelas das instituições às quais os mesmos são filiados, do “United Nations Environment Programme” ou do “Global Environmental Facility.”

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRAT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 O feijão caupi.....	4
2.2 Importância da fixação biológica de nitrogênio na cultura do caupi.....	5
2.3 Diversidades de bactérias que nodulam o feijão caupi.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Estirpes avaliadas.....	11
3.2 Experimento 1.....	17
3.3 Experimento 2.....	19
3.4 Experimento 3.....	21
3.5 Amplificação e seqüenciamento parcial do gene do RNA ribossomal 16S.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Experimento 1.....	25
4.2 Experimentos 2 e 3.....	31
4.3 Amplificação e seqüenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal	39
5 CONCLUSÕES.....	43
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

RESUMO

SOARES, Bruno Lima. **Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio de diferentes procedências em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] e sua identificação.** 2009. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O feijão caupi (*Vigna unguiculata*) é uma cultura de grande importância para as regiões brasileiras do Norte e Nordeste por ser excelente fonte de nutrientes e carboidratos para a população de baixa renda que o produz e consome. Porém, apresenta grande potencial para expansão, podendo ser consumido em outras regiões do Brasil. Sua capacidade de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico é de fundamental importância para a agricultura, por reduzir os custos de produção e impactos ambientais ocasionados pela produção e utilização de fertilizantes nitrogenados. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência simbiótica de novas estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio em associação com caupi, provenientes de diferentes sistemas de uso da terra da região Amazônica e de áreas de mineração de bauxita sob diferentes formas de reabilitação, e identificá-las por sequenciamento do gene rDNA 16S em comparação ao GenBank. Vinte e oito estirpes de bactérias de diferentes sistemas de uso da terra foram testadas quanto à eficiência em fixar nitrogênio em associação com o caupi, comparadas com tratamentos inoculados com estirpes recomendadas para o caupi mais duas testemunhas sem inoculação, sem nitrogênio e com nitrogênio mineral. Oito estirpes foram selecionadas em função de promover maior produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), em condições axênicas, para testes em vasos com solo. Após o cultivo nos vasos, três estirpes, a UFLA3-164, UFLA3-153 e UFLA3-154 se destacaram em produzir maiores valores de MSPA. O solo utilizado neste experimento apresentou alta densidade de rizóbios nativos com potencial em fixar nitrogênio, podendo ser utilizado na captura de novas estirpes. Foi verificado que das três melhores estirpes selecionadas em vasos com solo, uma pertence ao gênero *Bradyrhizobium* (UFLA 3-164) e outra ao gênero *Burkholderia* (UFLA-154).

¹ Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Maria de Souza Moreira (DCS/UFLA)

ABSTRAT

SOARES, Bruno Lima. **Symbiotic efficiency and identification of nitrogen-fixing bacterial strains isolated from Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]**. 2009. 49 p. Dissertation (Master in Soil Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.²

The cowpea (*Vigna unguiculata*) is an important crop in the North and Northwest regions of Brazil because it is a source of protein and carbohydrates for low-income populations that cultivate and use it as food. However, this crop also has a great potential to be consumed in other regions of Brazil. The symbiosis between cowpea and nitrogen-fixing bacteria is extremely important to reduce costs and environmental impacts associated to fertilizer application. Our work aimed to evaluate the symbiotic efficiency of nitrogen-fixing bacterial strains isolated from the Amazon and bauxite mining sites, and to identify those strains by sequencing of their 16S rRNA gene. The symbiotic efficiency of twenty-eight strains isolated from different land use systems were tested and compared to strains currently recommended for cowpea inoculation, as well as to controls without inoculation, without nitrogen and with mineral nitrogen. Eight strains were selected based on their ability to increase the shoot dry matter when cowpea was cultivated in recipient containing soil. The strains UFLA3-164, UFLA3-153 and UFLA3-154 induced the highest increments in dry shoot matter. The soil used for the experiment presented high density of rhizobia with potential for nitrogen fixation. We verified that one of the three selected strains belongs to the genus *Bradyrhizobium* (UFLA 3-164) and another to the genus *Burkholderia* (UFLA-154).

² Adviser: Prof^a Dr^a. Fátima Maria de Souza Moreira (DCS/UFLA)

1 INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) tem sua origem na África e é conhecido no Brasil como feijão de corda, feijão de praia ou feijão-macáçar, encontrando aqui condições climáticas semelhantes ao do seu local de origem.

No Nordeste, a cultura apresenta alta adaptabilidade às condições locais tais como estresse hídrico e calor intenso. Após o final de período com déficit hídrico, observa-se alta capacidade de recuperação das plantas com emissão de folhas novas e botões florais (Leite et al., 1999).

No Norte e Nordeste o caupi é plantado principalmente por pequenos agricultores como cultura de subsistência, alimento básico para suas famílias, por se tratar de ser uma excelente fonte de carboidratos, proteínas, fibra dietética e vitaminas. Entretanto, produtores do estado do Maranhão estão plantando a cultura em larga escala, como forma de rotação de cultura em safrinha, aproveitando os nutrientes residuais (Zilli et al., 2006).

Brasil e Índia são os maiores produtores da cultura, destacando-se na região Nordeste brasileira o Estado do Ceará com, área plantada de 618.600 ha e uma produção de 211.800 t (Instituto Ferraz Nenê Pereira Consultoria e Comércio, 2004).

A produtividade média brasileira gira em torno de 400 a 500 kg há⁻¹, valores considerados baixos, caracterizados pelo baixo nível tecnológico empregado na produção. Uma forma de se aumentar a produtividade é a associação da cultura com bactérias fixadoras de nitrogênio que podem suprir de forma parcial ou total a adubação nitrogenada, reduzindo os custos de produção e evitando a poluição ambiental causada pelos impactos da produção desses fertilizantes.

O caupi é considerado promiscuo capaz de nodular com vários gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio denominadas vulgarmente de rizóbios.

Dentro desses gêneros pode-se citar *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Burkholderia*.

Estudos na área de fixação biológica de nitrogênio em simbiose com feijão caupi vêm mostrando que o nitrogênio aplicado na cultura pode ser totalmente substituído pela inoculação de bactérias eficientes. Lacerda et al. (2004), em experimentos realizados em campo, obteve resultados semelhantes com duas estirpes de bactérias quando comparadas à testemunha que recebeu 70 kg ha⁻¹ de nitrogênio mineral, resultados corroborados posteriormente por Soares et al. (2006). Valores semelhantes foram encontrados por Martins et al. (2003), já que o tratamento inoculado com a estirpe BR3267 foi semelhante à testemunha que recebeu 50 kg de nitrogênio mineral ha⁻¹.

Diversos estudos de fixação biológica de nitrogênio em associação com a cultura do caupi têm sido realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo do Departamento de Ciência do Solo/UFLA, apresentando resultados satisfatórios na busca de inoculantes comerciais para a cultura do caupi (Lima et al., 2005; Neves, 2007). Nóbrega (2006) trabalhando com isolados da região Amazônica de diferentes sistemas de uso da terra, encontraram isolados de bactérias para a cultura do caupi que apresentaram valores de matéria seca da parte aérea estatisticamente iguais a testemunha que recebeu nitrogênio mineral. Resultados semelhantes para matéria seca da parte aérea foram encontrados por Melloni et al. (2006), com isolados de bactérias obtidos em área de mineração de bauxita em diferentes formas de reabilitação do solo, os quais revelaram alta diversidade de bactérias capazes de nodular o caupi, aptas a serem inoculadas em solos com características semelhantes.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência simbiótica de novas estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio em associação com caupi, provenientes de diferentes sistemas de uso da terra da região Amazônica e de

áreas de mineração de bauxita sob diferentes formas de reabilitação e identificá-las por seqüenciamento do gene rDNA 16S e comparação ao GenBank.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O feijão caupi

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) é uma leguminosa da família Fabaceae, sendo uma das mais cultivadas no Brasil. Alguns autores dizem ser a Nigéria o centro de origem primário da espécie. Foi introduzido no Brasil pelos colonizadores portugueses no século XVI, época em que o País fazia intenso comércio com o continente africano, e a Bahia foi o primeiro estado a relatar a ocorrência da cultura.

O feijão caupi, no Brasil, apresenta nomes vulgares que variam com a região onde é cultivado. No norte é conhecido por feijão-da-colônia, feijão-de-praia e feijão-de-estrada. No nordeste, por feijão-macácar ou feijão-de-corda. No sul da Bahia e norte de Minas Gerais é conhecido por feijão-catador ou feijão-gurutuba e, em outras regiões, como feijão-miúdo e feijão Fradinho (Freire Filho et al., 2005).

Sua baixa produtividade deve-se ao manejo inadequado, aliados a má escolha do local de plantio, caracterizado por solos marginais de baixa fertilidade, cultivados quase em sua totalidade por pequenos produtores como cultura de subsistência, com baixo nível tecnológico.

O feijão-caupi apresenta elevada importância econômica e social em regiões tropicais do Brasil e da África por apresentar alta adaptabilidade a solos de baixa fertilidade, veranicos prolongados e ainda se associar-se com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. Pode ser consumido como grãos secos ou verdes.

No Brasil, 70% de todo feijão produzido no Norte e Nordeste é feijão caupi (Vieira, 1989). Segundo Santos et al. (2000), nos estados do Nordeste tais como Maranhão, Piauí, Rio Grande Norte e Ceará, o feijão caupi representa 95 a 100% de toda área plantada com feijão; já na região Norte as maiores áreas

plantadas se concentram no Pará e Amazonas, destacando-se o Pará com a maior área plantada (Oliveira Júnior et al., 2000).

Nos estados do Piauí e Maranhão grandes produtores agrícolas dos cerrados têm adotado o plantio do caupi na safrinha como forma de rotação de culturas devido à compatibilidade com o sistema e sua adaptabilidade a regime pluviométrico decrescente, aproveitando os nutrientes residuais das culturas antecessoras (Zilli et al., 2006).

O feijão caupi se destaca também por ser excelente fonte energética, protéica, de fibras dietéticas, vitaminas e minerais para as populações de baixa renda que o cultivam como cultura de subsistência. Frota et al. (2008), por exemplo, estudaram o feijão caupi cultivar BRS-Milênio, encontraram atributos desejáveis em suas sementes, tais como, alto conteúdo protéico energético, de fibras alimentares e de minerais em sua composição. Em termos médios os grãos feijão caupi apresentam 25% de proteínas, 62% de carboidratos (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte, 2007).

2.2 Importância da fixação biológica de nitrogênio na cultura do caupi

O nitrogênio é um dos elementos mais limitantes para a produção agrícola mundial. Em algumas regiões está presente em excesso, causando efeitos prejudiciais ao meio ambiente e, conseqüentemente, à população. Em outras regiões encontra-se em quantidades escassas, causando baixa produtividade das culturas, acarretando fome e desnutrição (Martinelli, 2007).

Em regiões onde o nitrogênio é um elemento escasso e onde são cultivadas plantas leguminosas para produção agrícola, estudos de fixação biológica de nitrogênio são de grande importância, por incrementar ganhos de produtividade e redução dos custos de produção. Portanto, estudos de melhoramento genético da cultura e sobre a especificidade da simbiose entre

macro e microsimbionte tornam-se necessários na busca de novos inoculantes com eficiência agrônômica e adaptabilidade às condições regionais.

A cultura do caupi, por ser cultivado quase que na sua totalidade por pequenos agricultores e pela baixa utilização de insumos, a fixação biológica de nitrogênio por bactérias simbióticas é de grande interesse econômico por incrementar os níveis de produção, além de favorecer o sistema radicular no antagonismo a patógenos e outras contribuições como os efeitos sinérgicos (Silva et al., 2006).

A associação do caupi com bactérias pode contribuir com valores na faixa de 40% a 90% do total de N acumulado pela cultura (Rumjanek et al., 2005) contribuindo então com o crescimento e desenvolvimento das plantas, além de diminuir os custos de produção e economizar combustíveis fósseis utilizados para fabricação de fertilizantes nitrogenados. Segundos esses autores, se a cultura fosse adubada com fertilizantes nitrogenados nas regiões norte e nordeste haveria um gasto de cerca de US\$ 13 milhões anuais.

Devido à característica de ser produzida em baixo nível tecnológico e em solos marginais, com deficiências de fósforo e nitrogênio a produtividade de grãos do feijão caupi no Brasil encontra-se na faixa de 400 a 500 kg por hectare (Freire Filho et al., 1999).

Na busca de novos inoculantes eficientes na fixação de nitrogênio com leguminosas, estudos de laboratórios e casa de vegetação devem ter continuidade em campo, uma vez que os selecionados devem ser bons competidores por sítios de infecção em campo e apresentar adaptação aos locais onde serão testados, competindo com rizóbios nativos e sobrevivendo às condições edafoclimáticas locais.

O feijão caupi é considerado uma planta promiscua capaz de nodular com vários gêneros de rizóbios nativos (Singleton et al., 1992), muitas vezes de

baixa eficiência, representando uma baixa limitação agrônômica (Mpeperekí et al., 1996).

Vários são os dados encontrados mostrando os ganhos em produtividade e rendimentos de grãos que o caupi pode alcançar após inoculação das sementes com bactérias fixadoras de nitrogênio.

Zilli (2006) relata que após inoculação com a estirpe BR 3267, houve aumento de 10% na produtividade de feijão caupi, passando para 1600 kg ha⁻¹.

Este mesmo autor ressalta que se a cultura fosse adubada com nitrogênio na forma de uréia o custo seria de 150 a 200 reais por hectare. Com a inoculação das sementes com bactérias, esse custo cai em torno para oito reais por hectare.

Em condições experimentais e em campo, em áreas de produtores rurais, Martins et al. (2003) estudando a estirpe BR 3267 na região de Petrolina, encontraram incrementos de 40% na produtividade em relação à testemunha que não recebeu adubação nitrogenada, incremento igual ao da testemunha que recebeu 50kg de N há⁻¹. Com a mesma quantidade de nitrogênio mineral aplicado por hectare, Nascimento et al. (2008) encontraram valores semelhantes em experimento conduzido no estado do Ceará, com estirpes recomendadas pela MAPA.

Em experimento de campo realizado em Perdões - MG, utilizando cinco estirpes fixadoras de nitrogênio, Soares et al. (2006) encontraram rendimentos de grãos semelhantes aos da testemunha que recebeu adubação mineral de 70kg de N-uréia quando utiliza as estirpes UFLA 03-84 e INPA03-11B, com valores que variaram de 957 a 949 kg ha⁻¹. Lacerda et al. (2004), em experimento de campo também encontraram rendimentos comparáveis ao da testemunha que recebeu adubação mineral de 70kg de N-uréia por hectare com quatro estirpes avaliadas, com valores que variaram de 1264 a 1413 kg ha⁻¹.

2.3 Diversidades de bactérias que nodulam o feijão caupi

O feijão caupi é uma leguminosa considerada promiscua por ser capaz de nodular com diferentes gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico com características diversas em morfologia, fisiologia, genética, bioquímica e filogenética. Apesar da grande diversidade apresentada por bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas, Moreira & Siqueira (2006) afirmam que apenas 1% de total de microrganismos no planeta tenha sido caracterizados e identificados.

Estudos de diversidade e eficiência de bactérias nodulíferas de leguminosas têm sido desenvolvidos por diversas instituições de pesquisas e em vários ecossistemas e locais de exploração agrícola e de mineração.

A região Amazônica, com aproximadamente 5 milhões de Km², abrange 59% do território brasileiro e apresenta poucos estudos, apesar de sua abrangência territorial e diversidade de ecossistemas com bactérias que nodulam leguminosas (Magalhães et al., 1982; Bonetti et al., 1984; Moreira et al., 1992; Pereira, 2000; Jesus et al., 2005).

Nos solos da região Amazônica espera-se encontrar grande diversidade de bactérias que nodulam leguminosas e, entre estas, obterem isolados que apresentam potencial para estudos posteriores, objetivando a produção de inoculantes para leguminosas de interesse agronômico.

Pereira (2000) estudando isolados de solos da Amazônia de diferentes sistemas de uso da terra (SUT) provenientes do caupi encontrou bactérias com características de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. Resultados semelhantes foram encontrados por Fernandes et al. (2003), em estudos realizados nos tabuleiros costeiros de Sergipe, envolvendo as culturas do caupi e guandu, encontrando alta diversidade genética entre os isolados, que se posicionaram taxonomicamente nos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

Alta diversidade de bactérias dentro do gênero *Bradyrhizobium* foi encontrado por Moreira et al. (1993), mediante análise de proteína total por SDS-PAGE, em isolados da região Amazônica.

Neves (2007) estudando bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com caupi provenientes da Amazônia Ocidental, isoladas por Nóbrega (2006), na cidade de Benjamim Constant como parte do projeto “Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity”, financiado pelo GEF e implementado pelo “United Nations Environment Programme (UNEP)”, também encontrou alta diversidade genética de bactérias em dois sistemas de uso da terra (SUT).

Segundo dados compilados por Moreira (2008), o feijão caupi, por ser uma cultura promíscua, é capaz de nodular com vários gêneros de rizóbios tais como: *Rhizobium* (Frank, 1889), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Allorhizobium* (De Lajudie et al., 1998), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Burkholderia* (Moulin et al., 2001). Contudo máxima eficiência em obter nitrogênio por simbiose encontra-se em bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Lacerda, 2004; Soares et al., 2006; Lima et al., 2005).

Silva et al. (2007) estudando estirpes isoladas de feijão caupi da região semi-árida de Pernambuco, encontraram seis bactérias que, por análise de similaridade a partir de características morfológicas, pertenciam ao grupo de *Bradyrhizobium* (SEMIA 6145) e outras três que não pertenciam a esse grupo.

Estudos recentes em fixação biológica de nitrogênio com caupi têm demonstrado grande afinidade dessa cultura com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* provenientes de diferentes regiões, com variações de clima, solo e vegetação. Lima et al. (2005) estudando diversidade de bactérias que nodulam caupi, encontrou 11 grupos de bactérias com perfil protéico com 81% de similaridade com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.

Outras áreas também podem ser utilizadas para seleção e identificação de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. Em áreas de mineração de bauxita, o nitrogênio é um elemento escasso, devido a perdas por mineralização e lixiviação, volatilização e desnitrificação (Motta, 2002).

Apesar dos estudos com leguminosas nessas áreas, pouco se sabe sobre a diversidade, densidade e eficiência de microrganismos diazotróficos simbióticos com leguminosas. Melloni et al. (2006), em trabalho de casa de vegetação com amostras de solos provenientes de áreas de mineração de bauxita, encontraram alta diversidade de bactérias capazes de nodular caupi a 60% de similaridade com estirpes referências. Os gêneros encontrados foram; *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estirpes avaliadas

Vinte e oito estirpes foram selecionadas de trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia do Solo na Universidade Federal de Lavras e três estirpes são recomendadas como inoculante para a cultura do caupi pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Das vinte e oito estirpes selecionadas, o critério utilizado para escolha dessas, foi maior produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) mediante inoculação, em comparação à testemunha que recebe adubação nitrogenada sem inoculação e aos tratamentos com estirpes referência, recomendadas como inoculantes para a cultura do caupi.

Oito estirpes foram testadas em vasos de Leonard em caupi por Lima et al. (2005), que os selecionaram de isolados obtidos por Pereira (2000), de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia usando siratro (*Macroptilium atropurpureum*) como planta isca. As características culturais descritas são típicas de *Bradyrhizobium* (Tabela 1).

Outras oito estirpes foram testadas em vasos de Leonard em caupi por Motta (2002), que as selecionou de amostras solos em áreas revegetadas após mineração para extração de bauxita na região de Poços de Caldas-MG na Alcoa Alumínio S/A; foram obtidas dessas amostras usando caupi como planta isca e suas características culturais também são típicas de *Bradyrhizobium* (Tabelas 1).

As 12 estirpes selecionadas restantes são provenientes da Amazônia, município de Benjamin Constant-AM, localizado na base do Rio Solimões, dos sistemas de uso da terra (SUT) floresta secundária e pastagem isolados por Nóbrega (2006) usando o caupi como planta isca e testados quanto à sua eficiência em fixar nitrogênio por Neves (2007), em garrafas de vidro tipo “long neck” com solução nutritiva (Tabela 1).

TABELA 1 Local, características culturais e alguns atributos químicos do solo de origem das estirpes estudadas.

Estirpe	Origem ⁽¹⁾	D ⁽²⁾	Dia. ⁽³⁾	pH ⁽⁴⁾	Goma ⁽⁵⁾	Cor ⁽⁶⁾	Ind ⁽⁷⁾	Característica			Ref
								pH ⁽⁸⁾	A ¹⁺³⁽⁹⁾	m% ⁽¹⁰⁾	
UFLA04-0110	M1	6	1	AL	P	Branca	Não	6,6	0	0	Lima et al. (2002)
UFLA04-0314	C1	6	1-2	AL	M	Branca	Não	4,70	0,90	35	Lima et al. (2002)
UFLA04-0321	C1	7	1-2	AL	M	Creme	Não	4,70	0,90	35	Lima et al. (2002)
UFLA04-1309	C3	6	<1	AL	M	Branca	Não	6,10	0	0	Lima et al. (2002)
UFLA04-0546	P1	6	1-2	AL	M	Branca	Não	5,3	0,40	16	Lima et al. (2002)
UFLA04-0559	P1	6	1-2	AL	M	Branca	Não	5,3	0,40	16	Lima et al. (2002)
UFLA04-0885	P2	7	1-2	AL	M	Branca	Não	6,10	0	0	Lima et al. (2002)

...Cont...

TABELA 1 Cont.

Estirpe	Origem ⁽¹⁾	D ⁽²⁾	Dia. ⁽³⁾	pH ⁽⁴⁾	Goma ⁽⁵⁾	Cor ⁽⁶⁾	Ind ⁽⁷⁾	Característica			Ref
								pH ⁽⁸⁾	A ¹⁺³⁽⁹⁾	m% ⁽¹⁰⁾	
UFLA04-1020	A2	7	1-2	AL	M	Branca	Não	5,7	0	0	Lima et al. (2002)
UFLA3-162	RM	6	1	AL	A	Amarela	Não	5,13	0	0	Motta (2002)
UFLA3-163	RM	10	<4	AL	M	Amarela	Sim	5,13	0	0	Motta (2002)
UFLA3-164	RM	10	2	AL	M	Branca	Sim	5,13	0	0	Motta (2002)
UFLA3-165	RM	6	<1	AL	M	Branca	Não	5,13	0	0	Motta (2002)
UFLA3-154	BG2	6	<1	AL	M	Branca	Não	7,5	0	0	Motta (2002)
UFLA3-172	M10	10	2	N	M	Branca	Sim	5,73	0,07	1,76	Motta (2002)
UFLA3-153	BCG6	10	2-3	AL	A	Branca	Sim	6,73	0	0	Motta (2002)
UFLA3-170	M10	10	2	AL	M	Branca	Não	6,6	0	0	Motta (2002)
88AB3	FS	10	4,5	N	M	Creme	Não	4,3	5,2	25	Nóbrega (2006) e Neves (2007)

...Cont...

TABELA 1 Cont.

Estirpe	Origem ⁽¹⁾	D ⁽²⁾	Dia. ⁽³⁾	pH ⁽⁴⁾	Goma ⁽⁵⁾	Cor ⁽⁶⁾	Ind ⁽⁷⁾	Característica			Ref
								pH ⁽⁸⁾	A ¹⁺³⁽⁹⁾	m% ⁽¹⁰⁾	
90A4	FS	10	3,5	AL	M	Amarela	Não	4,3	5,2	25	Nóbrega (2006) e Neves (2007)
90A8	FS	10	4,5	A	M	Amarela	Não	4,3	5,2	25	Nóbrega (2006) e Neves (2007)
88AB10a	FS	5	3	A	P	Creme	Não	4,3	5,2	25	Nóbrega (2006) e Neves (2007)
88AB6	FS	10	5	A	M	Creme	Não	4,3	5,2	25	Nóbrega (2006) e Neves (2007)
88A10	FS	2	4,5	N	M	Creme	Não	4,9	2,8	51	Nóbrega (2006) e Neves (2007)
											...Cont...

TABELA 1 Cont.

Estirpe	Origem ⁽¹⁾	D ⁽²⁾	Dia. ⁽³⁾	pH ⁽⁴⁾	Goma ⁽⁵⁾	Cor ⁽⁶⁾	Ind ⁽⁷⁾	Característica			Ref
								pH ⁽⁸⁾	A ¹⁺³⁽⁹⁾	m% ⁽¹⁰⁾	
88AC2	FS	10	1,2	N	P	Incolor	Não	4,9	2,8	51	Nóbrega (2006) e Neves (2007)
88C3	P	10	2	N	M	Branca	Não	4,9	2,8	51	Nóbrega (2006) e Neves (2007)
95C5	P	10	2	A	M	Creme	Não	4,9	2,8	51	Nóbrega (2006) e Neves (2007)
95C3	P	2	2,5	A	P	Creme	Sim	4,9	2,8	51	Nóbrega (2006) e Neves (2007)
95B9	P	10	2,5	N	M	Creme	Não	4,9	2,8	51	Nóbrega (2006) e Neves (2007)

...Cont...

TABELA 1 Cont.

Estirpe	Origem ⁽¹⁾	D ⁽²⁾	Dia. ⁽³⁾	pH ⁽⁴⁾	Goma ⁽⁵⁾	Cor ⁽⁶⁾	Ind ⁽⁷⁾	Característica			Ref
								pH ⁽⁸⁾	A ¹⁺³⁽⁹⁾	m% ⁽¹⁰⁾	
95B10	P	10	3,5	A	M	Creme	Não	4,9	2,8	51	Nóbrega (2006) e Neves (2007)

⁽¹⁾Origem: M1- Monocultura feijão. C1- Capoeira, recobrimento natural de 3 anos. C3- Capoeira de 5 anos, árvores bem desenvolvidas. P1- Pastagens de 10 anos, com árvores e tocos. P2- Pastagens limpa com presença de tocos. A2- Sistema agroflorestal. RM- recém minerado e não reabilitado. BG2- Braquiária e guandu 2 anos. M10- Espécies nativas 10 anos. BCG6- Bracatinga e capim gordura 6 anos. FS- Floresta secundária. P- Pastagem. ⁽²⁾Tempo para aparecimento de colônias isoladas. ⁽³⁾Diâmetro da colônia em mm. ⁽⁴⁾pH: modificação do pH do meio de cultivo: N: neutro, AL: alcalino, A: ácido. ⁽⁵⁾Goma: A: abundante, M: moderado, P: pouco. ⁽⁶⁾Cor da colônia após máximo crescimento. ⁽⁷⁾Ind: Absorção do indicador. ⁽⁸⁾pH: pH do solo onde a estirpe foi isolado. ⁽⁹⁾Al³⁺: concentração de alumínio no solo onde a estirpe foi isolado em cmol_c dm³. ⁽¹⁰⁾m%: saturação por alumínio onde a estirpe foi isolada. ⁽¹¹⁾Ref: Trabalhos originais de seleção e identificação das estirpes.

As três estirpes recomendadas como inoculante para o caupi são; A UFLA 03-84 caracterizada como *Bradyrhizobium sp.*, isolada de solos de Rondônia, a INPA 03-11B, caracterizada como *Bradyrhizobium elkanii*, isolada de solos de Manaus-AM e a BR 3267 caracterizada como *Bradyrhizobium sp.*, isolada no semi-árido brasileiro.

Para avaliação da eficiência simbiótica das 31 estirpes em associação com caupi, dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo - DCS/UFLA, um em vasos de Leonard com solução nutritiva e outro em vasos com solo. Um terceiro experimento também foi conduzido em vasos de Leonard no mesmo local com objetivo de determinar o número mais provável de rizóbios nativos do solo e avaliar sua eficiência simbiótica em associação co caupi.

Para identificação das estirpes, as mesmas foram submetidas à amplificação do gene rDNA 16S, pela técnica da PCR (polymerase chain reaction) e, posteriormente, seqüenciadas, e as seqüências amplificadas comparadas ao GenBank.

3.2 Experimento 1

O primeiro experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Solo DCS/UFLA em vasos-de-Leonard (Vincent, 1970), em casa de vegetação entre os dias 25/06 e 16/08/2007. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com três repetições e 33 tratamentos. Os tratamentos foram as 28 estirpes que foram cultivadas em meio 79 (Fred & Waksman, 1928) e mantidas sob refrigeração (a 4°C e a -80°C). Outras três estirpes foram utilizadas como controle: UFLA03-84, INPA03-11B e BR 3267, também mantidas sob refrigeração (a 4°C e a -80°C), aprovadas pelo MAPA para a cultura do feijão caupi. Os outros tratamentos foram duas testemunhas não inoculadas, uma sem nitrogênio mineral e outra com nitrogênio mineral. O

nitrogênio foi aplicado em 3 parcelas, com intervalos de 10 dias, num total de 210 mg de N (NH_4NO_3) por vaso.

A parte superior dos vasos de Leonard foi composta de uma mistura 1:1 de areia (250mL) e de vermiculita (250mL) e a inferior, por solução nutritiva de Jensen modificada (K_2HPO_4 0,2 g L^{-1} ; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g L^{-1} , NaCl 0,2 g L^{-1} , CaHPO_4 1 g L^{-1} , $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g L^{-1} ; H_3BO_3 2,86 mg L^{-1} ; $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,03 mg L^{-1} ; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 mg L^{-1} ; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08 mg L^{-1} e $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,09 mg L^{-1}) diluída quatro vezes. Após o preparo das soluções nutritivas e dos vasos, estes foram autoclavados por uma hora uma pressão de 1,5 kg/cm^2 , a 127°C. As sementes de caupi foram desinfetadas superficialmente com álcool 98,2° por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada para retirada de resíduos dos tratamentos anteriores. Após esses procedimentos, as sementes foram imersas em água destilada esterilizada, por 2 horas. Posteriormente foram colocadas para germinar em placas de petri com papel filme e algodões umedecidos estéreis, a 28°C em câmara de crescimento.

A cultivar de feijão caupi utilizada no experimento foi a BR-17 Gurguéia, resistente ao vírus Cowpea Golden Mosaic Virus (CpGMV), obtidas da Embrapa Meio Norte, Teresina - PI. Após a assepsia e desinfestação das sementes, foram utilizadas quatro sementes pré-germinadas por vaso e em cada uma foi inoculado 1 mL de cultura bacteriana, crescida no meio 79 semi-sólido, na fase log de seu crescimento (quatro dias de cultivo a 28°C e sobre agitação), apresentando, aproximadamente, 10^9 células por semente. Na testemunha sem inoculação e sem adição de nitrogênio mineral foi inoculado apenas 1 mL de meio 79 estéril. Decorridos 10 dias após a germinação, foi feito o desbaste, deixando-se duas plântulas por vaso.

Após a semeadura, na superfície do vaso foi colocada uma camada fina de mistura esterilizada de areia, benzeno e parafina (proporção de 5:1:0,015, respectivamente), com a finalidade de evitar possíveis contaminações.

Os níveis de solução nos vasos foram repostos periodicamente com solução nutritiva de Jensen estéril. Após 52 dias no máximo, florescimentos das plantas foram colhidas e feitas às seguintes avaliações: matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca de raízes (MSR), eficiência relativa (ER%) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) por vaso. A Eficiência relativa de cada tratamento foi calculada segunda a expressão: $ER = (MSPA) * 100 / (MSPA \text{ da testemunha com N mineral})$.

3.3 Experimento 2

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no DCS/UFLA, de 11/02 a 11/05/2008. Foram utilizados vasos plásticos com capacidade de 5,0 dm³. O solo utilizado foi um Cambissolo (EMBRAPA, 2006) coletado no município de Itutinga - MG, com cobertura vegetal de Brachiaria e sem ocorrência de plantio de leguminosa, coletado na camada arável (0 a 20 cm), seco ao ar, destorroado, homogeneizado e passado em peneira de 4 mm antes de ser usado como substrato. Suas características químicas se encontram na Tabela 2.

TABELA 2 Resultado da análise química da amostra de solo (0 a 20 cm de profundidade) antes da adubação⁽¹⁾.

Característica	Unidades	Valores
pH em H ₂ O (1:2,5)		5,8
P (Fósforo Mehlich I)	mg.dm ⁻³	2,3
K (Potássio Mehlich I)	mg.dm ⁻³	58
Ca	cmol _c .dm ⁻³	1,5
Mg	cmol _c .dm ⁻³	0,8
Al	cmol _c .dm ⁻³	0,0
H + Al	cmol _c .dm ⁻³	2,9
S.B	cmol _c .dm ⁻³	2,5
T	cmol _c .dm ⁻³	5,3
t	cmol _c .dm ⁻³	2,5
M	%	0,0
V	%	45,8
Matéria Orgânica	dag.kg ⁻¹	3,0

Análise realizada pelo Laboratório do Departamento de Ciência do Solo da UFLA. S.B= soma de bases. T= Capacidade de troca de cátions a pH 7. t= Capacidade efetiva de troca de cátions. m= Saturação por alumínio. V= Saturação por bases.

O cálculo da dose de calcário foi realizado segundo método de saturação por bases, de modo a elevar a saturação para 60%. O calcário foi aplicado 30 dias antes da semeadura mantendo a umidade do solo para que a reação ocorresse. Em todas as parcelas foi efetuada uma adubação com 300; 300; 40; 0,8; 1,5; 3,6; 5,0 e 0,15 mg dm⁻³ de K, P, S, B, Cu, Mn, Zn e Mo, respectivamente (Malavolta et al., 1989).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições e 12 tratamentos: as estirpes que obtiveram o melhor desempenho no experimento em vasos-de-Leonard, além das três estirpes recomendadas como inoculante para caupi e duas testemunhas não inoculadas, uma sem nitrogênio mineral e outra com nitrogênio mineral (500mg vaso⁻¹, fonte NH₄NO₃), parcelados em duas aplicações (na semeadura e 20 dias após a emergência). Neste ensaio as plantas foram coletadas em duas etapas. Na primeira, três repetições foram coletadas no máximo florescimento das plantas para as seguintes avaliações: matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca de raízes (MSR), eficiência relativa (ER%) e acúmulo de N na parte aérea por vaso (ANPA).

As outras três repetições foram conduzidas até à produção de grãos, quando foram avaliadas as seguintes variáveis: número de vagens, número de grãos e peso de grãos por vaso, além do teor e acúmulo de nitrogênio nos grãos. O peso de grãos foi corrigido para 13% de umidade segundo a fórmula: $W2 = [(100 - A)/100 - B] \times W1$, onde, W1 é peso final, W2 é peso inicial, A é teor de água inicial e B é teor de água final.

3.4 Experimento 3

Com o objetivo de verificar o número mais provável rizóbios nativos do solo do experimento 2, esse terceiro experimento foi conduzido em vasos de Leonard (Vincent, 1970), no Laboratório de Microbiologia do Solo DCS/UFLA nos meses de fevereiro e março 2008, utilizando o mesmo cultivar de feijão caupi dos experimentos anteriores.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições e oito tratamentos. Os tratamentos foram as inoculações com 1 mL da suspensão de solo das diluições seriadas 10⁻¹ a 10⁻⁶, mais duas testemunhas, uma com adição de N mineral e sem inoculação e outra sem N

mineral e também sem inoculação. O nitrogênio foi aplicado ao tratamento correspondente em três parcelas com intervalos de 10 dias, totalizando 210 mg de N-NH₄NO₃ por vaso.

A parte superior dos vasos de Leonard continha uma mistura de 1:1 de areia (250 mL) e vermiculita (250mL), enquanto a inferior continha solução nutritiva de Jensen modificada (K₂HPO₄ 0,2 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O 0,2 g L⁻¹, NaCl 0,2 g L⁻¹, CaHPO₄ 1 g L⁻¹, FeCl₃·6H₂O 0,1 g L⁻¹; H₃BO₃ 2,86 mg L⁻¹; MnSO₄·4H₂O 2,03 mg L⁻¹; ZnSO₄·7H₂O 0,22 mg L⁻¹; CuSO₄·5H₂O 0,08 mg L⁻¹ e Na₂MoO₄·H₂O 0,09 mg L⁻¹) diluída quatro vezes, autoclavada por 30 minutos a 1,5 kg/cm², e a 127°C. Após o preparo dos vasos, estes foram autoclavados por uma hora, a pressão de 1,5 kg/cm², e a 127°C.

As sementes de caupi foram desinfestadas superficialmente com álcool 98,2° por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada para retirada de resíduos dos tratamentos anteriores. Após esses procedimentos, as sementes foram imersas em água destilada esterilizada, por 2 horas. Posteriormente foram colocadas para germinar em placas de petri com papel filme e algodões umedecidos estéreis, a 28°C em câmara de crescimento.

Foram semeadas quatro sementes por vaso e posteriormente foi feita a inoculação de cada semente com 1 mL da solução proveniente das diluições seriadas.

Também foi colocada, sobre a superfície do vaso, uma fina camada de mistura esterilizada de areia, benzeno e parafina (proporção de 5;1;0,015, respectivamente), com finalidade de evitar possíveis contaminações.

Manteve-se o nível de solução nutritiva nos vasos, repondo periodicamente com solução autoclavada. Decorridos 10 dias após a germinação, foi feito o desbaste, deixando duas plantas por vaso. As plantas foram colhidas por ocasião do florescimento para determinação da nodulação

(contagem e matéria seca), matéria seca da parte aérea e para o isolamento das bactérias nativas presentes nos nódulos.

Para a estimativa do número mais provável (NMP) de células de rizóbios nas três amostras coletadas, considerou-se positivo para presença e negativo para ausência, em cada diluição usando o programa MPNES (most propable number estimate) (Woomer et al., 1988).

3.5 Amplificação e seqüenciamento parcial do gene do RNA ribossomal 16S

Os 28 isolados utilizados neste estudo foram submetidos ao seqüenciamento do gene rDNA 16S. Para isto, colônias isoladas foram retiradas e colocadas em tubos “eppendorf” contendo 1000 µL de água ultra pura estéril e aquecida por 10 minutos, a 95°C. Estas amostras foram diluídas 10 vezes e uma alíquota de 10 µL foi utilizada para a reação em cadeia da polimerase (PCR), para um volume final de 50 µL por reação. A concentração final dos reagentes por reação foi de 0,2 µM de cada oligonucleotídeos iniciadores 27F (5AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT), 2,5 mM de cloreto de magnésio, tampão 1X para PCR, 0,2 µM de cada dNTP e 0,02 U Taq DNA polimerase (Platinum™ Taq DNA polimerase, Invitrogen). A reação de amplificação foi realizada no Eppendorf Mastercycler®, Alemanha. As temperaturas do ciclo de amplificação foram: desnaturação inicial de 94°C, por 5 min.; 30 ciclos de desnaturação (94°C por 40 s), anelamento (55°C por 40 s), extensão (72°C por 1,5 min); e uma extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos de amplificação do gene 16S rDNA foram analisados em gel de agarose 1,5% (p/v), com tampão TAE e depois corado em brometo de etídeo (5 µg mL⁻¹), para confirmar a amplificação. O produto amplificado foi purificado utilizando o kit Mantage PCR Millipore, de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador 27F e o DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing Kit

(AmershamBioscience), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram então submetidas ao seqüenciamento no 3730xl sequencer. As seqüências obtidas foram comparadas às existentes no banco de dados GenBank para a possível identificação das espécies.

testemunha nitrogenada. O terceiro grupo foi formado pelas estirpes recomendadas como inoculantes para a cultura do caupi (UFLA 03-84, INPA03-11B e BR 3267) mais cinco isolados (UFLA 3-154, UFLA 3-162, 83C3, UFLA 3-165 e UFLA04-0885), cuja MSPA foi maior que a da testemunha sem nitrogênio, porém inferior aos isolados do segundo grupo. O quarto grupo foi formado pelas estirpes que não obtiveram efeito significativo em resposta à inoculação.

Quanto ao número de nódulos, observa-se que os sete isolados citados acima mais as estirpes referência apresentam valores superiores, juntamente com outros onze tratamentos. As testemunhas sem inoculação (com nitrogênio mineral e sem nitrogênio mineral) não apresentaram nódulos, indicando que não houve contaminação no experimento (Figura 2).

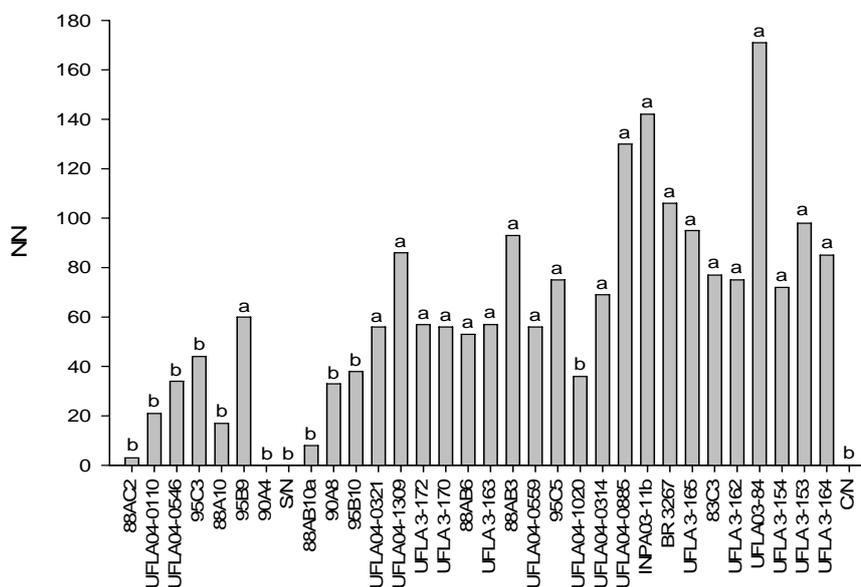


FIGURA 2 Número de nódulos dos tratamentos inoculados com diferentes estirpes no feijão caupi cv BR17-Gurgueia. Letras iguais indicam médias de um mesmo grupo pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Analisando a matéria seca de nódulos, verifica-se que dentre os sete isolados que se destacaram quanto a MSPA, somente os isolados UFLA 3-164 e UFLA 04-0885 não se encontraram no grupo dos maiores valores médios (Figura 3).

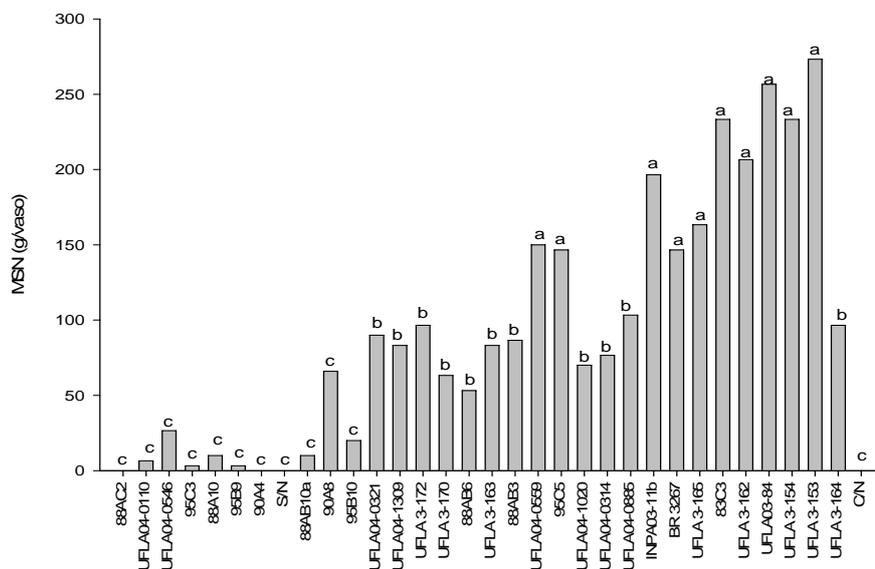


FIGURA 3 Matéria seca de nódulos dos tratamentos inoculados com diferentes estirpes no feijão caupi cv Br17-Gurgueia. Letras iguais indicam médias de um mesmo grupo pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação à matéria seca de raízes (MSR) não houve diferença significativa entre os tratamentos. A eficiência relativa mostrou que cinco isolados (UFLA 3-164, UFLA 3-153, UFLA 3-154, UFLA 3-162 e UFLA 3-165) obtiveram valores médios que não diferiram da testemunha que foi inoculado com a UFLA03-84, e das INPA03-11B e BR 3267, mas inferiores à testemunha que recebeu adubação nitrogenada (C/N) e superiores aos demais tratamentos (Figura 4).

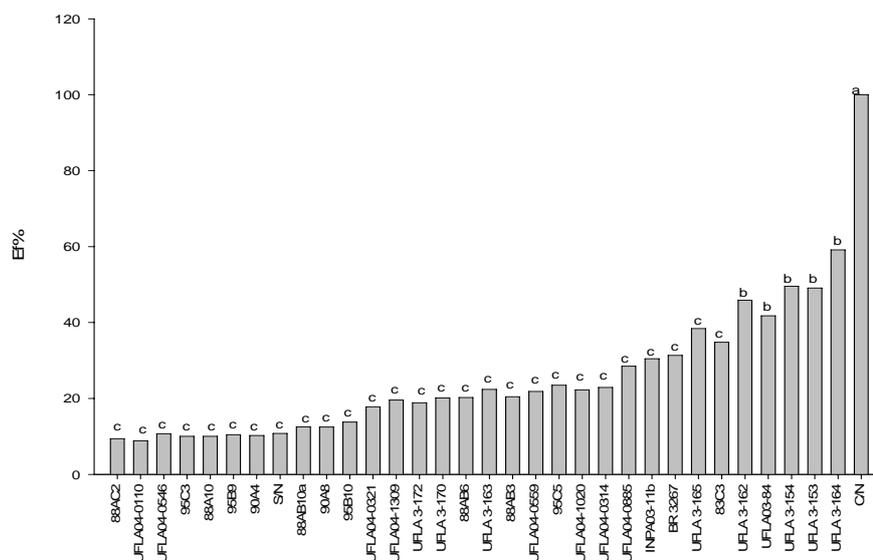


FIGURA 4 Eficiência relativa dos tratamentos inoculados com diferentes estirpes no feijão caupi cv BR17-Gurgueia. Letras iguais indicam médias de um mesmo grupo pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Analisando o acúmulo de nitrogênio na parte aérea, observa-se que os isolados UFLA 3-164 e UFLA 3-153 apresentaram resultados médios que não diferiram da testemunha que recebeu adubação nitrogenada, outros quatro tratamentos, os isolados UFLA 3-154, UFLA 3-162, 83C3 e UFLA 3-165 ficaram no mesmo grupo da testemunha inoculada com a estirpe UFLA 03-84 (Tabela 5).

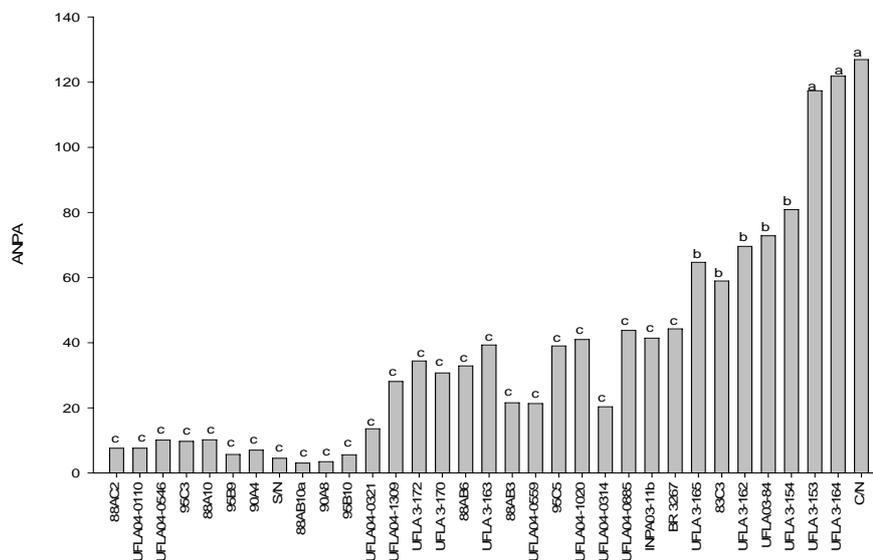


FIGURA 5 Acúmulo de nitrogênio na parte aérea dos tratamentos inoculados com diferentes estirpes do feijão caupi cv BR17-Gurgueia. Letras iguais indicam médias de um mesmo grupo pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

MSPA correlacionou-se positivamente com MSN ($r:0,42$; $p<0,01$), com Efr ($r:0,91$; $p>0,01$) e com acúmulo de N ($r:0,93$; $p<0,01$). Fernandes et al. (2003), também encontraram correlações positivas entre MSPA e MSN. Correlação positiva também foi encontrada entre MSN e acúmulo de N ($r:0,56$; $p<0,01$) corroborando com dados de Döbereiner et al. (1966), Fernandes & Fernandes (2000) e Lima et al. (2005).

Esses resultados obtidos sugerem que as estirpes isoladas de área de mineração de bauxita, a (UFLA 3-164, UFLA 3-153, UFLA 3-154, UFLA 3-165

e UFLA 3-162), a estirpe isolada de pastagem na Amazônia, a (83C3) e a estirpe (UFLA 04-0885) isolada de pastagem em Jí-Paraná, RO, apresentam valores médios satisfatórios de MSPA, podendo ser indicada a novos experimentos em busca de inoculantes mais eficientes em fixar nitrogênio quando em simbiose com a cultura do feijão caupi.

4.2 Experimentos 2 e 3

No experimento conduzido em casa de vegetação, em vasos com solo, as estirpes UFLA 3-164, UFLA 3-154 e UFLA 3-153 se destacaram em promover uma maior produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), com valores médios que não diferiram da testemunha que recebeu adubação nitrogenada e de uma estirpe referência recomendada como inoculante pelo MAPA, a INPA 03-11B. (Tabela 3).

Em relação ao número de nódulos, dentre as estirpes citadas, somente a estirpe UFLA 3-153 apresentou maiores valores médios, situando-se no mesmo grupo que a BR 3267. Já a estirpe UFLA 3-154 ficou em grupo inferior, mas não diferiu da estirpe INPA03-11B. (Tabela 3).

No que diz respeito à matéria seca de nódulos, não houve diferença significativa entre os tratamentos, exceto para a testemunha que recebeu adubação mineral com nitrogênio, a qual apresentou poucos nódulos e pequenos. Quanto à matéria seca de raízes, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 3).

Quanto à eficiência relativa, as estirpes UFLA 3-164, UFLA 3-154 e UFLA 3-153 apresentaram os maiores valores médios e situaram-se no mesmo grupo de INPA03-11B e da testemunha que recebeu adubação mineral (Tabela 3). Valores semelhantes foram encontrados por Lacerda et al. (2004), já que as estirpes por eles estudadas situaram-se no mesmo grupo que a INPA 03-11B.

O acúmulo de nitrogênio na parte aérea foi maior na testemunha que recebeu adubação nitrogenada, diferindo dos demais tratamentos (Tabela 3).

Deve ser mencionado ainda que neste experimento com solo, que a testemunha sem nitrogênio mineral e sem inoculação apresentou valores médios de MSPA, NN, EFr e ANPA que não diferiram das estirpes BR 3267 e UFLA 03-84 (Tabela 3).

TABELA 3 Valores médios de matéria seca da parte aérea (MSPA) (g vaso^{-1}), número de nódulos por vaso (NN), matéria seca de nódulos (MSN) (mg vaso^{-1}), matéria seca de raízes (MSR) (mg vaso^{-1}), Eficiência relativa (Efr %), Acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) (mg vaso^{-1}) do feijão caupi cv BR17-Gurgueia.

Tratamento	MSPA (g vaso^{-1})	NN	MSN (mg vaso^{-1})	MSR (mg vaso^{-1})	EF%	ANPA (mg vaso^{-1})
BR 3267	13,04 b	145,00 a	456,60 a	229,00 a	74,97 b	345,00 b
UFLA 03-84	13,23 b	94,00 b	560,00 a	249,00 a	76,26 b	375,00 b
UFLA 3-165	13,27 b	97,00 b	453,30 a	255,00 a	76,65 b	306,37 b
S/N	14,06 b	38,00 c	416,60 a	260,00 a	81,09 b	330,00 b
UFLA04-0885	14,33 b	72,00 b	553,30 a	248,00 a	82,85 b	292,90 b
83C3	14,36 b	119,00 b	463,00 a	237,00 a	83,00 b	195,20 b
UFLA 3-162	14,65 b	90,00 b	546,00 a	250,00 a	84,47 b	341,00 b
UFLA 3-153	15,38 a	210,00 a	533,00 a	252,00 a	88,26 a	186,00 b

...Continua...

TABELA 3 Cont.

Tratamento	MSPA (g vaso ⁻¹)	NN	MSN (mg vaso ⁻¹)	MSR (mg vaso ⁻¹)	EF%	ANPA (mg vaso ⁻¹)
UFLA 3-154	15,80 a	49,00 c	336,60 a	236,00 a	91,10 a	316,00 b
UFLA 3-164	16,39 a	120,00 b	536,60 a	279,00 a	94,39 a	313,38 b
INPA03-11B	16,55 a	102,00 b	533,00 a	302,00 a	95,13 a	469,00 b
C/N	17,43 a	6,00 d	0,00 b	229,00 a	100,00 a	719,40 a
CV%	7,01	34,37	32,56	10,41	10,77	23,38

TABELA 3 Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Valores semelhantes aos da testemunha que não recebeu inoculação e adubação mineral podem ser explicados pela população de rizóbios nativos no solo que no presente trabalho se mostrou alta e eficiente, com valores que variaram de 2×10^5 a 4×10^6 UFC por grama de solo. Esses valores podem ser encontrados em solos, uma vez que a população nativa de rizóbios pode ser de 10^7 UFC por grama de solo (Hirsch, 1996). Martins et al. (2003) encontraram valores de 10^4 UFC por grama de solo após segundo ano de inoculação de rizóbios na cultura do caupi.

Pode se observar na Tabela 4 que até à diluição 10^{-3} , a produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) foi semelhante à da testemunha que recebeu adubação nitrogenada. Em todas as repetições, exceto para as testemunhas com nitrogênio mineral e sem nitrogênio mineral, houve nódulos, indicando alta densidade de rizóbios no solo e mostrando que não houve contaminação do experimento.

TABELA 4 Valores médios de matéria seca da parte aérea (MSPA) (g vaso^{-1}), número de nódulos por vaso (NN), matéria seca de nódulos (MSN) (mg vaso^{-1}), matéria seca de raízes (MSR) (mg vaso^{-1}).

Tratamentos	MSPA (mg vaso^{-1})	NN	MSN (mg vaso^{-1})
S/N	163,00 b	0 c	0,00 c
Diluição 10^{-6}	290,00 b	31,00 b	20,00 c
Diluição 10^{-5}	443,00 b	32,00 b	26,00 c
Diluição 10^{-4}	570,00 b	44,00 b	73,33 b
Diluição 10^{-3}	966,00 a	47,00 b	83,33 b
C/N	1393,00 a	0 c	0,00 c
Diluição 10^{-2}	1396,00 a	92,00 a	73,33 b
Diluição 10^{-1}	1720,00 a	98,00 a	140,00 a
CV (%)	39,31	49,50	56,52

TABELA 4 Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para se obter evidências de que foram as estirpes inoculadas no experimento em vasos com solo que promoveram a maior produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) das estirpes UFLA 3-153, UFLA 3-154, UFLA 3-164 e INPA03-11B, uma comparação entre os padrões de infecção das raízes pelas bactérias foi observado, como mostra as Figuras 6 a 9. A Figura 6 mostra as raízes da testemunha que recebeu adubação mineral e não apresentou nódulos, sendo esta uma forma de inibição de nodulação por rizóbios nativos.



FIGURA 6 Raízes de plantas que não foram inoculadas e receberam adubação nitrogenada.

A Figura 7 mostra o padrão de nodulação da testemunha que não recebeu adubação mineral e não foi inoculada. Observa-se que as infecções pelas bactérias nativas do solo foram dispersas por todo o sistema radicular, diferindo das testemunhas que foram inoculadas com as estirpes citadas acima, que apresentaram padrão de infecção na base do coleto das raízes, como mostra as Figuras 8 e 9.



FIGURA 7 Raízes de plantas que não foram inoculadas e não receberam adubação nitrogenada.



FIGURAS 8 e 9 Raízes de plantas que foram inoculadas e não receberam adubação nitrogenada

Não houve diferenças significativas entre os nos tratamentos em relação a número de vagens, número de grãos, peso de grãos e acúmulo de nitrogênio nos grãos (Tabela 5).

TABELA 5 Valores médios de número de vagens, número de sementes, peso de sementes e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) (mg vaso⁻¹) do feijão caupi cv BR17-Gurgueia.

Tratamento	Número de vagens	Número de sementes	Peso de sementes (g) (13%)	ANPA (mg/vaso)
83C3	6,0 a	96,0a	7,60 a	3,80 a
S/N	7,0 a	96,0 a	7,55 a	3,78 a
38C6	7,0 a	87,0 a	6,93 a	3,46 a
ST8-85	7,0 a	97,0 a	7,77 a	3,88 a
48C5	7,0 a	101,0 a	7,19 a	3,60 a
C/N	8,0 a	94,0 a	9,13 a	4,57 a
INPA 03-11B	8,0 a	105,0 a	7,50 a	3,75 a
47C8	8,0 a	107,0 a	7,53 a	3,77 a
UFLA 03-84	8,0 a	103,0 a	7,16 a	3,58 a
42C8	8,0 a	114,0 a	8,51 a	4,26 a
46C5	8,0 a	101,0 a	6,83 a	3,42 a
BR 3267	9,0 a	106,0 a	7,69 a	3,84 a
CV%	14,05	11,92	12,50	12,50

TABELA 5 Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Lacerda et al. (2004), também não encontram diferenças no rendimento de grãos entre os isolados testados em campo, em comparação à testemunha nitrogenada sem inoculação, mostrando alta eficiência entre os rizóbios nativos. Somente a testemunha sem nitrogênio e sem inoculação mostrou-se inferior aos demais, mas com valores bem próximos, decaindo 28% em relação à testemunha nitrogenada. Este resultado é corroborado pelos de Nascimento et al. (2008), que mostraram alta eficiência entre os rizóbios nativos quando comparados à testemunha que recebeu adubação mineral com nitrogênio.

4.3 Amplificação e seqüenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal

Todos os isolados foram submetidos ao seqüenciamento do gene 16S rDNA e seqüências mais similares dos 15 deles foram comparadas no GenBank (Tabela 6).

Dos 15 isolados utilizados nos experimentos, cinco apresentaram similaridade com o gênero *Bradyrhizobium*. Destes, os isolados UFLA 3-163 e UFLA 3-162 e UFLA 3-164 apresentam 99 a 100% similaridade com a espécie *Bradyrhizobium elkanii*. Os isolados 83C3 e UFLA04-0321 apresentaram 100% similaridade com *Bradyrhizobium japonicum*. O isolado UFLA 3-172 apresentou-se com 99% de similaridade a *Bradyrhizobium sp.* Dos isolados citados acima, os que apresentaram similaridade com *Bradyrhizobium elkanii* foram isolados em áreas de mineração de bauxita. O isolado 83C3 é proveniente de pastagem da Amazônia e o isolado UFLA04-0321 de capoeira também da Amazônia; Hungria et al. (2003), caracterizando isolados dos tabuleiros costeiros de Sergipe a partir de caupi também encontraram bactérias do gênero *Bradyrhizobium* após análise do gene 16S rDNA.

Outros seis isolados apresentaram similaridade com o gênero *Burkholderia*. Destes, os isolados UFLA 3-154, 88A10, UFLA04-1309,

UFLA04-0110 e UFLA04-0546, apresentaram similaridade com a estirpe *Burkholderia sp.* LMG 16307 e o isolado 95C3 com a estirpe *Burkholderia cepacia* strain M45, todos com 100% de similaridade. Os isolados 90A8 e 95B10 com 99% de similaridade, foram semelhantes ao gênero *Pseudomonas*, sendo o isolado 90A8 similar a estirpe *Pseudomonas luteola* strain FR2_MS17c e o isolado 95B10 similar a *Pseudomonas fluorescens* strain EvS4-B1.

O isolado 95C5, com 99% de similaridade foi semelhante à estirpe *Enterobacter aerogenes* strain HC050612-1. Resultados apresentando alta diversidade de isolados obtidos da região Amazônica também foram encontrados por Neves (2007), e em áreas recuperadas após mineração de bauxita, por Melloni et al. (2006).

Outras duas estirpes, a 88AB3 e a 88AB10A, já se conhecia as seqüências do trabalho realizado por Neves (2007).

Foi observado que o seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA é uma técnica que melhor descreve a identificação da bactéria. Motta (2002), por características culturais, descreve suas estirpes como *Bradyrhizobium*, mas através do seqüenciamento uma espécie diferente foi encontrada.

TABELA 6 Sequência mais similar encontrada no GenBank em relação a sequência parcial do gene 16S rDNA de cada isolado.

Isolado	Score(Bits)	Identificação mais provável no GenBank		
		Espécie	Acesso	Similaridade
UFLA 3-172	439	<i>Bradyrhizobium</i> <i>sp.</i>	gb FJ193703.1	100
UFLA 3-154	737	<i>Burkholderia</i> <i>sp.</i> LMG 16307	gb AF215706.1	100
UFLA 3-163	671	<i>Bradyrhizobium</i> <i>elkanii</i> strain SEMIA 6397	gb FJ025139.1	99
UFLA 3-162	637	<i>Bradyrhizobium</i> <i>elkanii</i> strain SEMIA 6397	gb FJ025139.1	100
UFLA 3-164	723	<i>Bradyrhizobium</i> <i>elkanii</i> strain SEMIA 6397	gb FJ025139.1	99
83C3	536	<i>Bradyrhizobium</i> <i>japonicum</i> strain SEMIA 6439	gb FJ025098.1	100
88A10	781	<i>Burkholderia</i> <i>sp.</i> LMG 16307	AF215706.1	100
90A8	125	<i>Pseudomonas</i> <i>luteola</i> strain FR2_MS17c	gb EU888581.1	99
95B10	188	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> strain EvS4-B1	gb FJ226759.1	99
95C5	820	<i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> strain HC050612-1	gb EU047701.1	99
88AB3	858	<i>Pantoea</i> <i>agglomerans</i> strain XW123	AY941838	99%

...Cont...

TABELA 6 Cont.

Isolado	Score(Bits)	Identificação mais provável no GenBank		
		Espécie	Acesso	Similaridade
88AB10A	823	<i>Burkholderia</i> <i>sp.</i>	<u>DQ777739</u>	98%
UFLA04-1309	815	<i>Burkholderia</i> <i>sp.</i> LMG 16307	<u>gb AF215706.1</u>	99
UFLA04-0110	797	<i>Burkholderia</i> <i>sp.</i> LMG 16307	<u>gb AF215706.1 </u>	100
UFLA04-0321	120	<i>Bradyrhizobium</i> <i>japonicum</i> strain SEMIA 6154	<u>gb FJ025100.1</u>	100
UFLA04-0546	731	<i>Burkholderia</i> <i>sp.</i> LMG 16307	<u>gb AF215706.1</u>	100

5 CONCLUSÕES

As estirpes UFLA3-164, UFLA3-153 e UFLA3-154 apresentaram alto desempenho em fixar nitrogênio com a cultura do caupi, podendo ser indicadas para experimentos de campo.

O solo utilizado no experimento apresenta alta densidade de rizóbios nativos, existindo entre eles isolados com potencial de fixar nitrogênio em associação com a cultura do caupi.

Isolados obtidos de área de mineração de bauxita destacaram-se em promover uma maior produção de matéria seca da parte aérea (MSPA).

Bactérias do gênero *Burkholderia* também podem apresentar alta eficiência em fixar nitrogênio com a cultura do caupi.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONETTI, R.; OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, F. M. M. População de *Rhizobium* spp. e ocorrência de micorriza VA em cultivos de essências florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 139-139, 1984. Edição especial.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 38, n. 4, p. 392-397, 1988.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; LINDSTROM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, n. 2, p. 369-382, 1998.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B.; PENTEADO, A. F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do N total das plantas sobre o peso de nódulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 233-237, 1966.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA MEIO-NORTE. **Cultivo de feijão caupi**. Jul. 2003. Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/graos/FeijaoCaupi/referencias.htm>>. Acesso em: 08 mar. 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 72 p.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. M. P.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p. 911-920, ago. 2003.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 321-327, abr./jun. 2000.

FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Berlin, v. 7, p. 332-346, 1889.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 143 p.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região Nordeste. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas no Nordeste brasileiro: versão 1.0**. Petrolina. 1999. Disponível em: <HTTP://www.cpatsa.embrapa.br>. Acesso em: 10 nov. 1999.

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

FROTA, K. de M. G.; SOARES, R. A. M.; AREÂS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 470-476, abr./jun. 2008.

HIRSCH, A. L. M. modified rhizobia in the field. **The New Phytologist**, Harpenden, v. 133, n. 1, p. 159-171, 1996.

HUNGRIA, M.; FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do gundu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p. 911-920, ago. 2003.

INSTITUTO FERRAZ NENÊ PEREIRA CONSULTORIA E COMÉRCIO. **Agrianual 2004**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2004. 496 p.

JARVIS, B. D. W.; BERKUN, P. van; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n.3, p. 895-898, 1997.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

- JORDAN, D. C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. D. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Williams and Wilkins, 1984. p. 234-244.
- LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.
- LEITE, M. L.; RODRIGUES, J. D.; MISCHAM, M. M.; VIRGENS FILHO, J. S. Efeitos do déficit hídrico sobre a cultura do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv. EMAPA-821: II. análise de crescimento. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 74, n. 3. p. 351-370, 1999.
- 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.
- MAGALHÃES, F. M. M.; MAGALHÃES, L. S. M.; OLIVEIRA, L. A.; DOBEREINER, J. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme nativas da região de Manaus, AM. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 3, p. 509-514, 1982.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1989. 201 p.
- MARTINELLI, L. A. Os caminhos do nitrogênio – do fertilizante ao poluente. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 118, p. 6-10, jun. 2007.
- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003.
- MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. 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**, Viçosa, n. 30, p. 235-246, 2006.

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

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 16, n. 1, p. 135-146, 1993.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, M. F.; FARIA, S. M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brasil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 121, n. 4, p. 563-570, Aug. 1992.

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

MOTTA, J. S. **Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de Bradyrhizobium sp. isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas**. 2002. 43 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BULVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the subclass of proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 6850, p. 948-950, 2001.

MPEPEREKI, S.; WOLLUM, A. G.; MAKONESE, F. Diversity in symbiotic specificity of cowpea indigenes to Zimbabwean soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 186, n. 1, p. 167-171, 1996.

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

NEVES, A. A. de O. **Eficiência e diversidade de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob floresta secundária e pastagem na amazônia ocidental**. 2007. 92 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NÓBREGA, R. S. A. **Efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo, ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**. 2006. 188 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. L. de; MEDEIROS, R. D. de; MOREIRA, M. A. B. **A cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) no Estado de Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2000. 2 p. (Embrapa Roraima. Embrapa Informa, 01).

PEREIRA, E. G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia**. 2000. 93 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-Caupi, avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA, 2005. p. 281-335.

SANTOS, C. A. F.; ARAÚJO, F. P.; MENEZES, E. A. Comportamento produtivo do caupi em regime irrigado e de sequeiro em Petrolina e Juazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 2229-2234, 2000.

SILVA, V. N. da; SILVA, L. E. de S. F.; FIQUEIREDO, M. da V. B. Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 95-99, 2006.

SILVA, V. N. da; SILVA, L. E. de S. F. da; FIQUEIREDO, M. do V. B.; CARVALHO, F. G. de; SILVA, M. L. R. B. da; SILVA, A. J. N. do. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 37, n. 1, p. 16-921, 2007.

SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B.; NAKAO, P. L. Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: myths and realities. In: LAL, R.; SANCHEZ, P. A. (Ed.). **Myths and science on soils on the tropics**. Madison: Soil Science Society of America/American Society of Agronomy, 1992. p. 135-155.

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

VIEIRA, R. F. **Comparações de feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* com feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1989. 213 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VINCENT, J. M. A. **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. London: IBP Handbook, 1970. 164 p.

WOOMER, A. N.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1112-1116, July 1988.

ZILLI, J. É. **Pesquisa indica tecnologia para aumentar produtividade de feijão caupi em Roraima**. Roraima: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2008. Disponível em:
<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2006/novembro/foldernoticia.2006-11-27.3423947695/noticia.2006-11-27.3637513237/>>. Acesso em: 09 jul. 2008.

ZILLI, J. É.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.