

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS E EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EM FEIJÃO-CAUPI NO
CERRADO, GURUPI-TO**

WAGNER RAHMEIER

**GURUPI
TOCANTINS-BRASIL
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

WAGNER RAHMEIER

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS E EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EM FEIJÃO-CAUPI NO
CERRADO, GURUPI-TO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Produção Vegetal da Fundação Universidade Federal do
Tocantins em 30 de Julho de 2009, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Produção Vegetal - Área de Concentração em
Microbiologia do Solo

**GURUPI
TOCANTINS-BRASIL
2009**

Trabalho realizado junto ao Mestrado em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins, sob a orientação do Profº Dsc Rodrigo Ribeiro Fidelis, com apoio financeiro do CNPQ – Universal / CAPES - PNPd

Banca examinadora:

Profº Dsc Rodrigo Ribeiro Fidelis
Professor da Universidade Federal do Tocantins
(Orientador)

Profº Dsc Aloísio Freitas Chagas Júnior
Professor da Universidade Federal do Tocantins
(Avaliador)

Profº Dr Gil Rodrigues dos Santos
Professor da Universidade Federal do Tocantins
(Avaliador)

Profº Dsc Hayda Maria Alves Guimarães
Professor da Universidade Federal do Tocantins
(Avaliador)

A Deus,

Aos meus pais Neri e Mirtes, minha irmã Laura por terem sempre acreditado nos meus objetivos. Sem o apoio e o carinho de vocês eu não estaria aqui.

A minha esposa Eliane por incentivar e acreditar em mim nesta hora.

Ao meu orientador Rodrigo Ribeiro Fidelis e co-orientador Aloísio Freitas Chagas Junior cujas qualidades profissionais e humanas, serão eternamente fonte de inspiração.

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A Fundação Universidade Federal do Tocantins, em especial ao Campus Universitário de Gurupi, pela oportunidade de realização deste Curso.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores da banca examinadora pela participação e sugestões.

A todos os professores do programa, pelos ensinamentos e amizade.

Aos colegas e amigos de curso Eliane Iara, Helizângela, Iane, Tarliane, Fernando, Stefane, Manoel e Tomas, pelo aprendizado e prazeroso convívio.

A toda minha família que sempre me apoiaram e torceram para que eu tivesse sucesso.

A todas as pessoas que me incentivaram e auxiliaram para a realização deste trabalho, principalmente a Deus que me deu força para não desistir.

OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

RESUMO DA DISSERTAÇÃO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. GERAL	5
2.2. ESPECÍFICO	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. O NITROGÊNIO NO SISTEMA SOLO-PLANTA	6
3.2. POTENCIAL DE NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO PELA SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSA	7
3.3. Solubilização de fosfatos	9
3.4. A CULTURA DO FEIJÃO CAUPI	10
3.4.1. DISTRIBUIÇÃO	10
3.4.2. CARACTERIZAÇÃO	11
3.4.3. AS CULTIVARES DE FEIJÃO CAUPI	12
3.4.4. A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM CAUPI	13
3.4.3. INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO: ESTIRPES RECOMENDADAS OU NATIVAS	14
4. TRABALHOS CIENTÍFICOS	16
4.1. CAPÍTULO I - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE RIZÓBIOS QUE NODULAM FEIJÃO CAUPI (<i>VIGNA UNGUICULATA</i> L. WALP.) NO CERRADO DO TOCANTINS	17
4.1.1. INTRODUÇÃO	19
4.1.2. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1.4. CONCLUSÕES	38
4.2. CAPÍTULO II - CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO E ALUMÍNIO DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DO TOCANTINS	39
4.2.1. INTRODUÇÃO	41
4.2.2. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.2.4. CONCLUSÕES	48
4.3. CAPÍTULO III - EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO INOCULADAS EM FEIJÃO-CAUPI NO CERRADO, GURUPI-TO	49
4.3.1. INTRODUÇÃO	51
4.3.2. MATERIA E MÉTODOS	52

4.3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.3.4. CONCLUSÕES	58
5. BIBLIOGRAFIAS CITADAS	59

LISTA DE TABELAS

4.1.CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Potencial hidrogeniônico, grau de acidez, teores de fósforo e de bases trocáveis de solos coletados em áreas com diferentes formas de uso da terra no Estado do Tocantins. 23
- Tabela 2.** Características químicas do solo, capacidade de troca de cátions e outras propriedades químicas de solos coletados em áreas com diferentes formas de uso da terra, do estado do Tocantins. 24
- Tabela 3.** Local e amostras de solos coletadas em diferentes formas de uso do solo em municípios no Estado do Tocantins, utilizadas como fonte de inóculos de rizóbio e isolados obtidos de plantas de feijão caupi. 29
- Tabela 4.** Características morfo-fisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos de diferentes regiões na Amazônia. 31
- Tabela 5.** Grupos dos isolados de rizóbio associados a feijão caupi de acordo com a caracterização morfofisiológica. 33
- Tabela 6.** Caracterização morfológica de isolados de rizóbio de caupi obtidos de solos no Cerrado do Tocantins. 34

4.2.CAPÍTULO II

- Tabela 1:** Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dos isolados de rizóbio. 47
- Tabela 2:** Capacidade de solubilização de fosfato de alumínio dos isolados de rizóbio. 47

4.3.CAPÍTULO III

- Tabela 1:** Biomassa, nodulação e produtividade de feijão caupi Cultivar Nova Era, Pujante e Trepá Pau, inoculado com estirpes de rizóbio. Experimentos 1, 2 e 3.(1) 56

LISTA DE FIGURAS

4.1.CAPÍTULO I

- Figura 1.** Dendrograma das características morfo-fisiológicas dos isolados de rizóbio estudados. Os rizóbios foram agrupados com base no coeficiente Simple Matching, utilizando-se o programa NTSYSpc (KCS, 2009). 32

4.2.CAPÍTULO II

- Figura 1.** Distribuição das colônias nas placas de Petri para verificação do halo de solubilização como indicativo de solubilização de fosfatos de cálcio e/ou de alumínio. 44

4.3.CAPÍTULO III

- Figura 1.** Eficiência Relativa de feijão caupi Cultivar Nova Era, Pujante e Vinagre, dos tratamentos inoculados com estirpes de rizóbios e testemunha, em relação ao tratamento adubado com nitrogênio (uréia). Experimentos 1, 2 e 3. 57

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS E EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EM FEIJÃO-CAUPI NO CERRADO, GURUPI-TO

RESUMO

Considerando as características nutricionais e de rusticidade, o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.Walp.) tornou-se importante fonte de proteína em várias regiões do país. Esta cultura se beneficia da fixação biológica do nitrogênio e pode receber parte do nitrogênio necessário para a cultura via simbiose, o que reduz os custos de produção. Visando aumentar a contribuição de bactérias fixadoras de nitrogênio na nutrição e desenvolvimento de culturas como o feijão caupi, é necessário desenvolver pesquisas sobre a biodiversidade microbiológica de solos no cerrado e seleção de estirpes mais eficientes quanto à fixação do N₂. Dados morfológicos e fisiológicos de bactérias fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento, assim como a eficiência simbiótica. Este trabalho teve como objetivos realizar a caracterização morfológica de isolados de rizóbio oriundos de solos do cerrado no Tocantins e avaliar em laboratório a capacidade destes isolados em solubilizar fosfato de cálcio (P-Ca) e alumínio (P-Al), assim como a capacidade de estirpes-referência, recomendadas para a cultura do caupi, em induzirem nodulação e fixarem nitrogênio sob as condições de acidez e baixa fertilidade dos solos regionais em condições de campo. A caracterização fenotípica dos 121 isolados, obtidos de nódulos de raízes de feijão caupi utilizada como planta isca, mostraram uma grande diversidade. O estudo das características fisiológicas e morfológicas revela uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizóbio. Quanto à capacidade de solubilização de fosfatos, dos 80 isolados testados, oito solubilizaram P-Ca e apenas um P-Al. Esses resultados de laboratório indicam a baixa capacidade de solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio de rizóbios isolados de solos do cerrado. Quanto à inoculação de estirpes-referência de rizóbio inoculadas em três variedades de feijão caupi, observou-se produção de matéria seca, número e massa seca dos nódulos e produtividade superiores ao tratamento testemunha e similares ao tratamento adubado para os tratamentos com inoculação da estirpe-referência BR 3302 (UFLA 3-84).

Palavras-chave: Fixação biológica do nitrogênio, Nodulação, *Vigna unguiculata*, .

CHARACTERIZATION OF ISOLATED AND OF EFFICIENCY IN RHIZOBIUM STRAINS OF COWPEA IN CERRADO, GURUPI-TO

ABSTRACT

As a result of its nutritional and rustic characteristics, cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) has become an important source protein in the various regions of Brazil. Cowpea may benefit from biological nitrogen fixation and can receive part of the nitrogen needed for culture from symbiosis, which reduces the cost of production. To increase the biological nitrogen fixation contribution to cowpea nutrition and development is necessary to develop researches to investigation on microbiological biodiversity in the cerrado soils and selecting more efficient nitrogen fixation strains. Data morphologic and physiological provide important information regarding its identification and clusters as the symbiotic. This research work had as objectives, to accomplish morphologic characterization of rhizobia isolated from cerrado in Tocantins soils and evaluate in the laboratory the capacity destes isolados to solubilize calcium (P-Ca) and aluminum (P-Al) phosphates, and the ability of the reference strains recommended for the cultivation of cowpea to induce nodulation and to fix nitrogen under the acidity and low fertility conditions of the regional soils in the field experiment. With relationship to the phenotypic characterization, the 121 isolates, obtained from nodules of cowpea, used as trap plant, showed a great diversity. The study of the physiological and morphologic characteristics it discloses a sufficiently ample diversity of isolated of rhizobia. The ability of phosphate solubilization, from the 80 isolates, eight solubilized P-Ca and one P-Al. These laboratory results indicate the low capacity of solubilization of calcium phosphate and aluminum rhizobia isolated from soils of the cerrado. The inoculation of reference strains of rhizobia-inoculated in three varieties of cowpea, it was observed production of dry matter, nodule number and mass and higher productivity to the control treatment and similar to the fertilized treatment for treatments with inoculation of strain-reference BR 3302 (UFLA 3-84).

Key-Word: Biological fixation nitrogen, Nodulation, *Vigna unguiculata*.

1. INTRODUÇÃO

A interação entre leguminosas e rizóbio é um exemplo de associação biológica intensamente estudada, cujos benefícios para a sustentabilidade agrícola são reconhecidos devido ao processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), refletindo no aumento da produtividade vegetal, na recuperação de áreas degradadas, no incremento da fertilidade e da matéria orgânica do solo. Entretanto, sua principal aplicabilidade, a curto prazo, está associada à economia no uso de fertilizantes nitrogenados industrializados, através da otimização da FBN com a inoculação de estirpes selecionadas de rizóbio. Assim, a maximização das contribuições da FBN nos agroecossistemas tornou-se, então, parte dos esforços de pesquisas visando à sustentabilidade das produções agrícolas.

Além dos fatores intrínsecos da associação simbiótica, o processo da FBN é influenciado pelas características edafo-climáticas, refletindo nas diferentes respostas em relação à sobrevivência, competitividade, faixa hospedeira, especificidade e eficiência simbiótica das estirpes usadas nos programas de inoculação de sementes (Moreira & Siqueira, 2002). Por estas razões, o levantamento contínuo deste grupo de bactérias em culturas estratégicas como o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), deve sempre ser considerado visando à seleção de associações mais eficientes e adaptáveis a situações específicas visando à recomendação para fins biotecnológicos, ampliando a contribuição da FBN nos sistemas agrícolas. O levantamento da biodiversidade nativa (bioprospecção) de rizóbios de regiões de clima tropical, capazes de nodular espécies de importância agrícola e adaptadas a determinadas regiões, têm demonstrado grande potencial para obtenção de bactérias resistentes a estresses ambientais (tolerância a temperaturas elevadas, a estresses hídricos, pH extremo, dentre outros) (Martins *et al.*, 2003; Stanford *et al.*, 2005; Hara & Oliveira, 2005; Lima *et al.*, 2005; Chagas Jr, 2007; Zilli *et al.*, 2008).

Para a seleção e caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio, várias técnicas têm sido utilizadas, as quais levam em consideração tanto características fenotípicas como genotípicas. A identificação e a caracterização de estirpes de rizóbio têm sido feitas, tradicionalmente, baseadas nos resultados de especificidade por hospedeiro e as características morfológicas e fisiológicas (Martins *et al.*, 1997a,b; Zilli *et al.*, 2000). Além destas, outras características utilizadas é a produção de exopolissacarídeos, tolerância à acidez e alumínio

tóxico (Campo & Wood, 2001; Andrade *et al.*, 2002), bem como, capacidade de solubilizar fosfatos (Iguar *et al.*, 2001; Gynaneshwar *et al.*, 2002; Nahas, 2002; Vessey, 2003). Estas características foram utilizadas com sucesso no estudo da ecologia de rizóbios (Martins *et al.*, 1997b; Hara & Oliveira, 2004,2005; Chagas Jr., 2007), permitindo acessar a diversidade de rizóbio presentes em diferentes ecossistemas e usos da terra (Lima *et al.*, 2005; Jesus *et al.*, 2005).

A cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculat* [L.] Walp) tem relevante importância econômica no Norte e Nordeste brasileiro, por ser uma das principais culturas de subsistência e base alimentar, sobretudo para a população rural de baixa renda da região (Freire Filho *et al.*, 2005). Essa leguminosa apresenta rusticidade, tolerância às adversidades para se desenvolver em ambientes desfavoráveis e capacidade de interagir com microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico, estabelecendo simbiose. Entretanto, ainda se constata baixa produtividade do caupi plantado nessas regiões e ausência do uso de inoculantes nas sementes. Por ter a capacidade de ser nodulado por uma ampla faixa de rizóbios, o caupi pode ser usado como planta-isca em estudos sobre a população de bactérias presentes nos solos, a fim de se obterem dados sobre sua efetividade na nodulação, competitividade na fixação biológica do nitrogênio e até selecionar isolados com características interessantes e possam conferir aumento na produtividade sem elevar os custos com adubação nitrogenada. Essa interação via utilização de inoculantes, também pode permitir acréscimo de rendimento da cultura para a substituição, total ou parcial, dos adubos nitrogenados, desde que supra a cultura com N necessário para o seu crescimento e desenvolvimento, além de diminuir os custos de produção e economizar combustíveis fósseis utilizados para a fabricação de fertilizantes nitrogenados (Soares *et al.*, 2006).

O cultivo e a produtividade de culturas, em especial o feijão caupi, na região do Cerrado no Tocantins são limitados devido a fatores químicos do solo, como a baixa fertilidade e elevada concentração de alumínio tóxico para as plantas. Porém, esta região apresenta, ainda, um grande potencial para a seleção de estirpes importantes para a FBN, mais eficientes e competitivas visando a produção de inoculantes, para melhorar a produção/produtividade da cultura do feijão caupi no Estado.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Selecionar isolados de rizóbio quanto às características agronômicas e ecológicas em condições de laboratório.

Avaliar as características agronômicas de feijão caupi inoculadas com estirpes-refência de ríobio em condições de campo.

2.2. Específicos

- Isolamento de rizóbios oriundos de amostras de solos coletadas em diversas regiões no Cerrado.

- Caracterizar fenotipicamente os isolados de rizóbio obtidos.

- Avaliar a capacidade dos rizóbios em solubilizar fosfatos de cálcio e alumínio.

- Avaliar a eficiência simbiótica de estirpes-referência de rizóbio inoculados em feijão caupi sob condições de campo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O nitrogênio no sistema solo-planta

O nitrogênio é um dos principais constituintes das biomoléculas, essencial à sobrevivência e crescimento dos organismos vivos (Newton, 2000).

De maneira geral, todos os compostos nitrogenados encontrados na natureza estão de algum modo interligados e encontram-se em equilíbrio dinâmico entre formas livres e fixadas, fluindo dentro e fora do sistema solo-planta-atmosfera. O nitrogênio do solo é oriundo da fixação do N_2 atmosférico, quer seja por processos biológicos, industrial ou eletroquímico. O balanço de entrada (fixação) e saída (colheita, erosão e desnitrificação) desse nutriente no solo, que constitui o ciclo biogeoquímico do nitrogênio, deve se manter equilibrado para não afetar a sobrevivência dos demais organismos vivos existentes.

Formas orgânicas de nitrogênio são abundantes nos solos, entretanto indisponíveis às plantas. Uma vez que as reservas minerais desse elemento são relativamente raras (Newton, 2000), tornam-se muito importantes os microrganismos responsáveis por carrear o nitrogênio para dentro da cadeia alimentar, através dos processos de transformação do N nos solos. Na maioria dos solos agrícolas existe uma conversão contínua de nitrogênio orgânico a nitrato, durante a decomposição da matéria orgânica. Como as plantas podem incorporar o nitrogênio a partir da absorção de nitratos, os fertilizantes nitrogenados viabilizam a nutrição vegetal, disponibilizando este nutriente no solo. Entretanto, a assimilação dos compostos nitrogenados disponíveis deve ser rápida, para que não ocorra poluição ambiental, em decorrência da lixiviação dos nitratos para o lençol freática, atingindo os rios e lagos e trazendo consequência aos animais e ao homem, já que o nitrato é tóxico em concentrações relativamente baixas (Aita, *et al.*, 2007).

A reação de redução de nitrogênio atmosférico a amônia – fixação do nitrogênio – requer uma energia de ativação extremamente alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. A principal finalidade da amônia produzida é a fabricação de fertilizantes e mais de 100 milhões de toneladas são anualmente usados na agricultura. Tal demanda implica em grandes custos financeiros, energéticos e, sobretudo, ambientais (Newton, 2000).

Dos nutrientes minerais o nitrogênio é o mais caro, o que consome mais energia e potencialmente o mais poluente, sendo geralmente o mais limitante à produção vegetal (Franco & Baliero, 1999). No entanto, a incorporação do N atmosférico por alguns microrganismos, os diazotróficos, ao sistema solo-planta-atmosfera, já era conhecido desde o início do século XX e muitos investimentos já foram efetuados visando entender e maximizar a contribuição da fixação biológica do nitrogênio para a produção de alimentos. Apesar disso, para atender ao aumento da produção de alimentos no mundo, tem sido enfatizado o uso de adubos nitrogenados. O Brasil é a grande exceção desse cenário, pois é onde se usa menos nitrogênio mineral em relação aos demais nutrientes, assumindo uma postura importante, na busca de novas alternativas de produção, mais adequadas às condições tropicais (Franco & Baliero, 1999; Aita, *et al.*, 2007).

3.2. Potencial de nodulação e fixação de nitrogênio atmosférico pela simbiose rizóbio-leguminosa

Apesar de termodinamicamente favorável, a reação de redução de nitrogênio atmosférico a amônia (fixação biológica do nitrogênio) requer uma energia de ativação extremamente alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. Na indústria, por exemplo, o processo de fixação do nitrogênio, como o desenvolvido por Haber-Bosch para a síntese de amônia emprega altas temperaturas (superior a 300 °C) e pressões acima de 800 atm, sendo utilizados catalisadores a base de ferro (Kim & Rees, 1994). A principal finalidade da amônia produzida é a fabricação de fertilizantes, e mais de 100 milhões de toneladas são anualmente usados na agricultura, apresentando uma demanda que implica grandes custos financeiros, energéticos e, sobretudo, ambientais (Newton, 2000). Na natureza, somente um pequeno número de microrganismos, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, é capaz de reduzir nitrogênio atmosférico à amônia. Esse processo, chamado de fixação biológica do nitrogênio (FBN), é realizado pela enzima nitrogenase, um complexo protéico que catalisa a reação (Eady & Postgate, 1974). A participação da FBN no ciclo biogeoquímico do nitrogênio é, sobretudo importante na medida em que a atividade das bactérias diazotróficas representa cerca de 60% do nitrogênio anualmente fixado na Terra (Kim & Rees, 1994). Além disso, a FBN é o processo primário através do qual o nitrogênio, quimicamente indisponível para a maioria dos organismos, se torna fisiológica e metabolicamente disponível, inicialmente sob a forma de

amônia e, posteriormente, na ciclagem do nitrogênio, podendo formar outros compostos nitrogenados, como nitritos, nitratos e óxido nítrico. Em todas as leguminosas a fixação de N₂ não é iniciada até que a planta possa sustentar esta atividade, ou seja, ceder energia para que a bactéria possa entrar em atividade e fornecer o nitrogênio necessário, ou até que se esgote o nitrogênio presente na semente, e a planta, portanto, venha a sentir a falta deste elemento (Mercante *et al.*, 1992).

A partir dos 25 dias da germinação, a necessidade do caupi em nitrogênio é suprida pela fixação do nitrogênio atmosférico, estendendo-se até a floração (Vasconcelos *et al.* 1976; Stamford & Neptune, 1979). Essa leguminosa apresenta, normalmente, alta capacidade de nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio na presença de população adequada de rizóbios no solo. A quantidade de nitrogênio fixada pelo caupi pode variar entre 73 e 240 kg ha⁻¹ ano. Essa quantidade de nitrogênio fixada pelo processo simbiótico, somada à que o caupi retira do solo, seria suficiente para atender às necessidades da planta (Barreto & Dynia, 1988). Quando o solo contém suficiente quantidade de N para suprir a demanda da planta, a quantidade de N₂ fixada será pequena, evidenciando que a nitrogenase é um processo flexível que ajusta a demanda da planta por N (Mengel, 1994). Dentre as associações entre bactérias fixadoras e plantas, a que ocorre entre bactérias comumente chamadas de rizóbio e leguminosas é a mais conhecida. As leguminosas quando em associação com estas bactérias formam estruturas em suas raízes, denominadas nódulos, nos quais ocorre o processo de fixação do nitrogênio atmosférico que é utilizado pela planta para o seu desenvolvimento. Uma associação rizóbio x leguminosa eficiente, na qual a necessidade da planta por nitrogênio seja suprida, é o alvo de muitas pesquisas que são desenvolvidas no mundo, principalmente nos trópicos, uma vez que o nitrogênio é um dos elementos do solo mais limitantes da produção nestas áreas (Franco & Balieiro, 1999). Até 1984 os rizóbios eram classificados em uma única família, com dois gêneros e seis espécies. Atualmente, os rizóbios encontram-se em quatro famílias (*Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Rhizo-biaceae*), seis gêneros (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), mais de 30 espécies e vários biovars, todos na ordem *Rhizobiales* (Garrity & Holt, 2001). O caupi, de uma maneira geral, é nodulado por espécies do gênero *Bradyrhizobium*, e sob esta denominação estão agrupados um grande número de estirpes capazes de nodular inúmeras espécies de leguminosas comuns nas regiões tropicais (Neves *et al.*, 1998a,b). A formação dos nódulos é um processo

complexo que ocorre em várias etapas e envolve mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto na célula hospedeira, como na bactéria. As mudanças na bactéria visam, principalmente, o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e poder redutor, necessários para o processo de FBN, enquanto que as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (Hungria & Campo, 2005). Espécies de leguminosas tropicais, normalmente são capazes de nodular com uma ampla faixa de rizóbios, contribuindo, desta forma, para a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) nessas regiões. Por outro lado, a introdução de inoculantes contendo rizóbios eficientes, é dificultada, pois as estirpes nativas, em geral, são muito competitivas (Santos, 2007). Frente a esta situação, torna-se interessante estudar estratégias para avaliar a composição e a contribuição de estirpes de rizóbios nativos do solo onde se pretende introduzir o inoculante visando realizar uma eficiente fixação do N_2 (Zilli *et al.*, 2006). Estudos da simbiose caupi-rizóbio, principalmente envolvendo aspectos ecológicos, como competitividade e sobrevivência da estirpe do inoculante precisam ser considerados paralelamente aos esforços no sentido de otimizar o processo de fixação biológica de nitrogênio (Martins *et al.* 1997b) Experimentos realizados por Rangel *et al.* (2001), mostraram que a inoculação durante dois anos consecutivos foi capaz de aumentar a população relativa das estirpes BR 3267 e BR 3269 usadas no inoculante, indicando ser esta uma estratégia para melhorar o estabelecimento de estirpes eficientes no solo.

3.3. Solubilização de fosfatos

O P é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetal, por seu papel em biomoléculas importantes como ácidos nucléicos (DNA, RNA e outros), fosfolipídios e nucleotídeos (ATP, GTP e outros). Segundo Wakelin *et al.* (2004), a planta adquire fosfatos da solução do solo, predominantemente nas formas HPO_4^{2-} , quando em pH menor que 7,2 e $H_2PO_4^-$ quando em pH maior que 7,2. No entanto, a quantidade de ortofosfato existente na solução do solo é menor que 1% do P total (Mullen, 2005). Assim, apesar da ampla distribuição de P na natureza, a sua deficiência é comum por causa da forma altamente insolúvel encontrada, principalmente, em solos ácidos de regiões tropicais e subtropicais com alta potencialidade de produção, o que resulta em baixa disponibilidade para as plantas (Zapata & Axmann, 1995). Além disso, o P em solução pode ser adsorvido na superfície dos minerais de argila, em solos

neutros ou alcalinos, ou na superfície de óxidos de ferro e de alumínio e minerais de argila em solos ácidos (Sousa & Lobato, 2004).

Em solos brasileiros, o P é encontrado em maior quantidade como fosfatos de alumínio e ferro (Nahas, 2002a). A disponibilidade do P depende de sua solubilidade que pode ser influenciada pela atividade das raízes das plantas e microrganismos do solo. Assim, no solo, o P é sujeito a inúmeros processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre esses processos, destaca-se a dissolução de fosfatos, que os torna disponíveis para as plantas (Rodríguez & Fraga, 1999; Whitelaw, 2000).

Microrganismos do solo, como bactérias e fungos, solubilizam formas inorgânicas não disponíveis de P (Xin *et al.*, 2002; Son *et al.*, 2006; Barroso & Nahas, 2008). Segundo Illmer *et al.* (1995) e Rodríguez & Fraga (1999), esses microrganismos utilizam estratégias bioquímicas, como a produção de ácidos orgânicos, ou outros mecanismos que envolvem o crescimento microbiano e que favorece a secreção de prótons.

Vários autores têm descrito a solubilização de fosfatos por rizóbios (Gyaneshwar, *et al.*, 2002; Mikanová & Nováková, 2002; Deshwal *et al.*, 2003; Hameed *et al.*, 2004; Hara & Oliveira, 2005; Chagas Jr., 2007), e a inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfato ou o manejo de suas populações têm sido sugeridos como forma de substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfáticos solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo e dos formados pela aplicação de fontes solúveis (Kim *et al.*, 1998; Silva Filho *et al.*, 2001).

3.4. A cultura do feijão caupi

3.4.1 Distribuição

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é uma leguminosa de ampla distribuição mundial encontrada principalmente nas regiões tropicais, cujas características edafoclimáticas assemelham-se às do seu provável centro de origem, a África (Mostasso *et al.*, 2002). Aproximadamente 12,5 milhões de hectares constituem a área ocupada com feijão caupi no mundo, dos quais 64% são na África e o restante na América do Sul, América Central e Ásia,

com pequenas áreas espalhadas pela Europa, Estados Unidos e Oceania. Entre todos os países, os principais produtores mundiais são a Nigéria, Níger e o Brasil (Quin, 1997).

Devido às condições de adaptabilidade e do hábito alimentar da população, o feijão caupi é cultivado predominantemente nas regiões Norte e Nordeste, alcançando quase a totalidade das áreas plantadas com feijão no Amazonas, Roraima, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Maranhão (Santos *et al.*, 2007; Cravo & Souza, 2007; Freire Filho *et al.*, 2007). Os três últimos estados, junto com a Bahia, detêm o status de maiores produtores da região e apresentam as maiores áreas plantadas no Norte e Nordeste (Andrade Júnior *et al.*, 2003; Freire Filho *et al.*, 2007). Recentemente, o feijão caupi vem sendo introduzido também nos Cerrados de Roraima, Piauí e Maranhão, principalmente por sua compatibilidade com o sistema de rotação de cultura, o regime pluviométrico regional (Zilli *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2007) e a cada ano a estrutura tradicional de produção e o mercado restrito vêm-se modificando, tornando-se hoje cultivado também por médios e grandes produtores, com maior adoção de tecnologia (Soares *et al.*, 2006).

3.4.2 Caracterização

Entre as leguminosas, o feijão caupi é uma importante fonte alimentar, contendo bons níveis de carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais. Seus grãos possuem teor protéico da ordem de 20 a 30% e, devido ao seu valor nutritivo, constituem um dos principais itens da alimentação nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (Dantas *et al.*, 2002). Em especial, na zona rural e no sertão semi-árido predomina o cultivo do feijão caupi para a produção de grãos, secos e verdes, visando o consumo humano *in natura*, na forma de conserva ou desidratados (Andrade Júnior *et al.*, 2003). Nessas regiões, esta cultura representa um papel importante também na geração de emprego para a população de baixa renda além de compor a dieta de pelo menos 27,5 milhões de pessoas (Freire Filho *et al.*, 2000).

Características agronômicas desejáveis como ciclo curto, baixa exigência hídrica e reconhecida capacidade para se desenvolver satisfatoriamente em solos de baixa fertilidade conferem rusticidade ao feijão caupi, que consegue produzir bem mesmo em circunstâncias desfavoráveis de água e de solo. Tais características justificam a ampla dispersão da espécie em áreas consideradas agronomicamente marginais (Andrade Júnior *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2007) e fazem do feijão caupi uma fonte de matéria orgânica útil como adubo verde na

recuperação de solos naturalmente pobres em fertilizantes ou esgotados pelo uso intensivo, fato muito comum no cerrado no sul do Tocantins. Contudo, mesmo sendo o feijão caupi uma cultura tropical compatível com as condições ecológicas locais, ainda apresenta baixa produtividade, principalmente por predominarem as lavouras conduzidas sob dependência das chuvas (Freire Filho *et al.*, 2005). Dentre as principais causas que limitam a produtividade do feijão caupi no cerrado no Sul do Tocantins, merece destaque o emprego de cultivares tradicionais com baixa capacidade produtiva, razão pela qual se observa que o aumento de produtividade pode ser alcançado mediante a utilização de sementes de qualidade superior. Oliveira Junior *et al.* (2002) sugeriram um programa nacional visando a avaliação e recomendação de cultivares em ambientes específicos, o que proporcionaria maior segurança ao produtor, facilitando a obtenção de créditos e aceitação do produto no mercado.

3.4.3 As cultivares de feijão caupi

A escolha correta da cultivar para um determinado ambiente e sistema de produção é de grande importância para a obtenção de uma boa produtividade. Contudo, também é necessário que a cultivar tenha características de grãos e de vagem que atendam às exigências de comerciantes e consumidores (Freire Filho *et al.*, 2000; 2005).

Os aspectos considerados na adoção de uma variedade incluem ciclo, arquitetura da planta, resistência a doenças e tipo de produção, que devem ser adequados às necessidades de cada produtor. O conhecimento da variabilidade genética e da relação entre diferentes variedades de feijão caupi é importante para maximizar o uso dos recursos genéticos disponíveis. A maioria das variedades locais brasileiras pertence apenas a um grupo, o que sugere uma limitação da base genética, com menor número de características agrônomicas superiores que atendam aos interesses regionais específicos (Xavier *et al.*, 2005). Segundo este autor, a crescente participação do feijão caupi no cenário global exige novos investimentos, tanto do ponto de vista de melhoramento vegetal como da introdução de novas tecnologias que possam otimizar o potencial genético da espécie, a partir da variabilidade genética disponível, produzindo-se genótipos adaptados a diferentes regiões e ecossistemas brasileiros.

Inicialmente, o melhoramento do feijão caupi foi voltado primordialmente para o aumento da produtividade e mais tarde, para a resistência a doença. Atualmente, além dessas duas

características está sendo dada uma grande ênfase à qualidade de grãos e a arquitetura da planta. Mas, para se obter a variedade ideal, é necessário inicialmente reunir as características agronômicas desejadas de outras cultivares em uma única planta, através de manipulação genética. E como as exigências dos produtores, comerciantes e consumidores são dinâmicas, busca-se o aperfeiçoamento de exploração, da produtividade e da qualidade de novas cultivares, criadas mediante um trabalho permanente de seleção (Andrade Júnior *et al.*, 2003).

3.4.4. A fixação biológica do nitrogênio em caupi

A importância do feijão para as regiões Norte e Nordeste é de ordem nutricional, social, econômica e estratégica (Soares *et al.*, 2006), por isso é uma cultura que vem ultrapassando as barreiras regionais com ampla perspectiva no agronegócio brasileiro, além de interagir com bactérias fixadoras de N atmosférico, que pode contribuir para aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção.

Por meio da simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, o feijão caupi apresenta habilidade para fixar nitrogênio do ar (Andrade Junior *et al.*, 2003). Contudo, a associação feijão caupi e rizóbio apresenta baixa especificidade, fato relacionado com a promiscuidade da simbiose entre plantas de feijão caupi e estirpes de rizóbio nativos dos solos tropicais (Neves *et al.*, 1998a). Segundo Moreira & Siqueira (2002), a eficiência das bactérias fixadoras de nitrogênio, que estabelecem simbiose com leguminosas, e sua capacidade de sobreviver e formar nódulos no solo depende de fatores genético inerentes aos simbiossomas e da interação com fatores edafoclimáticos. A diversidade, inclusive de leguminosas, encontrada nos vários sistemas de uso da terra pode abrigar também uma grande variabilidade de rizóbios (Pereira, 2000; Xavier *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007), adaptados a condições predominantes nos solos brasileiros.

3.4.5. Inoculação com rizóbio: estirpes recomendadas ou nativas

O uso de inoculantes rizobianos em leguminosas de grãos tem sido responsável por expressivas economias no custo da produção agrícola, por meio da redução do uso de adubos minerais nitrogenados, advinda dos benefícios do processo da FBN (Rumjanek *et al.*, 2005).

Determinadas estirpes de rizóbio e algumas espécies de leguminosas podem variar de extremamente específicas a altamente promíscua. A ausência ou o baixo número de estirpes específicas de determinado hospedeiro no solo ou a presença de populações eficazes que podem competir pelos sítios de nodulação com estirpes eficientes, tornam necessária a inoculação com estirpes selecionadas quanto à eficiência, competitividade e adaptação às condições edafoclimáticas locais. Quando a espécie nodulífera é promíscua, como o feijão caupi, torna-se mais difícil a introdução, estabelecimento e desenvolvimento da simbiose com populações eficientes. Portanto, este tem sido um dos principais entraves à maximização da FBN nesta cultura (Moreira & Siqueira, 2002). Na cultura do feijão caupi, a inoculação das sementes não é uma prática adotada e a fixação biológica do nitrogênio é decorrente da nodulação por estirpes nativas (Martins *et al.*, 2003). Todavia o feijão caupi também responde à inoculação por estirpes recomendadas, como a BR 2001/SEMIA 6145 (Relare, 2004), que pertencem aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Miscelânea caupi* (Moreira & Siqueira, 2002), consideradas bastante promíscuas.

É essencial uma avaliação sobre a eficiência das estirpes presentes nos solos tropicais, tradicionalmente cultivadas com estas leguminosas, e sobre o estabelecimento de estirpes eficientes de rizóbio que possam aumentar a produtividade da cultura sem aumentar o custo da produção, sejam essas estirpes nativas ou recomendadas.

As bactérias que nodulam caupi pertencem ao grupo “miscelânea caupi”, e a denominação de *Bradyrhizobium* sp, está agrupando um número grande de estirpes capazes de nodular diversas espécies de leguminosas herbáceas comuns nas regiões tropicais. Esse grupo heterogêneo de rizóbio, capaz de infectar as raízes de uma faixa muito ampla de leguminosas, caracteriza-se por ter crescimento lento e alcalinizado do meio de cultura (Jordan, 1984; Martins, 1996). Por essa razão, o feijão caupi se presta como planta-isca para determinação da diversidade de rizóbio, haja vista a sua ampla distribuição.

A promiscuidade das estirpes dificulta a introdução de estirpes selecionadas, limitando a contribuição potencial da fixação biológica e nitrogênio no feijão caupi, uma vez que essas estirpes são incapazes de competir com estirpes de rizóbio nativas e/ou com a microbiota do solo.

As estirpes de rizóbio com baixa especificidade simbiótica são mais comuns nos trópicos do que em regiões temperadas. No entanto, segundo Martins *et al.* (1997a), bactérias de crescimento rápido também nodularam e promovem grande aporte de nitrogênio em plantas de

feijão caupi, ampliando, portanto, a faixa de rizóbio nodulando essa cultura e despertando interesse no estudo dos aspectos ecológicos que possam vir a aperfeiçoar a relação entre os simbiosites.

A avaliação de populações nativas de rizóbio permite a seleção de estirpes eficientes já adaptadas às condições local, que atendam aos requisitos específicos desta leguminosa, e assim possa expressar o seu potencial produtivo. A identificação de estirpes de rizóbio eficientes no fornecimento do nitrogênio necessário ao desenvolvimento adequado das plantas resultará em aumento de produtividade sem o recurso da aplicação de insumos nitrogenados nas lavouras, representando uma diminuição nos custos de produção.

Vários autores, avaliando a diversidade de rizóbios, utilizando feijão caupi como planta isca em diversas regiões, encontraram vários grupos de rizóbios capazes de nodular esta leguminosa, baseados em características morfológicas da colônia e fisiológicas da associação (Martins *et al.*, 1997b; Hara & Oliveira, 2005; Soares *et al.*, 2006; Chagas Jr. 2007; Silva *et al.*, 2005). Dentro dos grupos foram encontrados estirpes com diferentes níveis de eficiência em relação à FBN em caupi em experimentos conduzidos em casa de vegetação e campo.

Estudos feitos por Lacerda *et al.* (2004), mostraram que as estirpes UFLA 03-35, UFLA 03-36 e UFLA 03-129 são mais eficientes que as estirpes BR 2001 na produção de matéria seca da parte aérea do feijão caupi em casa de vegetação e inoculação das sementes no campo com as estirpes INPA 03-11B, UFLA 03-36, UFLA 03-84 e UFLA 03-129 resultaram em rendimentos de grãos equivalentes ao da testemunha que recebeu nitrogênio mineral. Trabalhos conduzidos por Soares *et al.* (2006), Pereira *et al.* (2004) e Zilli *et al.*, (2006, 2007), mostraram que as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B foram bastante eficientes nos testes de FBN, podendo ser recomendadas para novos testes agronômicos em outras regiões.

4. TRABALHOS CIENTÍFICOS

4.1. CAPÍTULO I

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE RIZÓBIOS QUE NODULAM FEIJÃO CAUPI NO CERRADO NO TOCANTINS

RESUMO

Em função das características nutricionais e de rusticidade, o feijão caupi tornou-se importante fonte de proteína nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. O feijão caupi se beneficia da fixação biológica do nitrogênio (FBN) e pode receber parte do nitrogênio necessário para a cultura via simbiose, o que reduz os custos de produção. Com o objetivo de contribuir com a otimização do processo de FBN na cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) no cerrado do Tocantins, através da efetividade de populações e diversidade de isolados de rizóbio obtidos em sete áreas com e sem cultivos agrícolas, foram realizados isolamento e caracterização fenotípicas (pH do meio, tempo de crescimento, características das colônias e de muco). Foram obtidos 121 isolados de rizóbio e avaliados num dendrograma mostraram uma grande diversidade, com a formação de 22 grupos. O estudo das características fisiológicas e morfológicas revela uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizóbio e costuma estar relacionado com estudos em nível de DNA.

PALAVRAS-CHAVE: *Vigna unguiculata*, Nodulação, Fixação do nitrogênio.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION PHENOTYPE OF RHIZOBIUM NODULES THAT COWPEA (*VIGNA UNGUICULATA* L. WALP.) TOCANTINS IN THE CERRADO

ABSTRACT

As a result of its nutritional and rustic characteristics, cowpea has become an important source protein in the North and Northeast region of Brazil. Cowpea may benefit from biological nitrogen fixation (BNF) and can receive part of the nitrogen needed for culture from symbiosis, which reduces the cost of production. In order to contribute for the optimization of BNF associated with cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) in cerrado of Tocantins, through the effectiveness of populations and diversity isolated of rhizobial obtained in seven areas with end without agricultural cultivations, isolation were accomplished and phenotype characterization (pH of the middle, time of growth, characteristics colony and mucous). We obtained 121 isolates of rhizobia and evaluated in a dendrograma showed a great diversity, with the formation of five great groups divided in different sub-groups. The study of the physiological and morphologic characteristics it discloses a sufficiently ample diversity of isolated of rhizobia and is related with studies in DNA level.

KEY WORDS: *Vigna unguiculata*, Nodulation, Nitrogen fixation.

4.1.1. INTRODUÇÃO

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é uma das leguminosas mais extensamente adaptada, versátil e nutritiva. Vem se tornando produto de importância agrícola pelas suas características nutricionais, representando uma fonte alternativa de proteína, sendo um dos principais produtos de subsistência para a população de baixa renda (Freire Filho, 2005). Cultivado principalmente nas regiões Norte e Nordeste, com 70% da produção nacional, apresenta uma produtividade média de 400 kg ha⁻¹. Essa produção baixa se deve ao tipo de sistema de produção adotado por pequenos agricultores, em regime de subsistência, com pouca tecnificação (Freire Filho, 2005). Entretanto, em campos experimentais, pode-se observar que a produção pode ser maior (Martins *et al.*, 2003; Zilli *et al.*, 2008).

Um dos fatores mais limitantes à produtividade do feijão caupi é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo o P e N, nos solos agrícolas. A adição de N na forma de fertilizantes é cara e, em muitos casos, pouco eficiente, sobretudo em decorrência de perdas do elemento causadas por práticas culturais inadequadas (Alves *et al.*, 2003). Alguns autores defendem a adubação nitrogenada em culturas como o feijão (Franco *et al.*, 2008), na qual afirmam que a produtividade de grãos aumenta em mais de 150% na aplicação em semeadura e/ou cobertura em sistemas de plantio direto. Entretanto, essa é uma prática que eleva os custos da produção, deixando de ser economicamente viável para a maioria dos produtores que cultivam culturas como o feijão caupi em regime de subsistência.

Novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de melhorar a produtividade e qualidade do feijão caupi. Dentre essas tecnologias, destaca-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN) que vem ganhando espaço entre os produtores agrícolas, principalmente nos Cerrados (Martins *et al.*, 2003; Zilli *et al.*, 2006, 2008).

A simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio é amplamente aceita como alternativa à fertilização química. Bactérias do grupo dos rizóbios têm a capacidade de formar nódulos em raízes e caules de leguminosas. Devido à importância ecológica e econômica dos rizóbios, a diversidade dessas bactérias tem sido investigada extensivamente e a taxonomia rizobiana vem sofrendo mudanças significativas nas últimas três décadas (Liu *et al.*, 2005). O potencial econômico ainda não foi totalmente estabelecido, apesar da inoculação com rizóbios

representar alternativa viável, devido a problemas com o inoculante, que envolvem, entre outras coisas, a sensibilidade das estirpes inoculadas aos estresses bióticos e abióticos (Spera, 2006).

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

Considerando o cerrado no Estado de Tocantins, em especial a região sul do Estado, fatores como temperatura, características genéticas inerentes aos simbioses, bem como interação com características edafoclimáticas influenciam a persistência dos rizóbios no solo, limitando tanto a nodulação quanto a fixação do nitrogênio (Hungria & Vargas, 2000). Para superar essas limitações, torna-se de grande importância a escolha de estirpes nativas de rizóbio da área que será inoculada.

O conhecimento da diversidade de rizóbios nativos é de suma importância, sendo considerada uma fonte de recursos genéticos para seleção de isolados adaptados às diversas condições. Atualmente, o sistema de taxonomia microbiana aborda uma análise conjunta de dados morfológicos, fisiológicos e diferentes ferramentas moleculares, utilizando métodos estatísticos de avaliação das diferenças e das similaridades entre os microrganismos, fornecendo medidas quantitativas de similaridades entre os microrganismos. A taxonomia dos rizóbios tem sofrido mudanças nos últimos anos, tendo em vista o uso de ferramentas moleculares, permitindo a identificação de novos grupos de bactérias com capacidade de nodulação e fixação do nitrogênio em leguminosas (Chen *et al.*, 2005). Porém, a obtenção de características morfológicas e fisiológicas de rizóbios tem sido utilizada para identificação de novos grupos de rizóbios.

O estudo da diversidade das bactérias baseado em características culturais (morfológicas e fisiológicas), envolve a avaliação de parâmetros, como o tempo que as bactérias levam para formar colônias individuais em meio de cultura, o diâmetro das colônias, a forma, a cor, a produção de ácido e álcali e a produção de muco, dentre outros (Martins *et al.*, 1997b). Esses métodos fenotípicos de análise de características culturais de microrganismos possuem a vantagem de serem rápidos, permitindo uma análise prévia da diversidade. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade morfológica de rizóbios nativos

isolados de nódulos de feijão caupi cultivados em amostras de solos coletadas no cerrado no Tocantins.

4.1.2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solos foram coletadas de uma camada de 0-20 cm nas regiões de Gurupi, Natividade, Pedro Afonso, Cariri do Tocantins e Lagoa da Confusão, em áreas com e sem cultivos, no Estado do Tocantins. As amostras de solos coletadas serviram de fonte de inóculo em sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) como planta isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulos (Xavier *et al.*, 1997). Os ensaios foram realizados em casa de vegetação na Estação Experimental da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi. Foi determinada a análise química das amostras de solos utilizadas (EMBRAPA, 1997) (Tabela 1 e 2). Utilizou-se subamostras de solo equivalentes a 30g, para servirem como fonte de inóculo das populações e avaliação da população de rizóbio das amostras. O substrato utilizado foi areia autoclavada a 120 °C por duas horas, que foi adicionada em vasos esterilizados com capacidade para 700g de substrato. As subamostras de solo foram colocadas no centro do vaso contendo areia autoclavada.

Foram semeadas oito sementes por vaso (sementes previamente lavadas com etanol 100% por 30 segundos, seguindo uma esterilização superficial com hipoclorito de Na 0,2% por 4 minutos e lavadas com água esterilizada para eliminar a solução de hipoclorito), procurando colocá-las em contato com a amostra de solo para que ao germinarem, as sementes pudessem ser infectadas pelas populações de rizóbio presentes na mesma. No sétimo dia após a germinação, fez-se o desbaste deixando três plantas por vaso.

Os vasos receberam uma solução contendo todos os nutrientes com exceção do nitrogênio (modificada de Spera, 2006, segundo Oliveira, 2003), com pH 5,0. Foi adicionada solução nutritiva periodicamente durante o ciclo das plantas, sendo colocada água destilada esterilizada sempre que necessário. Foram utilizados três vasos para cada amostra de solo contendo três plantas por vaso, totalizando nove plantas por amostra de solo.

As plantas foram coletadas no estágio inicial de floração (aproximadamente 45 dias após o início da germinação).

Foram isolados rizóbios presentes nas amostras de solos, após a coleta dos nódulos usando a metodologia tradicional descrita por Vincent (1970) e Somasegaran & Hoben (1985), onde os mesmos foram lavados com etanol (100%; 30 segundos), seguindo uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (4 minutos) e dez lavagens com água estéril. Em seguida os nódulos foram pressionados com uma pinça e, posteriormente, foi realizada a riscagem em placas de Petri contendo meio YMA (yeast manitol agar) e azul de bromotimol, com pH 6,0. Após o isolamento, as placas foram incubadas a 28°C até o crescimento de colônias de bactérias, quando então foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio e novamente incubadas até o novo crescimento bacteriano. Os isolados assim obtidos foram mantidos em tubos de ensaios contendo o meio YMA inclinado, segundo descrito por esses autores. Deste modo, foi criado o banco de germoplasma de rizóbio da UFT, permitindo o início da seleção de isolados com características agronômicas desejáveis.

A caracterização fenotípica foi realizada segundo Vincent (1970), Hungria *et al.* (1997), Martins *et al.* (1997b) e Zilli *et al.* (2000), avaliando-se o tempo de crescimento de cada um dos isolados, sendo separadas bactérias de crescimento lento (4 dias em diante) e rápido (até três dias); o pH do meio após o crescimento das bactérias foi observado indiretamente pela coloração do meio de cultura contendo azul de bromotimol (alcalino, ácido e neutro); foi avaliado também, a forma da colônia (circular ou irregular), borda (inteira ou irregular), transparência e cor da colônia. Quanto ao muco produzido pelas células, foram avaliados os aspectos: quantidade (muito ou pouco), aderência à alça de platina, observada pela remoção do muco da superfície do meio de cultura (sim ou não) e elasticidade, observada no momento da remoção do muco do meio de cultura (sim ou não).

A partir da caracterização morfológica, foi realizada a análise de agrupamento pelo programa Ntsyspc, utilizando o algoritmo UPGMA (cálculo da média aritmética entre os indivíduos atribuindo pesos iguais a eles) e a matriz de similaridade com coeficiente Simple Matching ($SM = m/n$, onde m é o número de combinações ocorridas entre dois indivíduos e n o número de combinações possíveis) (KCS, 2009). Uma vez construída a matriz, foi feito um dendrograma através do qual se agrupou os isolados por similaridade.

Tabela 1. Potencial hidrogeniônico, grau de acidez, teores de fósforo e de bases trocáveis de solos coletados em áreas com diferentes formas de uso da terra no Estado de Tocantins.

Amostras	pH (H ₂ O)	Acidez	P (mg/dm ³)	Ca	Mg	K	Al
				----- (cmol/dm ³) -----			
UFT PM	5,6	Moderada	2,2	7,26	2,5	0,09	0,17
UFT AR	5,2	Moderada	10,06	2,03	1,19	0,1	0,18
UFT CA	5,5	Moderada	16,6	4,2	2,51	0,22	0,06
UFT SR	5,8	Moderada	27	2,65	0,44	0,23	0,2
UFT ML	5,7	Moderada	16,4	2,94	0,82	0,14	0,22
UFT MA	5,8	Moderada	5,2	3,23	0,89	0,14	0,32
UFT LI	6,0	Franca	18,2	2,01	0,7	0,13	0,11
UFT BA	6,0	Franca	5	3,17	0,58	0,15	0,17
UFT CR	6,1	Franca	8	1,95	0,24	0,11	0,24
UFT ML	5,7	Moderada	3	1,99	1,37	0,06	0,21
UFT CA	5,6	Moderada	2,6	2,79	0,51	0,10	0,12
UFT PD	5,7	Moderada	2,8	1,93	1	0,11	0,27
UFT AB	5,4	Moderada	6,6	1,71	0,13	0,23	0,32
UFT AR	5,4	Moderada	22,2	4,05	2,05	0,13	0,23
UFT CP	5,1	Moderada	3,6	1,57	1,07	0,04	0,39
UFT FL	5,8	Moderada	2,4	0,4	0,0	0,1	0,3
UFT CA	6,3	Franca	7,3	6,2	0,1	0,1	0,1
UFT ML	7,1	Base	49	7,6	0,4	0,1	0,0
UFT BR	6,1	Franca	3,4	8,2	1,1	0,5	0,2
UFT ML	5,3	Moderada	2,2	1,2	0,2	0,1	0,4
UFT AR	6,2	Franca	6,4	3,3	0,9	0,2	0,1
UFT MD	5,1	Moderada	3,2	0,6	0,0	0,1	0,2
UFT CP	5,2	Moderada	2,6	2,79	0,51	0,10	0,12
UFT PM	5,2	Moderada	4,3	1,8	0,1	0,0	1,3
UFT ML	5,3	Moderada	3,3	0,3	0,1	0,1	0,2
UFT CP	5,4	Moderada	3,6	1,4	0,1	0,1	0,3
UFT PT	4,4	Elevada	13,6	0,5	0,1	0,1	1
UFT SJ	5,0	Moderada	2,7	0,4	0,1	0,1	0,3
UFT SJ	5,2	Moderada	4,3	1,8	0,1	0,0	1,3
UFT SJ	5,0	Moderada	2,1	0,6	0,0	0,0	0,9
UFT FL	5,1	Moderada	3,6	0,2	0,1	0,1	0,8
UFT CR	5,6	Moderada	2,2	7,26	2,5	0,09	0,17
UFT FL	5,7	Moderada	3	1,99	1,37	0,06	0,21
UFT PT	5,3	Moderada	3,3	0,3	0,1	0,1	0,2
UFT SJ	5,7	Moderada	3,0	1,8	0,2	0,1	0,2
UFT CP	5,4	Moderada	3,6	1,4	0,1	0,1	0,3
UFT UM	5,4	Moderada	3,6	0,9	0,1	0,1	0,1
UFT LC	5,8	Moderada	2,0	2,8	0,1	0,0	0,1
UFT FL	6,6	Franca	49,0	4,0	2,5	0,1	0,1
UFT FL	6,0	Franca	16,4	3,5	1,3	0,1	0,1
UFT CP	5,5	Moderada	10,1	3,1	1,4	0,1	0,1

Tabela 2. Características químicas do solo, capacidade de troca de cátions e outras propriedades químicas de solos coletados em áreas com diferentes formas de uso da terra, do estado de Tocantins.

Amostras	MO (%)	Al ----- (cmol/dm)	H + Al ----- (cmol/dm)	CTC	V (%)	M (%)
UFT PM	4,9	0,17	6,15	16,01	61,55	1,70
UFT AR	2,3	0,18	3,78	7,09	46,73	5,15
UFT CA	3,8	0,06	3,63	10,56	65,62	0,85
UFT SR	4,7	0,2	4,08	7,39	44,86	5,68
UFT ML	3,4	0,22	5,71	9,60	40,56	5,34
UFT MA	2,8	0,32	3,00	7,26	58,66	6,98
UFT LI	2,7	0,11	2,52	5,36	52,91	3,73
UFT BA	1,6	0,17	3,55	7,45	52,36	4,17
UFT CR	1,5	0,24	2,82	5,13	44,96	9,43
UFT ML	2,6	0,21	4,92	8,34	41,05	5,78
UFT CA	2,5	0,12	4,17	7,58	44,92	3,40
UFT PD	3,0	0,27	5,03	8,08	37,69	8,14
UFT AB	3,6	0,32	5,73	7,80	26,57	13,38
UFT AR	1,1	0,23	3,89	10,12	61,53	3,56
UFT CP	1,1	0,39	7,59	10,27	26,11	12,69
UFT FL	3,5	0,3	8,2	8,7	5,7	36,7
UFT CA	2,2	0,1	3,7	10,1	63,4	1,5
UFT ML	3,1	0,0	3,4	11,5	70,1	0,0
UFT BR	3,8	0,2	5,1	14,8	65,8	1,6
UFT ML	3,0	0,4	3,7	5,2	28,3	19,2
UFT AR	2,6	0,1	1,6	6,0	73,0	2,5
UFT MD	0,9	0,2	3,7	4,4	14,1	28,1
UFT CP	3,0	0,3	5,1	5,7	11,5	30,5
UFT PM	2,5	0,12	4,17	7,58	44,92	3,40
UFT ML	2,6	0,1	1,6	6,0	73,0	2,5
UFT CP	2,4	0,8	4,1	4,4	8,0	69,7
UFT PT	1,0	0,1	1,5	4,4	66,5	4,2
UFT SJ	3,0	1,3	7,2	9,2	21,8	39,0
UFT SJ	2,7	0,9	5,6	6,2	10,3	58,7
UFT SJ	2,4	0,8	4,1	4,4	8,0	69,7
UFT FL	0,6	0,2	3,4	3,8	11,3	35,8
UFT CR	1,5	1	9,5	10,1	6,3	61,8
UFT FL	3,6	0,32	5,73	7,80	26,57	13,38
UFT PT	2,8	0,2	3,6	5,6	35,8	9,0
UFT SJ	2,1	0,3	2,4	4,0	39,3	14,2
UFT CP	1,6	0,1	1,1	2,2	49,9	9,2
UFT UM	1,0	0,1	1,5	4,4	66,5	4,2
UFT LC	5,5	0,1	4,5	11,0	59,2	0,8
UFT FL	9,4	0,1	9,3	14,2	34,9	1,6
UFT FL	4,2	0,1	6,6	11,2	40,8	2,6
UFT CP	9,0	0,3	10,9	13,1	17,1	12,2

4.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente obteve-se 121 isolados representativos dos solos coletados nas diversas regiões (Tabela 1) os quais se apresentaram bastantes heterogêneos em suas características morfofisiológicas (Tabela 4).

Com os dados da caracterização morfológica, foi elaborado um dendrograma (Figura 1) de similaridade entre os isolados. Para tanto, inicialmente eles foram classificados de acordo com as características morfológicas (Tabela 6), e foram utilizados na análise grupos de isolados com 100% de similaridade, utilizados para construção do agrupamento. Foi utilizado o coeficiente de similaridade de Simple Matching, o qual possibilitou a formação de 22 grupos de isolados (Tabelas 5 e 6). Análise de cluster com parâmetros morfológicos e fisiológicos de isolados de rizóbios, de amostras de solo de diferentes regiões, também mostraram ampla diversidade (Hungria *et al.*, 2001; Germano *et al.*, 2003; Zilli *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Chagas Jr., 2007).

A forma da colônia é dependente da presença de muco, o que é muito comum no gênero *Bradyrhizobium* (Fuhrmann, 1990). A consistência do muco produzido é também bastante variada, principalmente nos isolados de crescimento rápido. Enquanto algumas colônias apresentam aspecto gomoso, outras são aquosas, com o muco chegando a coalescer por toda a placa, tornando difícil o isolamento da colônia depois de alguns dias.

Os isolados que apresentaram crescimento rápido e, de modo geral, com reação ácida em meio de cultura, obtidos em áreas de cerrado, sugerem maior capacidade de adaptação a essa condição. As bactérias que nodulam o caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) têm sido consideradas rotineiramente como pertencentes ao grupo miscelânea “caupi” ou *Bradyrhizobium* spp., compreendendo um número grande de estirpes de crescimento lento capazes de nodular inúmeras espécies de leguminosas herbáceas comuns na região tropical (Jordan, 1984; Saleena *et al.*, 2001; Zilli *et al.*, 2004; 2006). Neste estudo, cerca de 55% dos isolados obtidos das diferentes regiões de coleta apresentaram crescimento rápido em meio de cultura indicando que o limite das estirpes capazes de nodular caupi vai além do grupo *Bradyrhizobium* spp. Alguns trabalhos já evidenciaram que rizóbios de crescimento rápido também são capazes de induzir nódulos em feijão caupi (Zhang *et al.*, 2007). Os rizóbios de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas. Esta característica constitui uma estratégia de sobrevivência, já que são mais tolerantes à

seca do que os de crescimento lento e se multiplicam rapidamente em curto espaço de tempo úmido, o que explicaria sua maior frequência nos solos das regiões semi-áridas (Santos *et al.*, 2007).

Não foram obtidos, neste estudo, isolados de colônias secas. Todos os isolados obtidos apresentaram produção de muco, embora alguns apresentem pouco muco. Segundo Coutinho (1999), a produção de muco representaria um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência do rizóbio em condições adversas de solo e clima. Segundo Freitas *et al.* (2007), a falta de descrição de estirpes que produzem um excesso de exopolissacarídeos na literatura causou certa omissão sobre esse grupo de bactérias por bastante tempo, por acreditar tratar-se de contaminantes. A produção de muco altera a permeabilidade das células, tornando as estirpes mais resistentes a fatores bióticos de competição no solo, como a presença de microrganismos promotores de antibióticos. Batista *et al.* (2007) observaram tendência de incremento na produção de muco por isolados de *Bradyrhizobium*, como reflexo da adaptação a condições de solos ácidos do Cerrado brasileiro.

Considerando a distribuição de isolados por local de coleta dos solos para isolamento, pode-se observar similaridade entre a diversidade de isolados apresentada nos diferentes locais de coleta, uma vez que partes dos isolados de cada local apresentou crescimento rápido, com tendência de acidificar o pH do meio de cultivo. Foi observada variação para as características avaliadas (Tabelas 3, 4 e 5).

As características culturais e morfológicas das espécies bacterianas capazes de formar nódulo em leguminosas, genericamente identificadas como rizóbio, fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento. Graham (2000) destacou entre várias outras características, o tempo de crescimento e reação do pH em meio com extrato de levedura, manitol, sais minerais e Agar (YMA) como testes fisiológicos significativos na taxonomia de rizóbio, assim como Martins *et al.* (1997b), que descrevem as principais características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio, servindo para o levantamento de isolados de rizóbio que nodula feijão caupi. Da mesma forma para diferentes regiões e ecossistemas como no Sertão e Zona da Mata no Nordeste (Neves *et al.*, 1998a,b), em sistema integrado de produção agroecológica (Zilli *et al.*, 1998), Cerrado (Zilli *et al.*, 2000, 2004; 2007), Amazonas (Hara & Oliveira, 2004; 2005; Chagas Jr., 2007), Paraíba (Silva *et al.*, 2005;

Vieira, 2007) e Minas Gerais (Ferreira *et al.*, 2005), mostrando uma enorme diversidade na população de rizóbios dos solos estudados.

Inúmeros trabalhos têm sido publicados com base em características fenotípicas visando à caracterização de diferentes populações de rizóbio nodulando as mais diversas plantas hospedeiras (Sweelim *et al.*, 1997; Ramirez *et al.*, 1997; Xavier *et al.*, 1998; Straliozzo & Rumjanek, 1999b; Zilli *et al.*, 2004). Muitas destas características fenotípicas são estudadas com o objetivo não somente de caracterização, mas de verificar a provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais prevalentes no ecossistema para o qual se procede a seleção do rizóbio-inoculante. Além disso, busca-se correlacionar dados de diversidade metabólica com os de eficiência simbiótica, uma vez que aquela deve refletir a diversidade dos mecanismos de controle das interações simbióticas entre estirpes de rizóbio e as diferentes leguminosas (Batzli *et al.*, 1992).

Em termos ecológicos, a análise de dados fenotípicos tem aplicabilidade restrita devido ao grande número de interações que ocorrem no sistema solo, tanto bióticas como abióticas, especialmente quando se considera os microagregados do solo onde se alojam as populações bacterianas e a influência do ambiente rizosférico. Estas interações dificultam as correlações entre os resultados em nível de laboratório com os obtidos em nível de campo. No entanto, em termos taxonômicos, após a introdução dos métodos de taxonomia numérica, permitindo o agrupamento de um grande número de isolados com características fenotípicas semelhantes, a análise destes dados tornou-se imprescindível. Atualmente, apesar da quantidade de dados genotípicos na literatura, a correlação destes com as características fenotípicas é uma das condições para a descrição de novos gêneros e espécies bacterianas. Além disso, estas análises de agrupamento facilitam o estudo comparativo dos diferentes grupos, tanto intraespecíficos como interespecíficos, quanto a diferentes características em nível de campo.

A caracterização morfofisiológica possibilitou um maior conhecimento da população de rizóbios dos solos coletados neste trabalho, e o agrupamento facilitará o desenvolvimento das etapas seguintes de confirmação da nodulação e seleção de rizóbio eficiente para a fixação do N₂ em variedades de feijão caupi. Segundo Hameed *et al.* (2004), o estudo das características fisiológicas e morfológicas revela uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizóbio e costuma estar relacionado com estudos em nível de DNA. Estes dados são importantes, uma vez que o conhecimento das comunidades nativas por meio destas ou de outras técnicas revelam-se

fundamentais para se conhecer a diversidade das espécies, principal recurso para o trabalho na área de biotecnologia.

Isolados obtidos de caupi em diferentes regiões da China apresentaram similaridade a *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, por análises moleculares do gene ribossomal 16S (Zhang *et al.*, 2007). Os autores identificaram, ainda, isolados com similaridades a *Bradyrhizobium*, mas que diferiram das espécies atualmente descritas no gênero, sinalizando para a possibilidade de pertencerem a uma espécie ainda não caracterizada. O mesmo foi observado por Chagas Jr. (2007) com isolados de rizóbio oriundos de solos da Amazônia. Os resultados apresentados, tanto os da literatura quanto os do presente trabalho, demonstraram a baixa especificidade do feijão caupi com relação ao microssimbionte para estabelecer a nodulação e apontam a espécie como uma boa opção como planta isca. Em relação à seleção de estirpes eficientes no processo de conversão de nitrogênio atmosférico em compostos nitrogenados, deverão apresentar competitividade frente aos rizóbios nativos, uma vez que a espécie é promíscua. Nesse sentido, torna-se de suma importância a busca de isolados da região onde se deseja cultivar o feijão caupi, a fim de selecionar os isolados adaptados às condições ambientais, que invariavelmente são adversas, sejam por questões de temperatura do solo, baixa fertilidade ou toxicidade de minerais.

A região de cerrado possui características peculiares, estando toda sua biodiversidade em condições de constante estresse, seja de temperatura, baixa precipitação pluviométrica em determinadas épocas do ano ou características dos solos da região. Essas condições podem afetar a sobrevivência e a eficiência dos rizóbios desse ecossistema e é possível que a alta diversidade observada seja uma indicação da capacidade do sistema de manter o grupo funcional sob condições de estresses; portanto, a grande diversidade, considerando as características fenotípicas dos isolados de rizóbios encontrados nessa região, obtidas a partir do feijão caupi usada como planta isca, sugere estabilidade dos solos da referida região quanto a fixação do nitrogênio, tolerando seus estresses; isto pode ser resultado de adaptação dos rizóbios juntamente com a grande diversidade de leguminosas nativas do cerrado.

Tabela 3. Local e amostras de solos coletadas em diferentes formas de uso do solo em municípios no Estado do Tocantins, utilizadas como fonte de inóculos de rizóbio e isolados obtidos de plantas de feijão caupi.

Município/Área	Local de coleta	Solo/cultura	Código das amostras	Isolados obtidos
1. Gurupi: Área 1	UFT	Pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i>)	UFT PM	UFT 01, UFT 02, UFT 03 e UFT 04
1. Gurupi: Área 2	UFT	Arroz (<i>Oryza sativa</i>) Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	UFT AR UFT CA UFT SR	UFT R05, UFT R06 e UFT R07 UFT R08, UFT R09 e UFT R10 UFT R11 e UFT R12
1. Gurupi: Área 3	UFT	Milho (<i>Zea mays</i>)	UFT ML	UFT R13 e UFT R14
1. Gurupi: Área 4	UFT	Mamão (<i>Carica papaya</i>) Limão (<i>Citrus x limon</i>) Banana (<i>Musa paradisiaca</i>) Crotalária (<i>Crotalaria</i> spp.) Milho (<i>Zea mays</i>) Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	UFT MA UFT LI UFT BA UFT CR UFT ML UFT CA	UFT R15, UFT R16 e UFT R17 -- ⁽¹⁾ UFT R18, UFT R19 e UFT R20 UFT R21, UFT R22 e UFT R23 UFT R24, UFT R25 e UFT R26 --
1. Gurupi: Área 5	Fazenda Carioca Km 12, BR 242	Pasto degradado (<i>Brachiaria brizantha</i>)	UFT PD	UFT R27
1. Gurupi: Área 6	Assentamento Vale Verde	Abóbora (<i>Cucurbita pepo</i>) Arroz (<i>Oryza sativa</i>) Caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) Floresta	UFT AB UFT AR UFT CP UFT FL	UFT R28 e UFT R29 UFT R30 UFT R31, UFT R32 e UFT R33 UFT R34, UFT R35 e UFT R36
1. Gurupi: Área 7	Assentamento Vale Verde	Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	UFT CA	UFT R37, UFT R38, UFT R39 e UFT R40
1. Gurupi: Área 8	Assentamento Vale Verde	Caupi (<i>Vigna unguiculata</i>)	UFT CP	UFT R 41, UFT R 42, UFT R43, UFT R44, UFT R45 e UFT R46
1. Gurupi: Área 9	Assentamento Vale Verde	Milho (<i>Zea mays</i>)	UFT ML	UFT R 47 e UFT R48
1. Gurupi: Área 10	Assentamento Vale Verde	Pastagem (<i>Brachiaria brizantha</i>) Milho (<i>Zea mays</i>) Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	UFT BR UFT ML UFT AR	UFT R49 e UFT R50 UFT R 51, UFT R52 e UFT R53 UFT R54

1. Gurupi: Área 11	Assentamento Vale Verde	Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) Caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) Pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i>) Milho (<i>Zea mays</i>)	UFT MD UFT CP UFT PM UFT ML	UFT R55 e UFT R56 UFT R57, UFT R58 E UFT R59 UFT R60 e UFT R 61 UFT R62, UFT R63 e UFT R64
2. Cariri: Área 1	Fazenda Carioca BR 242 12 Km	Caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) Floresta	UFT CP UFT PT	UFT R65, UFT R66, UFT R67, UFT R68, UFT R69 e UFT R70 UFT R71, UFT R72 e UFT R73
3. Natividade	Escola Agrícola	Pastagem (<i>Brachiaria brizantha</i>) Soja (<i>Glycine max</i>) Caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) Mucuna (<i>Mucuna pruriens</i>) Leucena (<i>Leucaena leucocephala</i>) Floresta Floresta	UFT PT UFT SJ UFT CP UFT MU UFT LC UFT FL UFT FL	UFT R74, UFT R75 e UFT R76 UFT R77, UFT R78, UFT R79 e UFT R80 UFT R81, UFT R82, UFT R83 e UFT R84 UFT R85, UFT R86, UFT R87 e UFT R88 UFT R89, UFT R90, UFT R91 e UFT R92 UFT R93, UFT R94, UFT R95 e UFT R96 UFT R97
4. Pedro Afonso	Área de cultivo – Cooperativa Agrícola Pedro Afonso	Soja (<i>Glycine max</i>) Soja (<i>Glycine max</i>) Soja (<i>Glycine max</i>) Floresta Crotalária (<i>Crotalaria juncea</i>) Floresta	UFT SJ UFT SJ UFT SJ UFT FL UFT CR UFT FL	UFT R98, UFT R99 e UFT R100 UFT R101 e UFT R102 UFT R103 e UFT R104 UFT R105, UFT R106, UFT R107 e UFT R108 UFT R109, UFT R110, UFT R111 e UFT R112 UFT R113, UFT R114, UFT R115 e UFT R116
Lagoa da Confusão	Faz. Bacaba Vicinal 46	Caupi (<i>Vigna unguiculata</i>)	UFT CP	UFT R117, UFT R118, UFT R119, UFT R120 e UFT R121

⁽¹⁾ Não se obteve isolados destas amostras de solo.

Tabela 4 - Características morfo-fisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos de diferentes regiões do Tocantins.

Grupos/ Nº de Isolados ¹	Características dos grupos de isolados/ ²												
	TC	pH	DC	FC	EC	BC	Tr	AC	CC	AM	EM	TM	QM
Grupo 1 (7)	R	Ac	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	CE	Vis	M
Grupo 2 (13)	R	Ac	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis	M
Grupo 3 (7)	R	Ac	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis	M
Grupo 4 (3)	R	Al	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis	M
Grupo 5 (3)	R	Al	≤ 2	C	P	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis	M
Grupo 6 (15)	R	Ac	≤ 2	C	P	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis	M
Grupo 7 (7)	L	Ac	> 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis	M
Grupo 8 (3)	L	Ac	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis	M
Grupo 9 (3)	L	Al	≤ 2	C	P	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis	M
Grupo 10 (9)	L	Ac	≤ 2	C	P	I	N	Ho	B	Ho	SE	Vis	M
Grupo 11 (1)	L	Al	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	SE	Vis	M
Grupo 12 (4)	R	Ac	≤ 2	C	P	I	S	Ho	A	Ho	SE	Vis	M
Grupo 13 (13)	L	Ac	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	CE	But	P
Grupo 14 (9)	L	Ac	≤ 2	C	E	I	N	Ho	B	Ho	SE	But	M
Grupo 15 (6)	R	Ac	> 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	CE	But	P
Grupo 16 (1)	R	Al	≤ 2	C	E	I	N	Ho	A	Ho	SE	Vis	M
Grupo 17 (3)	L	Al	≤ 2	C	E	I	S	Ho	B	Ho	CE	Vis	M
Grupo 18 (1)	R	Ac	≤ 2	C	P	I	S	He	A	He	SE	Vis	P
Grupo 19 (3)	R	Ac	> 2	C	P	Ir	S	He	A	He	SE	Vis	M
Grupo 20 (3)	L	Ac	≤ 2	C	E	I	N	He	A	He	SE	Vis	M
Grupo 21 (2)	R	Al	> 2	C	E	I	S	He	A	He	SE	Vis	M
Grupo 22 (5)	L	Ac	≤ 2	C	E	I	S	He	B	He	CE	Vis	M

¹ Grupos de isolados. ²TC - tempo de crescimento (R: rápido ≤ 3 dias, L: lento > 3 dias); pH do meio (Ac: ácido, Al: alcalis); DC - diâmetro da colônia em mm; FC - forma da colônia (C: circular); EC - elevação da colônia (P: plana, E: elevada); BC - borda da colônia (I: inteira, Ir: irregular); Tr - transparência (S: sim, N: não); AC - aparência da colônia (Ho: homogênea, He: heterogênea); CC - cor da colônia (A: amarela, B: branca); AM - aparência do muco (Ho: homogênea, He: heterogênea); EM - elasticidade do muco (SE: sem elasticidade, CE: com elasticidade); TM - tipo de muco (Vis: viscoso, But: butírico); QM - quantidade de muco (M: muito, P: pouco).

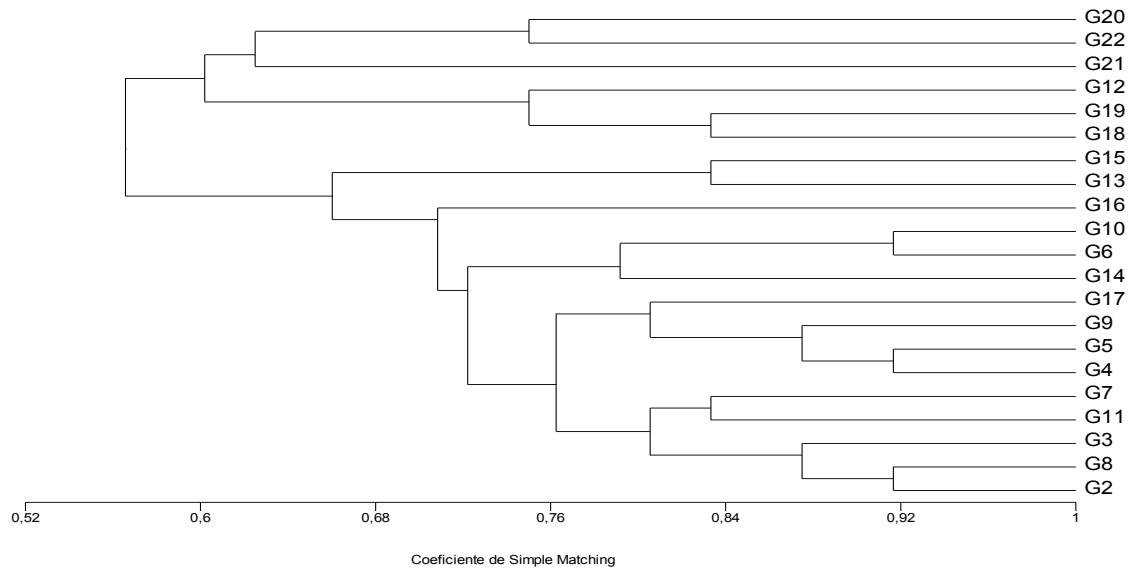


Figura 1 - Dendrograma das características morfo-fisiológicas dos isolados de rizóbio estudados. Os rizóbios foram agrupados com base no coeficiente Simple Matching, utilizando-se o programa NTSYSpc (KCS, 2009).

Tabela 5. Grupos dos isolados de rizóbio associados a feijão caupi de acordo com a caracterização morfofisiológica.

GG	Isolados
Grupo 1	UFT R37, UFT R52, UFT R63, UFT R64, UFT R76, UFT R95 e UFT R105
Grupo 2	UFT R39, UFT R46, UFT R65, UFT R66, UFT R74, UFT R75, UFT R79, UFT R92, UFT R93, UFT R94, UFT R102, UFT R119 e UFT R121
Grupo 3	UFT R01, UFT R81, UFT R82, UFT R83, UFT R85, UFT R86 e UFT R89
Grupo 4	UFT R34, UFT R87 e UFT R108
Grupo 5	UFT R30, UFT R31 e UFT R32
Grupo 6	UFT R06, UFT R16, UFT R36, UFT R38, UFT R50, UFT R51, UFT R54, UFT R59, UFT R62, UFT R96, UFT R100, UFT R101, UFT R106, UFT R107 e UFT R109
Grupo 7	UFT R40, UFT R47, UFT R97, UFT R98, UFT R99, UFT R116 e UFT R117
Grupo 8	UFT R43, UFT R90 e UFT R91
Grupo 9	UFT R44, UFT R67 e UFT R68
Grupo 10	UFT R02, UFT R12, UFT R14, UFT R27, UFT R71, UFT R110, UFT R111, UFT R112 e UFT R113
Grupo 11	UFT R23
Grupo 12	UFT R45, UFT R48, UFT R49 e UFT R72
Grupo 13	UFT R04, UFT R11, UFT R13, UFT R15, UFT R17, UFT R19, UFT R20, UFT R21, UFT R24, UFT R28, UFT R42, UFT R60 e UFT R104
Grupo 14	UFT R26, UFT R57, UFT R69, UFT R70, UFT R103, UFT R114, UFT R117, UFT R118 e UFT R120
Grupo 15	UFT R05, UFT R07, UFT R08, UFT R10, UFT R84 e UFT R88
Grupo 16	UFT R09
Grupo 17	UFT R22, UFT R77 e UFT R78
Grupo 18	UFT R29
Grupo 19	UFT R33, UFT R41 e UFT R61
Grupo 20	UFT R03, UFT R58 e UFT R80
Grupo 21	UFT R35 e UFT R53
Grupo 22	UFT R18, UFT R25, UFT R55, UFT R56 e UFT R73

Tabela 6: Caracterização morfológica de isolados de rizóbio de caupi obtidos de solos no Cerrado do Tocantins.

Isolados	Tempo de crescimento	pH do Meio	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transp	Aparência da colônia	Cor da colônia	Aparência do muco	Elasticidade do muco	Tipo de muco	Quant. muco
UFT R01	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R02	> 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R03	> 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso	muito
UFT R04	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R05	< 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R06	> 3	ac. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R07	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R08	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R09	< 3	alcalino	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	amarela	homog	sem	viscoso	muito
UFT R10	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R11	> 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	butírica	pouco
UFT R12	> 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R13	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R14	> 3	ac. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R15	> 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R16	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R17	> 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R18	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	viscoso	muito
UFT R19	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R20	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	muito
UFT R21	> 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	muito
UFT R22	< 3	alcalino	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	muito
UFT R23	> 3	alcalino	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R24	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R25	> 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	viscoso	muito
UFT R26	> 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico	muito
UFT R27	> 3	ac. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R28	> 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R29	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso	pouco
UFT R30	< 3	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R31	< 3	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R32	< 3	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito

Continuação...

Isolados	Tempo de crescimento	pH do Meio	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transp	Aparência da colônia	Cor da colônia	Aparência do muco	Elasticidade do muco	Tipo de muco	Quant. muco
UFT R33	< 3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso	muito
UFT R34	< 3	alcalino	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R35	< 3	alcalino	> 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso	muito
UFT R36	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R37	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso	muito
UFT R38	< 3	ac. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R39	< 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R40	> 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R41	< 3	ac. leve	> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso	muito
UFT R42	> 3	ácido	> 2	circular	elevada	interia	sim	homog	branca	homog	com	butírica	pouco
UFT R43	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R44	> 3	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R45	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso	muito
UFT R46	< 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R47	> 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R48	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	amarela	homog	sem	viscoso	muito
UFT R49	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	amarela	homog	sem	viscoso	muito
UFT R50	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R51	< 3	ac. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R52	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso	muito
UFT R53	< 3	alcalino	> 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso	muito
UFT R54	< 3	ac. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R55	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	viscoso	muito
UFT R56	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	viscoso	muito
UFT R57	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico	muito
UFT R58	> 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso	muito
UFT R59	< 3	ac. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R60	> 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R61	< 3	ac. leve	> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso	muito
UFT R62	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R63	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso	muito
UFT R64	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso	muito

Continuação...

Isolados	Tempo de crescimento	pH do Meio	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transp	Aparência da colônia	Cor da colônia	Aparência do muco	Elasticidade do muco	Tipo de muco	Quant. muco
UFT R65	< 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R66	< 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R67	> 3	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R68	> 3	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R69	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico	muito
UFT R70	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico	muito
UFT R71	> 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R72	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	amarela	homog	sem	viscoso	muito
UFT R73	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	viscoso	muito
UFT R74	< 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R75	< 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R76	< 3	ac. leve	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	heterog	com	viscoso	muito
UFT R77	> 3	alcalino	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branco	homog	com	viscoso	muito
UFT R78	> 3	alcalino	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso	muito
UFT R79	< 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R80	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso	muito
UFT R81	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R82	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R83	< 3	ac. leve	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R84	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R85	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R86	< 3	ac. leve	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R87	< 3	alcalino	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R88	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R89	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R90	> 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R91	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R92	< 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R93	< 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R94	< 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R95	< 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso	muito
UFT R96	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito

Continuação...

Isolados	Tempo de crescimento	pH do Meio	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transp	Aparência da colônia	Cor da colônia	Aparência do muco	Elasticidade do muco	Tipo de muco	Quant. muco
UFT R97	> 3	ac. leve	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R98	> 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R99	> 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R100	< 3	ac. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R101	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R102	< 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R103	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico	muito
UFT R104	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico	pouco
UFT R105	< 3	ac. leve	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso	muito
UFT R106	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R107	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R108	< 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R109	< 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R110	> 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R111	> 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R112	> 3	ac. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R113	> 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R114	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico	muito
UFT R115	> 3	ac. leve	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R116	> 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R117	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico	muito
UFT R118	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico	muito
UFT R119	< 3	ac. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito
UFT R120	> 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico	muito
UFT R121	< 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso	muito

⁽¹⁾ pH do meio de cultura; ⁽²⁾ Tamanho da colônia em mm; ⁽³⁾ Transp = transparência da colônia; ⁽⁴⁾ ác. Leve = pH do meio acidificou levemente; ⁽⁵⁾ Homog. = homogêneo; ⁽⁶⁾ heterog = heterogêneo.

4.1.4. CONCLUSÕES

As áreas de coleta das amostras de solo apresentam populações de rizóbio bastante diversa, e esta diversidade morfofisiológica pode indicar a ocorrência de diversidade genética presente nestes solos.

4.2. CAPÍTULO II

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO E ALUMÍNIO DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DO CERRADO NO TOCANTINS

RESUMO

A utilização de microrganismos solubilizadores de fosfatos, como rizóbios, tem sido sugerida como alternativa para suprimento de fosfatos, além de nitrogênio, para nutrição e aumento do crescimento vegetal. Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e fosfato de alumínio de rizóbio isolados de solos do cerrado no Tocantins. Os isolados de rizóbio foram repicados para meios específicos para solubilização de fosfatos de cálcio (P-Ca) e Alumínio (P-Al), onde os isolados foram avaliados por um período de 18 dias, obtendo-se os índices de solubilização. Foram avaliados 80 isolados, onde 8 solubilizaram P-Ca e apenas um solubilizou o P-Al. A solubilização de P-Ca e P-Al pelos isolados foram acompanhadas pelo decréscimo do pH do meio. Esses resultados de laboratório indicam a baixa capacidade de solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio de rizóbios isolados de solos do cerrado.

PALAVRAS CHAVES: Bactéria fixadora de nitrogênio, Fósforo, Ecologia microbiana.

CALCIUM AND ALUMINUM PHOSPHATE SOLUBILIZING OF RHIZOBIA ISOLATED FROM CERRADO TOCANTINS SOILS

ABSTRACT

The use of phosphate solubilizing microorganisms such as rhizobia, has been suggested as an alternative for supply of phosphates, and nitrogen to increase the nutrition plant growth. The objective of this work was to determine the capacity of soil cerrado of Tocantins rhizobia isolates to solubilize calcium and aluminum phosphate. The rhizobia isolates were evaluated on specific growth media containing phosphate of calcium (P-Ca) and aluminum (P-Al), where the isolated ones were appraised for a period of 18 days, when solubilizing indexes were obtained. They were appraised 80 isolates, where 8 isolated solubilized P-Ca and one solubilized P-Al. The solubilization of P-Ca and P-Al for isolates were accompanied by a decrease of media pH in the Petri dishes. These laboratory results indicate the low capacity of solubilization of calcium phosphate and aluminum rhizobia isolated from soils of the cerrado.

KEY WORDS: Nitrogen fixing bacteria, Phosphorus, Microbial ecology.

4.2.1. INTRODUÇÃO

Um dos fatores que afetam a crescimento vegetal é a disponibilidade de nutrientes, notadamente, no caso dos solos brasileiros, a de fósforo (P). Para suprir essa carência, são utilizados fosfatos solúveis em dosagens superiores às necessidades das culturas, pois a maior parte do P aplicado ao solo não é prontamente disponível às plantas (Stauffer & Sulewski, 2004). Embora o Brasil apresente inúmeras reservas, o uso de fosfatos naturais é reduzido. O custo de produção é menor, mas a solubilização é baixa, o que diminui sua eficiência (Broughton *et al*, 2003; Lopes *et al.*, 2004), e restringe o seu uso.

O P é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetal, por seu papel em biomoléculas importantes como ácidos nucléicos (DNA, RNA e outros), fosfolipídios e nucleotídios (ATP, GTP e outros). Segundo Wakelin *et al.* (2004), a planta adquire fosfatos da solução do solo, predominantemente nas formas HPO_4^{2-} , quando em pH menor que 7,2 e H_2PO_4^- quando em pH maior que 7,2. No entanto, a quantidade de ortofosfato existente na solução do solo é menor que 1% do P total (Mullen, 2005). Assim, apesar da ampla distribuição de P na natureza, a sua deficiência é comum por causa da forma altamente insolúvel encontrada, principalmente, em solos ácidos de regiões tropicais e subtropicais com alta potencialidade de produção, o que resulta em baixa disponibilidade para as plantas (Zapata & Axmann, 1995). Além disso, o P em solução pode ser adsorvido na superfície dos minerais de argila, em solos neutros ou alcalinos, ou na superfície de óxidos de ferro e de alumínio e minerais de argila em solos ácidos (Sousa & Lobato, 2004).

A fração de P inorgânico presente no solo consiste em fosfatos minerais insolúveis e ânions fosfatos adsorvidos a hidróxidos de ferro e alumínio, silicatos de Al e carbonatos de Ca. Em solos brasileiros, o P é encontrado em maior quantidade como fosfatos de alumínio e ferro (Nahas, 2002b). A disponibilidade do P depende de sua solubilidade que pode ser influenciada pela atividade das raízes das plantas e microrganismos do solo. Assim, no solo, o P é sujeito a inúmeros processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre esses processos, destaca-se a dissolução de fosfatos, que os torna disponíveis para as plantas (Rodríguez & Fraga, 1999; Whitelaw, 2000).

Microrganismos do solo, como bactérias e fungos, solubilizam formas inorgânicas não disponíveis de P (Xin *et al.*, 2002; Son *et al.*, 2006; Barroso & Nahas, 2008). Segundo Illmer *et al.* (1995) e Rodríguez & Fraga (1999), esses microrganismos utilizam

estratégias bioquímicas, como a produção de ácidos orgânicos, ou outros mecanismos que envolvem o crescimento microbiano e que favorece a secreção de prótons. Vários trabalhos têm examinado a habilidade de diferentes espécies bacterianas para solubilizar compostos de fosfatos inorgânicos insolúveis (Wakelin *et al.*, 2004; Souchie *et al.*, 2006; Barroso & Nahas, 2008). Entre os gêneros de bactérias com esta capacidade estão as *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Bulkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, dentro outras (Rodríguez & Fraga, 1999; Souchie *et al.*, 2007), assim como, gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular leguminosas, comumente denominadas rizóbio (Hameed *et al.*, 2004; Hara & Oliveira, 2005; Chagas Jr., 2007).

Vários autores têm descrito a solubilização de fosfatos por rizóbios (Gyaneshwar, *et al.*, 2002; Mikanová & Nováková, 2002; Deshwal *et al.*, 2003; Hameed *et al.*, 2004; Hara & Oliveira, 2005; Chagas Jr., 2007), e a inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfato ou o manejo de suas populações têm sido sugeridos como forma de substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfáticos solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo e dos formados pela aplicação de fontes solúveis (Kim *et al.*, 1998; Silva Filho *et al.*, 2005).

A determinação da capacidade de solubilização de fosfatos tem sido feita em meio de cultura contendo precipitado de fosfatos, através da detecção de uma zona translúcida ao redor das colônias solubilizadoras, conforme metodologia descrita por Deshwal *et al.*, 2003 e Hara & Oliveira, 2004, considerando uma etapa preliminar de seleção de isolados bacterianos com capacidade de solubilização de fosfato, além de fixar nitrogênio. Em levantamento de rizóbio isolados de solos da Amazônia Hara & Oliveira (2005) e Chagas Jr. (2007) encontraram estirpes com capacidade de solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio, com grande variação quanto aos índices de solubilização determinados.

Em solos do cerrado, como os solos em regiões no Tocantins, podem ser isolados uma diversidade de rizóbio com capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico, assim como, a capacidade de solubilização fosfatos. Assim, este trabalho teve como objetivo a avaliação da capacidade de solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio em meio de cultura de rizóbios isolados de diferentes regiões no cerrado no Tocantins.

4.2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolados Utilizados.

Foram utilizados 80 isolados obtidos através de coletas de amostras de solos no cerrado no Tocantins, os quais serviram de fonte de inóculo em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) em casa de vegetação na Estação Experimental da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi. Os locais de coleta foram as regiões de Gurupi, Natividade, Cariri do Tocantins, Pedro Afonso e Lagoa da Confusão, todos situados no estado do Tocantins. Após a coleta dos nódulos, foram isolados rizóbio em meio YMA (extrato de levedura, manitol, agar) com pH 5,5 no Laboratório de Microbiologia da UFT, Campus de Gurupi, usando a metodologia tradicional descrita por Vincent (1970) e Somasegaran & Hoben (1985) e incubados a 28 °C por aproximadamente cinco dias, para posteriores testes de solubilização de fosfatos.

Solubilização de Fosfato de Cálcio e Alumínio

Para a determinação da capacidade de solubilização de fosfatos, foram utilizados dois meios específicos, sendo um para solubilizadoras de fosfato de cálcio (P-Ca), contendo 10 g de glucose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de ágar. Neste meio acrescentou-se uma solução A contendo 5 g de K_2HPO_4 (50 mL de água) e uma solução B contendo 10 g de $CaCl_2$ (100 mL de água), para a formação do fosfato de cálcio precipitado (Hara & Oliveira, 2004), ajustando-se o pH para 6,5. Um segundo meio para verificar a solubilização de fosfato de alumínio (P-Al) continha 10 g de manitol, 2 g de extrato de levedura, 6 g de K_2HPO_4 e 18g de ágar. Neste meio foi acrescentada, também, uma solução contendo 5,34 g de $AlCl_3$, para formar o precipitado de fosfato de alumínio (Hara & Oliveira, 2004), e o pH ajustado para 4,5.

O corante bromocresol verde foi acrescentado no meio P-Al e azul de bromotimol no meio P-Ca, com o objetivo de visualizar a alteração do pH do meio pelas bactérias, em função da alteração da cor do meio.

Os isolados de rizóbio crescidos em meio YMA (pH 5,5), foram repicados para cada meio de solubilização de fosfatos, estabelecendo-se cinco colônias por placa (Figura 1) com duas placas por isolado.

Os isolados foram avaliados por um período de 18 dias, cujas medidas do diâmetro (ϕ) dos halos de solubilização, percebido como uma área translúcida ao redor da colônia, e ϕ das colônias foi mensurada a cada três dias, utilizando-se um paquímetro digital (Figura 1). A partir dessas medidas foram obtidos os índices de solubilização de cada isolado através da fórmula: $IS = \phi \text{ Halo (mm)} / \phi \text{ Colônia (mm)}$ (Berraquero *et al.*, 1976).

Com base nos índices de solubilização, as bactérias foram classificadas como isolados com baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS < 4$) e alta solubilização ($IS > 4$). De acordo com o início da solubilização, as bactérias foram classificadas ainda como precoces, cujo início da solubilização se deu até o terceiro dia, tardias, com início da solubilização depois do terceiro dia e “não solubilizadoras aparentes”, aquelas que não apresentaram solubilização visível até o décimo quinto dia de avaliação.

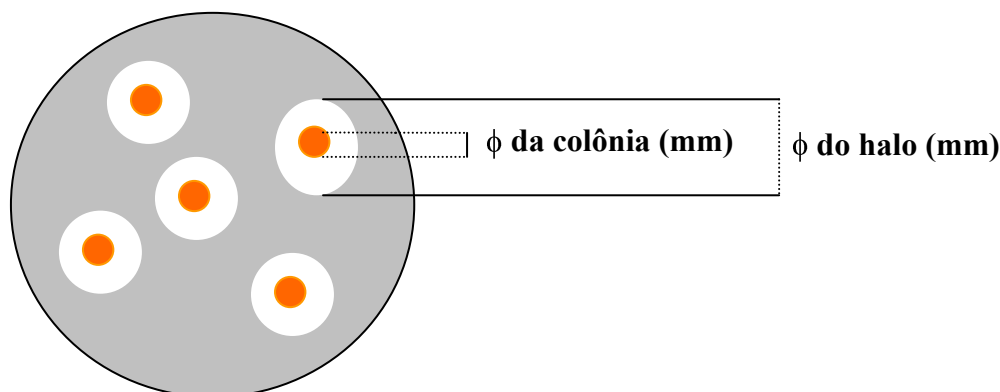


Figura 1. Distribuição das colônias nas placas de Petri para verificação do halo de solubilização como indicativo de solubilização de fosfatos de cálcio e/ou de alumínio.

4.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a solubilização de fosfato, oito isolados (10%), dos 80 estudados, apresentaram halo de solubilização, sendo que o isolado UFT R46 apresentou o maior índice de solubilização final (I.S. = 1,75), porém, considerado como baixo índice de solubilização médio. Os isolados capazes de solubilizar o fosfato de cálcio se comportaram como tardios. Os outros isolados não apresentaram solubilização aparente no período de 18 dias de avaliação (dados não mostrados). Verificou-se que dos isolados com capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, todos diminuíram o pH do meio, provocando uma alteração da sua cor (Tabela 1).

Quanto à solubilização de P-Al, dos 80 isolados estudados, somente o isolado UFT R10 apresentou a capacidade de solubilização, com baixo índice de solubilização, comportamento tardio e acidificação do meio de cultura. Os outros isolados não apresentaram solubilização aparente em meio com P-Al (dados não mostrados).

A capacidade dos isolados de rizóbio solubilizarem o P-Ca está correlacionada com a diminuição do pH do meio pelos ácidos orgânicos ou prótons, conforme descrito por Mikanova & Kubat (1999), Rodríguez & Fraga (1999) e Hara & Oliveira (2004). Os ácidos orgânicos secretados podem diretamente dissolver o fosfato mineral como resultado da troca de ânion de PO_4^{2-} por ânion ácido ou podem quelatar íons de Fe e Al associados com fosfatos. Segundo Mendes & Reis Junior (2003), as bactérias solubilizadoras de fosfatos produzem ácidos orgânicos, tais como, acetato, lactato, oxalato, tartarato, succinato, citrato, gluconato, ketogluconato, glicolato. Em certos casos, a solubilização de fosfatos tem sido verificada pela indução da limitação de P (Graham & Vance, 2000).

Muitos microrganismos solubilizadores de fosfatos têm sido estudados baseados na sua capacidade de solubilizar complexos de P-Ca “*in vitro*”, e o complexo de P-Ca pode ser solubilizado pela redução no pH (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Mendes & Reis Junior, 2003), porém a capacidade de reduzir o pH em alguns casos não está correlacionada com a capacidade de solubilizar fosfatos. Assim, vários fatores podem ter afetado esta relação, entre eles, as quantidades de P imobilizadas pelos microrganismos durante o crescimento (Silva Filho *et al.*, 2002).

A solubilização de P-Al pelo isolado UFT R10 foi acompanhada pelo decréscimo do pH do meio. Assim, a produção de ácidos orgânicos pode ser um dos mecanismos responsável para solubilização de P-Al, mas não o único possível mecanismo para

solubilização, já que em outros estudos (Hara & Oliveira, 2005; Chagas Jr., 2007), isolados de rizóbio alcalinizaram o meio ou não alterou o pH pela não modificação da coloração inicial.

Os dados das Tabelas 1 e 2 mostram que não houve solubilização dos fosfatos por um isolado. A baixa ocorrência de isolados que solubilizaram ambos os fosfatos, tem sido encontrada. Silva Filho & Vidor (2002) citam que a baixa frequência de solubilizadores de P-Al se deve ao fato de inicialmente os isolados serem obtidos em meios contendo o P-Ca para, depois, serem avaliados na presença de P-Al. Essa seqüência no processo de isolamento poderia levar à maior seletividade de microrganismos capazes de solubilizar P-Ca em detrimento de P-Al (Hara & Oliveira, 2004). Para evitar essa possibilidade optou-se por usar meio YMA com pH 5,5 ao se isolar e purificar os rizóbios no presente estudo. Resultados semelhantes foram reportados por Mikanová & Nováková (2002), onde os isolados de rizóbio estudados foram efetivos quanto à solubilização de P-Ca em laboratório, mas a eficiência de solubilização variou entre as estirpes.

Apesar da ocorrência praticamente generalizada de vários microrganismos capazes de solubilizar o fósforo do solo, geralmente, seus números não são altos o suficiente para competir com outros microrganismos presentes na rizosfera. Sendo assim, o P liberado por esses microrganismos, de maneira geral, não é suficiente para uma promoção substancial do crescimento da planta. Porém, considerando bactérias com a capacidade de fixar nitrogênio e solubilizar fosfatos, esta capacidade seria uma vantagem, já que o sucesso obtido com a inoculação de bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* deve-se ao fato de que essas bactérias são capazes de estabelecer uma simbiose com a planta hospedeira, possuindo dessa forma uma vantagem ecológica seletiva sobre os demais microrganismos presentes no solo.

O aumento da disponibilidade de P para as plantas mediante o uso de fontes alternativas desse elemento e da inoculação com rizóbio é extremamente complexo e vai exigir um esforço concentrado de pesquisa. A obtenção de rizóbios com capacidade de solubilização de fosfatos por meio de técnicas convencionais e ou de biologia molecular, não garantirá, por si mesmo, o êxito do programa. O ponto mais crítico será a introdução e o estabelecimento desses microrganismos na rizosfera das plantas, no campo, nas mais variadas situações edafoclimáticas no cerrado no Tocantins.

Tabela 1: Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dos isolados de rizóbio.

Isolados	Início de Solubilização (dia)	I.S. ¹		Solubilização	pH do Meio
		Inicial (mm)	Final (mm)		
UFT R01	12	1,27 (baixo)	1,67 (baixo)	Tardio	Acidificou
UFT R22	18	1,11 (baixo)	1,16 (baixo)	Tardio	Acidificou
UFT R37	9	1,23 (baixo)	1,23 (baixo)	Tardio	Acidificou
UFT R46	12	1,27 (baixo)	1,75 (baixo)	Tardio	Acidificou
UFT R50	12	1,19 (baixo)	1,19 (baixo)	Tardio	Acidificou
UFT R57	9	1,73 (baixo)	1,73 (baixo)	Tardio	Acidificou
UFT R75	15	1,25 (baixo)	1,39 (baixo)	Tardio	Acidificou
UFT R78	9	1,38 (baixo)	1,42 (baixo)	Tardio	Acidificou

¹ Índice de Solubilização**Tabela 2:** Capacidade de solubilização de fosfato de alumínio dos isolados de rizóbio.

Isolados	Início de Solubilização (dia)	I.S. ¹		Solubilização	pH do Meio
		Inicial (mm)	Final (mm)		
UFT R10	18	1,21 (baixo)	1,22 (médio)	Precoce	Acidificou

¹ Índice de Solubilização

4.2.4. CONCLUSÕES

O fosfato de cálcio foi solubilizado por 8 dos 80 isolados de rizóbio, e fosfato de alumínio somente por um, evidenciando uma baixa capacidade de solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio de rizóbios isolados de feijão caupi em solos de cerrado no Tocantins.

4.3. CAPÍTULO III

EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO INOCULADAS EM FEIJÃO-CAUPI NO CERRADO, GURUPI-TO

RESUMO

A interação do feijão-caupi com bactérias fixadoras de N atmosférico pode aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção. No presente trabalho, avaliou-se, no campo, a eficiência agrônômica, através do acúmulo de biomassa da parte aérea, radicular, número e biomassa dos nódulos, eficiência relativa e Produtividade, de cinco estirpes de rizóbio, BR 3302 (UFLA 3-84), BR 3301 (INPA 03-11B), BR 3262, BR 3299 e BR 3267, em simbiose com três cultivares de feijão-caupi (BRS Nova Era, BRS Pujante e Vinagre), mais dois controles, testemunha e Adubado com 50 Kg de N/ha. Observou-se que para cada cultivar a resposta de cada estirpe variou dentro dos parâmetros avaliados. Porém, a estirpe BR 3302 (UFLA 3-84) proporcionou melhores resultados para as três cultivares de feijão-caupi, semelhantes ao tratamento adubado com nitrogênio

Palavras-Chave: *Vigna unguiculata*; Fixação biológica do nitrogênio; Biologia do solo.

EFFICIENCY OF RHIZOBIUM STRAINS OF COWPEA INOCULATED IN THE CERRADO, GURUPI-TO

ABSTRACT

The interaction of cowpea with atmospheric N fixing bacteria can increase productivity and reduce production costs. In this study, it was evaluated in the field, the agronomic efficiency, through the accumulation of biomass of shoot, root, number and biomass of nodules, relative efficiency and productivity of five strains of rhizobia, BR 3302 (UFLA 3-84), BR 3301 (INPA 03-11B), BR 3262, BR 3299 and BR 3267, in symbiosis with three cultivars of cowpea (New Era BRS, BRS vibrant and vinegar), two controls, control and fertilized with 50 Kg of N / ha. It was observed that the response for each cultivar of each strain varied within the parameters evaluated. However, the strain BR 3302 (UFLA 3-84) provided better results for the three cultivars of cowpea, similar to the treatment fertilized with nitrogen.

KEY WORDS: *Vigna unguiculata*; Biological nitrogen fixation, soil Biology.

4.3.1. INTRODUÇÃO

A cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é extremamente rústica, tolerante a altas temperaturas, à seca e com boas condições para adaptação e expansão de áreas exploradas. Apesar de ser considerada uma cultura de subsistência, assume expressiva importância sócio econômica no cenário da agricultura no Norte e Nordeste, constituindo-se na principal fonte de proteína de baixo custo para a alimentação humana, apresentando grande variação entre as cultivares (Bertine *et al.*, 2009).

Historicamente, essa cultura apresenta baixa produtividade, devido às condições de cultivos sem adoção de tecnologias avançadas (Freire Filho *et al.*, 2005). Isto porque em condições de experimento e lavouras com melhor uso de tecnologia, o feijão-caupi tem apresentado alto potencial produtivo, o que em geral não tem sido explorado. Um dos fatores responsáveis pela baixa produtividade é a baixa fertilidade natural e dos teores de matéria orgânica dos solos, especialmente em áreas de cerrado.

A produtividade desta cultura poderia ser aumentada pelo uso de inoculantes de rizóbios eficientes, e assim, poderia suprir as necessidades de nitrogênio da planta (Silva *et al.*, 2006; Zilli *et al.*, 2008), baixando os custos de produção e elevar a renda do produtor. Em experimentos conduzidos em condições de campo, tem se mostrados aumentos nos rendimentos de grãos em tratamentos inoculados com estirpes de rizóbio selecionados (Zilli *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2003; Zilli *et al.*, 2006). Portanto, é imprescindível a difusão desta biotecnologia, de baixíssimo custo, para a cultura do feijão-caupi. No cerrado do Tocantins, entretanto, o uso de inoculantes na cultura do feijão-caupi ainda é muito limitado necessitando de estudos de avaliação da fixação biológica do nitrogênio nesta cultura e da eficiência agrônômica das estirpes de rizóbios nas condições de clima e solo do cerrado.

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da inoculação com estirpes de rizóbio na cultura do feijão-caupi em condições de clima e solo do cerrado no Sul do Tocantins.

4.3.2. MATERIA E MÉTODOS

No período de março a maio de 2009 foram conduzidos três experimentos de campo, inoculando-se sementes de feijão-caupi (cv. BRS Nova Era, BRS Pujante e Vinagre) com estirpes de rizóbio. Os experimentos foram implantados no Campo Experimental da Universidade Federal do Tocantins, no Campus Universitário de Gurupi/TO, localizado a 11° 43' 5 S e 49° 04' W a 280 m, conduzido de acordo com as recomendações da RELARE (Rede de Laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola). O solo da área de cultivo apresentou as seguintes características: (M.O: 22,1g/dm³; pH: 5,4; P: 7,3 mg/dm³; K: 0,2 cmolc /dm³; Ca: 4,2 cmolc /dm³; Mg: 1,71 cmolc /dm³; Al: 0,18 cmolc /dm³, na camada de 0-20 cm de profundidade).

O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados com quatro repetições, com parcelas de 2 m x 2 m e espaçamento da cultura 0,5 m entre linhas e 8-10 plantas por metro linear. Os tratamentos utilizados para cada cultivar de feijão caupi foram: Inoculação com as estirpes BR 3301 (INPA 03-11B), BR 3302 (UFLA 3-84) (oriundas da coleção de culturas do laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras), e BR 3262, BR 3299 e BR 3267 (oriundas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia), adubação nitrogenada (50 kg/ha no plantio) e controle (sem adubação nitrogenada e sem inoculação). Os inoculantes foram fornecidos em veículo turfoso e concentração mínima de rizóbio na ordem de 10⁸ células/g de inoculantes, sendo que a inoculação consistiu da aplicação de uma proporção de 500 g deste inoculante para cada 50 kg de sementes umedecidas em água potável.

Foram avaliadas nos experimentos a massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR), total (MST), número de nódulos (NN) e massa seca dos nódulos (MSN), aos 40 dias após o plantio. Ao final do ciclo, foi avaliada a produtividade de grãos, com umidade corrigida para 13%. Avaliou-se ainda a eficiência relativa (ER) calculada segundo a fórmula: $ER = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ com N}) \times 100$, em que MSPA inoculada é a matéria seca da parte aérea da planta com inoculação e MSPA com N é a matéria seca da parte aérea da planta com N mineral (Lima *et al.*, 2005). Os dados foram submetidos à análise de variância empregando-se o programa de análise estatística ASSISTAT, versão 7.4 beta, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

4.3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados apresentados na tabela 1 mostraram, no experimento 1, com a cultivar Nova Era, que não ocorreram diferenças entre os tratamentos inoculados com as estirpes, BR 3302, BR 3301, BR 3262 e o tratamento adubado com N (uréia) para MSPA e MST, sendo superiores ($p < 0,001$) as estirpes BR 3299 e BR 3267. A estirpe BR 3262 foi a única que se mostrou superior quanto a MSR em relação ao tratamento com adubação, apesar de não diferir significativamente das estirpes BR 3302, BR 3301 e BR 3267. Para o NN, os menores valores, entre os tratamentos inoculados, foram encontrados para o tratamento com a estirpe BR 3267, apesar de não diferir significativamente das estirpes BR 3301 e BR 3302. Para MSN as estirpes BR 3302, BR 3301 e BR 3262 foram superiores ($p < 0,001$). Em relação à produtividade, foi observado que as estirpes BR 3302 proporcionou rendimento superior aos outros tratamentos inoculados, porém com valores semelhantes ao tratamento adubado com uréia e a testemunha. As estirpes BR 3302, BR 3262 e BR 3301 contribuíram para a eficiência relativa (ER) superior em relação aos demais tratamentos, porém similar ao tratamento adubado (Figura 1).

Para a cultivar Pujante (experimento 2), a estirpe BR 3302 foi superior ($p < 0,001$) aos outros tratamentos para MSPA e MST. Quanto a MSR, as estirpes BR 3262 e BR 3267 apresentaram valores inferiores aos outros tratamentos. Para o NN todas as estirpes apresentaram nodulação superior aos tratamentos adubado e testemunha, da mesma forma para MSN com o menor valor entre as estirpes para BR 3262. Para a MSN o menor valor foi encontrado para a estirpe BR 3262. Em relação a produtividade, as estirpes BR 3302, BR 3301 e BR 3262 apresentaram mais de 800 kg por hectare, sendo significativamente superiores ao tratamento adubado (Tabela 1). Para a ER, destaque para a estirpe BR 3302, com valores superiores aos outros tratamentos (Figura 1).

Para a variedade Vinagre (experimento 3), foi observados valores superiores ($p < 0,001$) para MSPA e MST para as estirpes BR 3302 e BR 3262. Para a MSR destaque para as estirpes BR 3302 e BR 3299. Em relação ao NN as estirpes BR 3302, BR 3301 e BR 3299 foram superior ($p < 0,01$). Já a MSN não houve diferença significativa entre as estirpes utilizadas, com destaque para BR 3301, BR 3262 e BR 3267. Todas as estirpes proporcionaram produtividades significativamente superiores aos tratamentos testemunha e adubado (Tabela 1), com o maior valor para BR 3302. Para a ER os maiores valores foram apresentados para as estirpes BR 3302 e 3262 (Figura 1).

O feijão caupi é capaz de nodular com diversas espécies de bactérias do grupo rizóbio, especialmente do gênero *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Zilli *et al.*, 2006; Rumjanek *et al.*, 2005). Esta característica, apesar de representar uma vantagem ecológica para a adaptação deste vegetal, é um fator limitante ao uso de inoculantes em sistemas agrícolas (Xavier *et al.*, 2006). Isto porque normalmente a cultura apresenta baixa especificidade de nodulação.

Desta forma, apesar de ser uma das leguminosas com maior capacidade em fixar nitrogênio atmosférico nos sistemas agrícolas, a ocorrência de nodulação espontânea e, principalmente, a falta de resultados positivos em condições de campo, faz com que a prática de inoculação ainda não seja amplamente usada para esta cultura no Brasil (Zilli *et al.*, 2008).

A estirpe BR 3302 mostra uma constante na relação MSPA, MSR, MST, NN, MSN, ER e produtividade, para a cultura Nova Era no experimento 1, com valores próximo ao tratamento adubado, tornando visível a resposta positiva desta cultivar a esta estirpe.

Para a cultivar Pujante e Vinagre, também foi observado resultados satisfatórios com a inoculação da estirpe BR 3302, com produtividade cerca de 22 e 11% superior ao tratamento adubado.

Algumas estirpes, entre elas BR 3302, BR 3301, BR 3267 e BR 3262, foram testadas em outros trabalhos (Zilli *et al.*, 2008) mostraram bom desempenho, tanto de eficiência quanto competitividade.

As maiores produtividades, ocorreram nas cultivares Pujante e Vinagre inoculados com a estirpe BR 3302. Na média geral dos três experimentos, foram observadas produtividades de grãos de feijão caupi de 743 e 826 kg ha⁻¹ para os tratamentos com adubação nitrogenada e o tratamento inoculado com a estirpe BR 3302, respectivamente, sendo as médias obtidas nesses tratamentos significativamente superiores ao controle. Porém, as médias de produtividades do feijão caupi inoculado foram inferiores aos encontrados em trabalhos de campos em outras regiões (Zilli *et al.*, 2008). Mas, os experimentos em outras regiões receberam adubação de plantio com fósforo, potássio e micronutrientes, o que não ocorreu neste experimento, visando à realidade dos produtores na região de cerrado no Sul do Tocantins.

De acordo com os dados obtidos, respostas positivas de inoculação mais facilmente serão obtidas em áreas com baixa população de rizóbio nodulantes de feijão caupi

estabelecidas no solo, fato que ocorreu onde foram implantados os experimentos, tendo o tratamento controle uma baixa nodulação.

Considerando que os solos onde foram implantados os experimentos apresentavam limitações quanto à fertilidade, a produtividade da cultura de feijão caupi obtida com inoculação foi expressiva em relação ao tratamento controle, mostrando a possibilidade de aumento da produtividade de grãos de feijão caupi por parte dos agricultores com a adoção da tecnologia de inoculação. Porém, existe necessidade de experimentos de inoculação com adubação de plantio, visando aumento da produtividade.

Tabela 1: Biomassa, nodulação e produtividade de feijão caupi Cultivar Nova Era, Pujante e Vinagre, inoculado com estirpes de rizóbio. Experimentos 1, 2 e 3.

Isolados/ estirpes	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	NN ⁽²⁾	MSN (mg) ⁽²⁾	Prod. ⁽⁴⁾ kg ha ⁻¹
Experimento 1: Cultivar Nova Era						
BR 3302 (UFLA 3-84)	14,09 a	1,27 a b	14,36 a	27 a b	427 a b	680 a
BR 3301 (INPA 3-11B)	13,02 a b	0,99 a b	14,01 a	25 a b	420 a b	590 c
BR 3262	14,22 a	1,38 a	15,60 a	33 a	483 a	513 d
BR 3299	8,25 c	0,98 b c	9,23 c	36 a	108 d	520 d
BR 3267	9,91 b c	1,33 a b	11,24 b c	18 b	400 b	647 b c
Testemunha	8,29 c	0,69 d	8,98 c	2 c	7,3 e	653 b c
Adubado	14,06 a	0,95 b c	15,01 a	1 c	0,5 e	693 a
CV (%) ⁽³⁾	17,14	22,99	16,05	34,93	15,74	7,43
Experimento 2: Cultivar Pujante						
BR 3302 (UFLA 3-84)	19,53 a	0,72 a b	20,25 a	27 a	425 a	888 a
BR 3301 (INPA 3-11B)	14,74 b	0,81 a b	15,65 b c	34 a	466 a	848 a b
BR 3262	11,41 c	0,64 a b	12,05 d e	30 a	181 b	815 a b
BR 3299	8,49 d	0,74 a b	9,23 f	34 a	492 a	753 c d
BR 3267	11,36 c	0,65 a b	12,01 d e	24 a	423 a	783 b c
Testemunha	15,74 b	0,71 a b	16,45 b	3 b	8,8 c	646 e
Adubado	16,08 b	0,87 a	16,95 b	1 b	7,3 c	723 c d
CV (%)	9,52	20,94	9,42	31,96	35,01	6,38
Experimento 3: Cultivar Vinagre						
BR 3302 (UFLA 3-84)	15,68 a	0,91 a	16,59 a	33 a	428 b	910 a
BR 3301 (INPA 3-11B)	12,85 b	0,54 b c	13,39 b	36 a	475 a b	838 a b
BR 3262	15,93 a	0,63 b c	16,56 a	18 b	554 a	855 a b
BR 3299	10,90 b c	0,75 a b	11,65 b c	26 a b	457 b	905 a
BR 3267	9,88 c	0,64 b c	10,52 c d	21 b	507 a b	865 a b
Testemunha	10,95 b c	0,81 a b	11,76 b c	4 c	49 c	763 c
Adubado	11,49 b c	0,61 b c	12,10 b c	2 c	7,3 c	813 b c
CV (%)	11,65	25,31	11,15	32,30	25,2	6,42

(1) Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Duncan a 5%. (2) Dados transformados por $X + 0,5$. (3) Coeficiente de Variação. (4) Prod.= Produtividade.

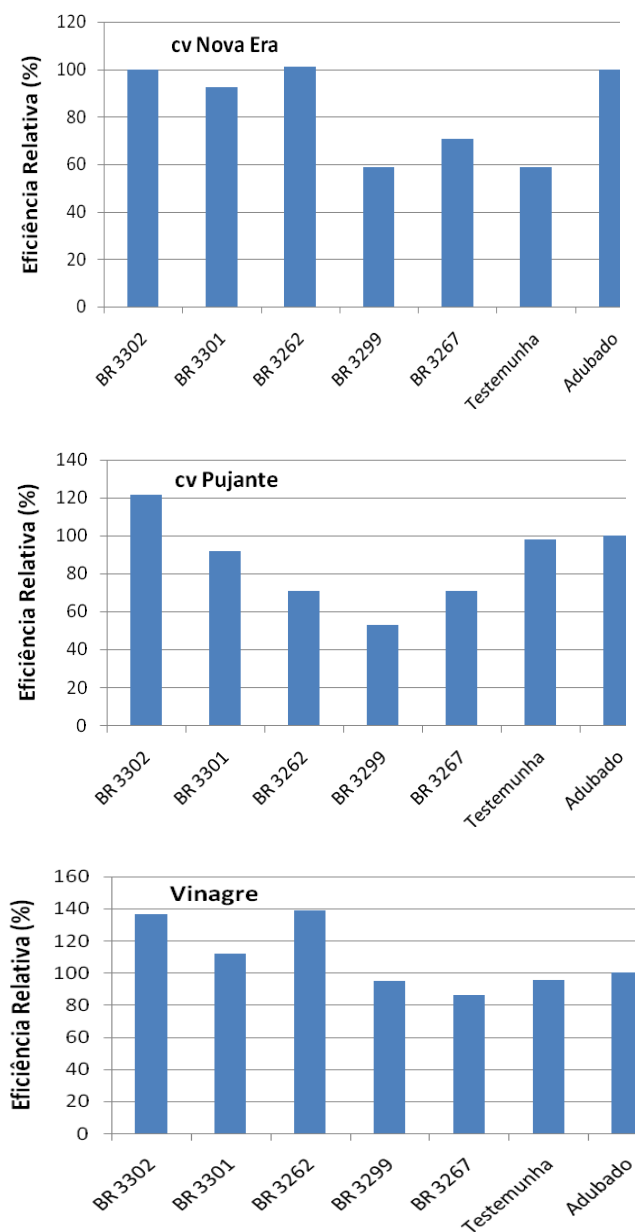


Figura 1: Eficiência Relativa de feijão caupi Cultivar Nova Era, Pujante e Vinagre, dos tratamentos inoculados com estirpes de rizóbios e testemunha, em relação ao tratamento adubado com nitrogênio (uréia). Experimentos 1, 2 e 3.

4.3.4. CONCLUSÕES

A estirpe BR 3302 (UFLA 3-84) proporcionou melhores resultados para as três cultivares de feijão-caupi, semelhantes ao tratamento adubado com nitrogênio, porém ainda é preciso a realização de outros experimentos para avaliar melhor seu potencial.

5. BIBLIOGRAFIAS CITADAS

- Aita, C.; Giacomini, S.J. 2007. Uso eficiente de fertilizantes nitrogenados e sulfatados na agricultura brasileira: uma visão do futuro. *In: Yamada, T.; Stipp, S.R.; Vitti, A.G.C. (Eds.). Simpósio sobre nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira* (2006: Piracicaba, SP). pg. 161-188.
- Alves, B.J.R.; Boddey, R.M.; Urquiaga, S. 2003. The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and Soil*, 252:1-9.
- Andrade, D.S.; Murphy, P.J.; Giller, K.E. 2002. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. *Soil Biol. & Biochem.*, 34:477-485.
- Andrade Junior, A.S.; Santos, A.A.; Sobrinhos, C.A.; Bastos, E.A.; Melo, F.B.; Viana, F.M.P.; Filho, F.R.F.; Carneiro, J.S.; Rocha, M.M.; Cardoso, M.J.; Silva, P.H.S.; Ribeiro, V.Q. 2003. *Cultivo do feijão caupi*. Embrapa. Sistema de Produção, 2. Versão Eletrônica. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br> . Acesso em 02/06/2005.
- Barreto, P. D.; Dynia, J. F. Sistema de produção de caupi em monocultura no trópico semi-árido brasileiro. *In: ARAÚJO, J. P. P. de; WALT, E. E. (Org.). O caupi no Brasil*. 1. ed. Brasília: EMBRAPA-DPU, 1988. p. 390-391.
- Barroso, C.B.; Nahas, E. 2008. Solubilização de fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(4):529-535.
- Batista, J.S.S.; Hungria, M.; Barcellos, F.G.; Ferreira, M.C.; Mendes, I.C. 2007. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. *Microbial Ecology*, 53(2):270-284.
- Batzli, J.M.; Graves, W.R.; Berkum, P. 1992. Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. *App. Environm. Microbiol.*, 58:2137-2143.
- Berraqueiro, F.R.; Baya, A.M.; Cormenzana, A.R. 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilizacion de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars. Pharmaceutica*, 17(4):399-406.
- Bertine, C.H.C.M.; Teófilo, E.M.; Dias, F.T.C. 2009. Divergência genética entre acessos de feijão caupi do banco de germoplasma da UFC. *Revista Ciência Agronômica*, 40(1):99-105.
- Broughton, W.J.; Zhang, F.; Perret, X.; Staehelin, C. 2003. Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil*, 252:129-137.
- Campo, R.J.; Wood, M. 2001. Residual effects of successive exposure of soybean *Bradyrhizobium* strains to aluminum on solid defined medium. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 36(11):1399-1407.

- Chagas Jr., A.F. 2007. Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas - UFAM/ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. 157p.
- Chen, W.M.; Faria, S.M.; Stralio, R.; Pitard, R.M.; Simões-Araújo, J.L.; Chou, J.F.; Chou, Y.J.; Barrios, E.; Prescott, A.R.; Elliott, G.N.; Sprent, J.I.; Young, J.P.W., James, E.K. 2005. Proof that *Burkholderia* strains from effective symbioses with legumes: a study of novel mimosa-nodulation strains from South America. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11):7461-7471.
- Coutinho, H.L.C.; Oliveira, V.M.; Lovato, A.; Maia, A.H.N.; Manfio, G.P. 1999. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Applied Soil Ecology*, 13(2):159-167.
- Cravo; M.S.; Souza, B.D.L. 2007. Sistemas de cultivo de feijão-caupi na Amazônia. In: Zilli, J.E.; Vilarinho, A.A.; Melo, V.F. (Eds.). Workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima. Boa Vista, RR. Embrapa Roraima. p.6-14. (Embrapa Roraima. Documentos, 4).
- Dantas, J.P.; Marinho, F.J.L.; Ferreira, M.M.M.; Amorim, M.S.N.; Andrade, S.I.O.; Sales, A.L. 2002. Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, 6(3):425-430.
- Deshwal, V.K.; Dubey, R.C.; Maheshwari, D.K. 2003. Isolation of plant growth-promoting strains of *Bradyrhizobium (Arachis)* sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. *Current Science*, 84(3):443-448.
- Eady, R. R.; Postgate, J. R. Nitrogenase. *Nature*, n. 249, p. 805-810, 1974.
- EMBRAPA. 1997. *Manual de métodos de análise de solo*. 2ª edição. CNPS /EMBRAPA. 212p.
- Ferreira, P.A.A.; Vale, H.M.M.; Pereira, J.P.A.R.; Florentino, L.A.; Moreira, F.M.S. 2005. Eficiência de estirpes selecionadas e diversidade fenotípica de populações de rizóbio nativos que nodulam o caupi (*Vigna unguiculata* L.) em Iguatama, MG. In: XXX Congresso Brasileiro de Ciências do Solo. Anais ...Recife. CD ROOM.
- Franco, A.A.; Balieiro, F.C. 1999. Fixação biológica do nitrogênio: Alternativa aos fertilizantes nitrogenados. In: Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.G.; Faquin, V.; Furtini Neto, A.E.; Carvalho, J.G. (eds.). *Inter-Relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas*. Viçosa:SBCS, Lavras:UFLA/DCS. p. 577-595.
- Franco, E.; Andrade, C.A.B.; Scapim, C.A.; Freitas, S.L. 2008. Resposta do feijoeiro à aplicação de nitrogênio na semeadura e cobertura no sistema de plantio direto. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 30(3):427-434.
- Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V.Q. 2005. *Feijão caupi: avanços tecnológicos*. Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V.Q (eds.). Brasília, DF. Embrapa Informações Tecnológicas. 519p.

- Freire Filho, F.R.; Ribeiro, V.Q.; Santos, A.A. 2000. Cultivares de caupi para a região Meio-Norte do Brasil. *In: Cardoso, M.J. (Org.). A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil.* Teresina: Embrapa Meio-Norte, 246p. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28).
- Freire Filho, F.R.; Vilarinho, A.A.; Cravo, M.S.; Cavalcante, E.E. 2007. Panorama da cultura do feijão-caupi no Brasil. *In: Zilli, J.E.; Vilarinho, A.A.; Melo, V.F. (Eds.). Workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima.* Boa Vista, RR. Embrapa Roraima. p.1-5. (Embrapa Roraima. Documentos, 4).
- Freitas, A.D.S.; Vieira, C.L.; Santos, C.E.R.S.; Stamford, N.P.; Lyra, M.C.C.P. 2007. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia*, 66(3):497-504.
- Fuhrmann, J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean *Bradyrhizobium* as related to serological, morphological, rhizobitoxine and hydrogenase phenotypes. *Appl. Environm. Microbiol.*, Washington, v. 56, p. 224-229.
- Garrity, G. M.; Holt, J. G. 2001. The road map to the *Manual*. *In: BOONE, D. R.; CATENHOLZ, R. W.,(eds.). Bergey's manual of systematic bacteriology.* New York: Springer-Verlag, 2001. v.1, p. 119-166.
- Germano, M.G.; Galli-Terasawa, L.V.; Chueire, L.M.O.; Hungria, M.; Bangel, E.V.; Campo, R.J. 2003. Identificação de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* / *B. elkanii* mais eficientes e competitivas para a cultura da soja e avaliação das respostas à reinoculação em áreas com populações estabelecidas distintas de *Bradyrhizobium*. *In: Hoffmann-Campo, C.B.; Saraiva, O.F. (eds). Resultado de Pesquisa da Embrapa Soja – 2002. Microbiologia do Solo..* Londrina, Embrapa Soja. p. 42-59. (Embrapa Soja. Documentos, 216).
- Graham, P.H.; Vance, C.P. 2000. Nitrogen fixation in perspective: An overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65:93-106.
- Gyaneshwar, P.; Kumar, G.N.; Parekh, L.J.; Poole, P.S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plant. *Plant and Soil*, 245:83-93.
- Hameed, S.; Yasmin, S.; Malik, K.A.; Zafar, Y.; Hafeez, F.Y. 2004. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. *Biol. Fertil. Soils*, 39:179-185.
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A. 2004. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazônica*, 34(3):343-357.
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A. 2005. Características fisiológicas e ecológicas de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 40(7):667-672.
- Hungria, M.; Vargas, M.A.T.; Araújo, R.S. 1997. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. *In: Vargas, M.A.T.; Hungria, M., (eds). Biologia dos Solos do Cerrado.* Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 187-294.

- Hungria, M.; Vargas, M.A.T. 2000. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65:151-164.
- Hungria, M.; Chueire, L.M.O.; Coca, R.G.; Megías, M. 2001a. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1349-1361.
- Hungria, M.; Campo, R.J. 2005. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, XXX, 2005, Recife, Anais Recife. 2005. Palestra. CD ROOM.
- Igual, J.M.; Valverde, A.; Cervantes, E.; Velázquez, E. 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, 21:561-568.
- Illmer, P.; Barbato, A.; Schinner, F. 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, 27(3):265-270.
- Jesus, E.C.; Moreira, F.M.S.; Florentino, L.A.; Rodrigues, M.I.D.; Oliveira, M.S. 2005. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 40(8):769-775.
- Jordan, D.C. 1984. Family III Rhizobiaceae. In: Kriegel, N.R.; Holt, J.G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 234-256.
- Kim, J.; Rees, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, n. 33, p. 389-397, 1994.
- Kim, K.Y.; Jordan, D.; McDonald, G.A. 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria and microbial activity in soil: Effect of carbon sources. *Soil Biol. Biochem.*, 30:995-1003.
- Kovach Computing Services, 2009. Multi-Variate Statistical Package. Virginia, USA. Disponível Online: www.kovcomp.co.uk/mvsp/. Acesso em: abril de 2009.
- Lacerda, A.M.; Moreira, F.M.S.; Magalhães, F.M.M.; Andrade, M.J.B. de; Soares, A.L. de E.L. 2004. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade de feijão caupi. *Rev. Ceres*, 51:67-82.
- Lima, A.S.; Pereira, J.P.A.R.; Moreira, F.M.S. 2005. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 40(11):1095-1104.
- Liu, J.; Wang, E.T.; Chen, W.X. 2005. Diverse rhizobia associated with wood legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of the China. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(5):465-477.

- Lopes, A.S.; Silva, C.A.P.; Bastos, A.R.R. 2004. Reservas de fosfatos e produção de fertilizantes fosfatados no Brasil e no Mundo. In: Yamada, T.; Abdalla, S.R.S. (Eds.). Fósforo na Agricultura Brasileira. Piracicaba: POTAFOS. p. 13-34.
- Martins, L.M.V. 1996. Características ecológicas e fisiológicas de rizóbios de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil. 213p. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica. (Dissertação de Mestrado).
- Martins, L.M.V.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 1997a. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, 29(5/6):1005-1010.
- Martins, L.M.V.; Xavier, G.R.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 1997b. *Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio"*. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. 14p. (Embrapa-CNPAB. Comunicado Técnico nº 19).
- Martins, L.M.V.; Xavier, G.R.; Rangel, F.W.; Ribeiro, J.R.A.; Neves, M.C.P.; Morgado, L.B.; Rumjanek, N.G. 2003. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the Semi-Arid Region of Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, 38(5):333-339.
- Mendez, I.C.; Reis Junior, F.B. 2003. Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 26p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 85).
- Mengel, K. Symbiotic dinitrogen fixation: its dependence on plant nutrition and its ecophysiological impact. *Bodenk*, v. 157, p. 233-241, 1994.
- Menezes, A.C.S.G.; Zilli, J.E.; Vilarinho, A.A.; Galvão, A.; Messias, O.I. 2007. Importância sócio-econômica e condições de cultivo do feijão-caupi em Roraima. In: Workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima, Boa Vista, 2007. Anais ... Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. p. 12-30 (Embrapa Roraima. Documentos, 4).
- Mercante, F. M. A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio. Centro Nacional de Pesquisa de Biologia do Solo, 1992. 8 p. (CNPBS. Comunicado Técnico, 10).
- Mikanová, O.; Kubat, J. 1999. Practical use of P-solubilization activity of *Rhizobium* species strains. *Rostlinná Výroba*, 45(9):407-409.
- Mikanová, O.; Nováková, J. 2002. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostlinná Výroba*, 48(9):397-400.
- Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. 2002. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras:UFLA. 626p.
- Mostasso, L.; Mostasso, F.L.; Dias, B.G.; Vargas, M.A.T.; Hungria, M. 2002. Selection on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Research*, 73:121-132.

- Mullen, M.D.; 2005. Phosphorus and other elements. In: Sylvia, D.M.; Hartel, P.G.; Fuhrmann, D.A. (Eds.). Principles and applications of soil microbiology. New Jersey: Prentice-Hall. p. 463-488.
- Nahas, E. 2002a. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia*, Campinas, 61(3):267-275.
- Nahas, E. 2002b. Factors affecting the solubilization of insoluble phosphate. In: International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca, Spain. Abstract... Salamanca. p. 20-22.
- Neves, M.C.P; Martins, L.M.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G. 1998a. *Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (Vigna unguiculata) em solos do Nordeste do Brasil. I. Sertão*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 10p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 46).
- Neves, M.C.P; Martins, L.M.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G. 1998b. *Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (Vigna unguiculata) em solos do Nordeste do Brasil. II. Zona da Mata*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 8p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 47).
- Newton, W.E. 2000. Nitrogen fixation in perspective. In: Pedrosa, F.O.; Hungria, M.; Yates, M.G.; Newton, W.E. (Eds.). *Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Oliveira Junior, J.O.; Medeiros, R.D.; Silva, P.R.V.P.; Smiderle, O.J. 2002. Técnicas de manejo para o cultivo do caupi em Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 19p. (Embrapa Roraima: Circular Técnica, 03).
- Oliveira, A.L.M.; Urquiaga, S.; Baldani, J.I. 2003. *Processos e mecanismos envolvidos na influencia de microrganismos sobre o crescimento vegetal*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Ago. 2003. 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).
- Pereira, E.G. 2000. *Diversidade de rizóbio isolados em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia*. 93 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Pereira, J.P.A.R.; Ferreira, P.A.A.; Vale, H.M.M.; Nogueira, C.G.; Soares, A.L.L.; Moreira, F.M.S.; Andrade, M.J.B. 2004. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* cultivar Poços de Caldas por estirpes selecionadas de rizóbio no Município Iguatama. FERTIBIO, 2004, Lages, SC. Resumo expandido. CD ROOM.
- Quin, F.M. 1997. Introduction. In: Sing, B.B.; Mohan, Raj, D.R.; Dashiel, K.E.; Jackai, L.E.N. (Eds.). Advances In cowpea research. Ibadan: IITA-Jircas, p.9-25.
- Ramirez, M.E.; Israel, D.W.; Wollum II, A.G. 1997. Phenotypic and genotypic diversity of similar serotypes of soybean *Bradyrhizobium* from two soil populations. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 29:1539-1545.

- Relare. 2004. Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola. Disponível em: <HTTP:// relare.org.br>. Acesso em: abril de 2004.
- Rodríguez, H.; Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Research Review Paper. *Biotechnology Advances*, 17:319-339.
- Rumjanek, N.G.; Martins, L.M.V.; Xavier, G.R.; Neves, M.C.P. 2005. Fixação biológica do nitrogênio. In: Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V.Q. (Eds.). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas. p. 281-335.
- Saleena, L.M.; Loganathan, P.; Rangarajan, S.; Nair, S. 2001. Genetic diversity and relationship between *Bradyrhizobium* strains isolated from blackgram and cowpea. *Biology and Fertility of Soil*, 34(4):276-281.
- Santos, C.E.R.S.; Stamford, N.P.; Neves, M.C.; Rumjanek, N.G.; Borges, R.V.; Freitas, A.D.S. 2007. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 2(4):249-256.
- Silva Filho, G.N.; Vidor, C. 2002. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:311-319.
- Silva Filho, G.N.; Vidor, C. 2001. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesq. Agropec. Bras.* 36(12):1495-1508.
- Silva, V.N.; Silva, L.E.S.F. & Figueiredo, V.B. 2006. Atuação de rizóbio com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp). *Acta Scientiarum Agronomy*, 28(3): 407-412.
- Silva, A.F.; Nascimento, L.R.S.; Santos, C.E.R.S.; Freitas, A.D.S.; Lyra, M.C.C.P.; Sampaio, E.V.S.B. 2005. Isolamento e caracterização morfofisiológica de isolados de rizóbio em associação com caupi oriundos do Estado da Paraíba. In: XXX Congresso Brasileiro de Ciências do Solo. Anais ...Recife. CD ROOM.
- Somasegaran, P.; Hoben, H. J. 1985. *Methods in legume-Rhizobium technology*. NifTAL Project and MIRCEN, Hawaii, 365p.
- Son, H.J.; Park, G.T.; Cha, M.S.; Heo, M.S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 97:204-210.
- 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. 2006. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – *Caupi*. *R. Bras. Ci. Solo*, 30(5):795-802.

- Souchie, E.L.; Azcón, R.; Barea, J.M.; Saggin-Junior, O.J.; Silva, E.M.R. 2006. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(9):1405-1411.
- Souchie, E.L.; Abboud, A.C.S.; Caproni, A.L. 2007. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. *Bioscience Journal*, 23(2):53-60.
- Sousa, D.M.G.; Lobato, E. 2004. Adubação fosfatada em solos da região do cerrado. In: Yamada, T.; Abdalla, S.R.S. (Eds.). *Fósforo na Agricultura Brasileira*. Piracicaba: POTAFOS. p. 1-12.
- Spera, S.T.; Correia, J.R.; Reatto, A. 2006. Solos do Bioma Cerrado: propriedades químicas e físico-hídricas sob uso e manejo de adubos verdes. In: Carvalho, A.M.; Amabile, R.F. (Eds.). *Cerrado: adubação verde*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 41-70.
- Stamford, N. P.; Neptune, A. M. L. 1979. Especificidade hospedeira e competição entre estirpes de *Rhizobium* em inoculação cruzada com quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Cad. Omega**, Recife, n. 3, p. 25-34.
- Stamford, N.P.; Santos, C.E.R.S.; Santos, P.R.; Santos, K.S.R.; Montenegro, A. 2005. Effects of rock phosphate, sulphur with and without *Acidithiobacillus* and organic by-products on mimosa (*Mimosa caesalpiniiifolia*) grown in a Brazilian tableland soil *Trop. Grass. Brisbane*, 39:54-61.
- Straliootto, R.; Rumjanek, N.G. 1999. *Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) e os principais fatores que afetam a simbiose*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 51p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 94).
- Stauffer, M.D.; Sulewski, G. 2004. Fósforo – Essencial para a Vida. In: Yamada, T.; Abdalla, S.R.S. (Eds.). *Fósforo na Agricultura Brasileira*. Piracicaba: POTAFOS. p. 1-12.
- Swelim, D.M.; Hashem, F.M.; Kuykendall, L.D.; Hegazi, N.I.; Abdel-Wahab, S.M. 1997. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. *Biol. Fertil. Soils*, 25:224-232.
- Vasconcelos, I.; Alves, J. F.; Lima, I. T. Nodulação de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., ao longo do ciclo cultural da planta. *Ciencia Agronomica, Fortaleza*, v. 6, n. 1/2, p. 11-15, 1976.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255:571-586.
- Vieira, 2007. Efeito de estirpes de rizóbio em cultivares de caupi do agreste paraibano. Recife. Universidade Federal de Pernambuco. 39p. (Dissertação de Mestrado).
- Vincent, J. M. 1970. *A manual for practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook N. 15. Blackwell Scient. Publ. 140p.

- Wakelin, S.A.; Warren, R.A.; Harvey, P.R.; Ryder, M.H. 2004. Phosphate solubilization in solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 40:36-43.
- Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, New York, 69:99-151.
- Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 1998. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. *Biol. Fertil. Soils*, 27:386-392.
- Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Zilli, J.E.; Peixoto, R.C.; Rumjanek, N.G. 1997. *Protocolo operacional cultivo de planta-isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulo de planta-isca*. Seropédica: Embrapa-Agrobiologia, Dez. 1997. 7p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 43).
- Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Rumjanek, N.G.; Freire Filho, F.R. 2005. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. *Pesq. Agropc. Bras.*, 40(4):15-19.
- Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Ribeiro, J.R.A.; Rumjanek, N.G. 2006. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Revista Caatinga*, 19(1):25-33.
- Xin, C.; Jian-Jun, T.; Zhi-Guo, F.; Shui-Jin, H. 2002. Phosphate-solubilizing microbes in rhizosphere soil of 19 weeds in Southeastern China. *Journal of Zhejiang University Science*, 3:355-361.
- Zapata, F.; Axmann, H. 1995. ^{32}P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate material. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 41:189-195.
- Zhang, W.T.; Yang, J.K.; Yuan, T.Y.; Zhou, J.C. 2007. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Biology and Fertility of Soil*, 44(1):201-210.
- Zilli, J.E.; Almeida, D.L.; Rumjanek, N.G.; Neves, M.C.P. 1998. *Levantamento da biodiversidade de rizóbio em diferentes áreas de um sistema integrado de produção agroecológica*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 15p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 69).
- Zilli, J.E.; Rumjanek, N.G.; Freire Filho, G.R. Neves, M.C.P. 2000. *Levantamento de rizóbios isolados de nódulos de caupi cultivado em amostras de solos do Cerrado do Estado do Piauí*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 23p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 125).
- Zilli, J.E.; Valisheski, R.R.; Freire Filho, F.R.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 2004. Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. *Brazilian J. Microbiol.*, 35:281-287.

- Zilli, J.E.; Valicheski, R.R.; Rumjanek, N.G.; Simões-Araújo, J.L.; Freire Filho, F.R.; Neves, M.C.P. 2006. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isolados de solo do Cerrado em caupi. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41(5):811-818.
- Zilli, J.E.; Vilarinho, A.A.; Araújo, W.F.; Melo, V.F. 2007. Workshop sobre a cultura do feijão-caupi. Boa Vista, RR. Embrapa Roraima. 88p. (Embrapa Roraima. Documentos, 4).
- Zilli, J.E.; Xavier, G.R. Rumjanek, N.G. 2008. BR 3262: Nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a inoculação de feijão-caupi em Roraima. Embrapa Roraima. 7p. (Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, 10).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)