

# SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

## EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE RIZÓBIOS SELECIONADOS E DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES NATIVAS NODULÍFERAS EM PERDÕES (MG). I – CAUPI<sup>(1)</sup>

André Luis de Lima Soares<sup>(2)</sup>, João Paulo Andrade Resende Pereira<sup>(3)</sup>,  
Paulo Ademar Avelar Ferreira<sup>(3)</sup>, Helson Mário Martins do Vale<sup>(4)</sup>,  
Adriana Silva Lima<sup>(5)</sup>, Messias José Bastos de Andrade<sup>(6)</sup> & Fátima  
Maria de Souza Moreira<sup>(7)</sup>

### RESUMO

O caupi (*Vigna unguiculata* L.) é de grande importância nutricional, social, econômica e estratégica, principalmente para as regiões Norte e Nordeste, e vem ultrapassando as barreiras regionais, com amplas perspectivas no agronegócio brasileiro. A interação do 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 agronômica de estirpes previamente selecionadas de rizóbio em simbiose com o caupi, comparadas à estirpe recomendada até 2004, para a produção de inoculantes comerciais (BR 2001). Posteriormente, a diversidade fenotípica das populações nativas foi avaliada pela análise das características culturais e pela análise de proteína total por eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE). Verificou-se que a inoculação no campo com as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B contribuiu, de forma significativa, para o aumento no rendimento de grãos, sendo semelhante ao da testemunha, com 70 kg ha<sup>-1</sup> de N, e superior ao da estirpe BR 2001. A população nativa apresentou alta diversidade fenotípica cultural e de padrões protéicos. As estirpes inoculadas foram bastante distintas fenotipicamente de estirpes que compõem a população nativa.

**Termos de indexação:** *Vigna unguiculata*, *Bradyrhizobium*, fixação biológica de N<sub>2</sub>, produtividade.

---

<sup>(1)</sup> Artigo retirado de dissertação de Mestrado e recebido para publicação em julho de 2005 e aprovado em setembro de 2006.

<sup>(2)</sup> Mestre em Solos e Nutrição de Plantas – UFLA. Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras (MG). Bolsista do CNPq. E-mail: andrellsoares@hotmail.com

<sup>(3)</sup> Engenheiro-Agrônomo, Agronomia, UFLA. Bolsistas PIBIC/CNPq. E-mails: pauloufla@yahoo.com.br; joaopauloufla@yahoo.com.br.

<sup>(4)</sup> Mestrando em Microbiologia Agrícola, UFLA. Bolsista da CAPES. E-mail: helsomario@yahoo.com.br

<sup>(5)</sup> Doutoranda em Solos e Nutrição de Plantas, UFLA. Bolsista da CAPES. E-mail: adrianalima@navinet.com.br

<sup>(6)</sup> Professor do Departamento de Agronomia, DAG/UFLA. Bolsista do CNPq. E-mail: mandrade@ufla.br

<sup>(7)</sup> Professora do Departamento de Ciência do Solo, DCS/UFLA. Bolsista do CNPq. E-mail: fmoreira@ufla.br

**SUMMARY:** *AGRONOMIC EFFICIENCY OF SELECTED RHIZOBIA STRAINS AND DIVERSITY OF NATIVE NODULATING POPULATIONS IN PERDÕES (MG - BRAZIL). I – COWPEA*

*Cowpea (Vigna unguiculata L.) is one of the main food crops in the north and northeast of Brazil nowadays, being planted on large areas in other Brazilian regions as well, with bright prospects in the Brazilian agribusiness. Symbiosis of cowpea and nitrogen-fixing bacteria (NFB) can raise yields and decrease yield costs. The first aim of this study was to evaluate the agronomic efficiency of previously selected rhizobia strains compared to the strain recommended until 2004 (BR 2001). The phenotypic diversity of native rhizobia populations was evaluated by cultural characteristics and analysis of total protein profiles by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In field inoculations with strains UFLA 03-84 and INPA 03-11B grain yields increased similarly as in the control treatment with 70 kg ha<sup>-1</sup> N-urea and outmatched the treatment with BR 2001 inoculation. Native cowpea-nodulating populations have a high phenotypic diversity and do not resemble the strains introduced as inoculants.*

*Index terms:* Vigna unguiculata, Bradyrhizobium, biological N<sub>2</sub> fixation, yield.

## INTRODUÇÃO

Embora pouco conhecida no centro-sul brasileiro, a cultura do feijão-caupi é de grande importância social e econômica e de notável potencial estratégico, principalmente para as regiões Norte e Nordeste, onde constitui um dos mais importantes componentes da dieta alimentar. Na década de 90, a cultura produziu, em média, 430 mil t ano<sup>-1</sup>, colhidas em cerca de 1.300.000 ha, estimando-se que a cultura seja responsável, anualmente, pela criação de 1,36 milhão de empregos e pela alimentação de mais de 23 milhões de brasileiros, com valor de produção da ordem de 250 milhões de dólares (Freire Filho et al., 2005). A estrutura tradicional de produção e o mercado restrito vêm-se modificando a cada ano, tornando-se hoje cultivado também por médios e grandes produtores, com maior adoção de tecnologia. Sua comercialização já ultrapassa as fronteiras regionais, como é o caso do feijão-fradinho em bolsas de mercadorias do Sudeste, e apresenta amplas perspectivas de exportação, já que existe mercado internacional para tipos tradicionalmente cultivados no Brasil.

A interação do caupi com bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico, vulgarmente denominadas rizóbios, via utilização de inoculantes, pode permitir o aumento de rendimento da cultura. Este processo pode ser uma alternativa para a substituição, total ou parcial, dos adubos nitrogenados, desde que supra a cultura com o 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.

A seleção de novas estirpes, capazes de fixar maiores quantidades de N<sub>2</sub> quando em simbiose com caupi, é

extremamente importante para a produção de inoculantes. No entanto, as estirpes selecionadas em laboratório e casa de vegetação podem não alcançar o máximo potencial de fixação no campo, em decorrência, entre outros fatores, da competição com a população nativa estabelecida do solo e da adaptação às condições ambientais locais, tornando-se necessário também o estudo de densidade e diversidade da população de rizóbios nativos.

Neste trabalho, avaliou-se a eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio previamente selecionadas em condições controladas (Lacerda et al., 2004), em simbiose com o caupi no campo, bem como foram comparadas estas estirpes com a recomendada para a produção de inoculante comercial para a cultura. Também foi avaliada a diversidade fenotípica de populações nativas que nodulam o feijão caupi da área em estudo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Ensaio de campo

O ensaio de campo foi realizado em área experimental do município de Perdões, MG, de novembro de 2002 a março de 2003, em um Argissolo Vermelho distrófico típico (Embrapa, 2000), em área onde não havia sido cultivado caupi e sem a utilização anterior de qualquer inoculante. Resultados de análise química de amostra de material desse solo antes do plantio encontram-se no quadro 1. O cultivo se deu em condição de baixa utilização de insumos, não tendo sido aplicados calagem, micronutrientes ou produtos fitossanitários. O ensaio foi realizado de acordo com

as recomendações da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE). Foi utilizado o cultivar BR-14 Mulato (Cardoso et al., 1990), portador de imunidade ao vírus do mosaico severo do caupi e altamente resistente à sarna (*Sphaceloma* sp.).

**Quadro 1. Características químicas de amostra de solo (profundidade 0-20 cm) antes da adubação e da semeadura<sup>(1)</sup>**

Característica	Unidade	Valor
pH em H <sub>2</sub> O (1:2,5)		4,9
P (Mehlich-1)	mg dm <sup>-3</sup>	14,5
K (Mehlich-1)	mg dm <sup>-3</sup>	122
Ca <sup>2+</sup>	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	2,0
Mg <sup>2+</sup>	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	0,6
Al <sup>3+</sup>	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	0,3
H + Al	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	4,5
S.B	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	2,9
t	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	3,2
T	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	7,4
m	%	9,0
V	%	39,3
MO	dag kg <sup>-1</sup>	1,9

<sup>(1)</sup> Análises realizadas nos laboratórios do Departamento de Ciências do Solo da UFLA.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com quatro repetições e sete tratamentos: uma testemunha sem N e sem inoculação, outra que recebeu adubação nitrogenada na dose de 70 kg ha<sup>-1</sup> de N (fonte uréia) também sem inoculação, quatro estirpes de rizóbio (UFLA 03-36, UFLA 03-84, UFLA 03-129 e INPA 03-11B) e a estirpe de referência (BR 2001), recomendada, desde 1985, como inoculante para a cultura do caupi. A origem e algumas características culturais das estirpes de rizóbio usadas no presente ensaio encontram-se no quadro 2. As estirpes INPA 3-11B e UFLA 3-84 pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* e apresentam seqüências parciais do 16S rDNA, respectivamente, similares: 98 % ao acesso AF208510 (*B. elkanii*) e 97 % ao acesso AF384136 (*B. sp.*) (Moreira, 2005).

O solo foi preparado com uma aração e uma gradagem, com posterior demarcação dos sulcos no terreno. A semeadura foi feita no dia 30 de novembro de 2002, após a inoculação das sementes, com a densidade de 10 sementes por metro de sulco. O inoculante foi preparado com turfa esterilizada em autoclave, na proporção 3:1 de turfa e culturas em meio 79 (Fred & Waksman, 1928), semi-sólido na fase log (após cinco dias de crescimento), inoculando-se 500 g do inoculante para cada 50 kg de sementes. Todos os tratamentos, incluindo as testemunhas, receberam adubação fosfatada e potássica à base de 70 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 40 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, usando, como fontes, superfosfato triplo e cloreto de potássio, respectivamente, incorporados nos sulcos de semeadura a 6 cm de profundidade. Além desta adubação, a testemunha, adubação nitrogenada,

**Quadro 2. Origem (Sistema de Uso da Terra – SUT; Município, Estado e País) e características culturais das estirpes de rizóbios usadas no ensaio e dos grupos dos isolados nativos**

Identificação da estirpe ou do grupo de rizóbio	SUT/ Município/Estado/País	Característica cultural					
		ACI <sup>(1)</sup>	D <sup>(2)</sup>	PG <sup>(3)</sup>	PH <sup>(4)</sup>	AI <sup>(5)</sup>	COR <sup>(6)</sup>
UFLA 03-36	Capoeira, Theobroma, RO, BR	4	1- 2	Alta	Neutro	Não	Branca
UFLA 03-84	Pastagem, Jí-Paraná, RO, BR	6	1- 2	Média	Alcalino	Não	Branca
UFLA 03-129	Pastagem, Pedro Peixoto, AC, BR	7	1- 2	Média	Neutro	Não	Amarela
INPA 03-11B	Terra Firme, Manaus, AM, BR	7	1	Média	Alcalino	Não	Branca
BR 2001	Libéria, África	8	1- 2	Média	Alcalino	Não	Branca
Grupo A	Pastagem, Perdões, MG, BR	4 a 5	1 a 2	Média	Alcalino	Não	Amarela
Grupo B	Pastagem, Perdões, MG, BR	4 a 5	1 a 2	Média	Alcalino	Sim	Branca
Grupo C	Pastagem, Perdões, MG, BR	2 a 3	< 1	Média	Alcalino	Sim	Amarela
Grupo D	Pastagem, Perdões, MG, BR	2 a 3	> 2	Alta	Ácido	Sim	Amarela
Grupo E	Pastagem, Perdões, MG, BR	2 a 3	> 2	Média	Ácido	Sim	Amarela
Grupo F	Pastagem, Perdões, MG, BR	2 a 3	1 a 2	Média	Ácido	Sim	Amarela
Grupo G	Pastagem, Perdões, MG, BR	2 a 3	1 a 2	Baixa	Ácido	Sim	Amarela

<sup>(1)</sup> Tempo em dias de crescimento de colônias isoladas. <sup>(2)</sup> Diâmetro da colônia (mm). <sup>(3)</sup> Produção de goma. <sup>(4)</sup> Alteração do pH meio de cultivo. <sup>(5)</sup> Absorção de indicador do meio de cultura pelas colônias que se tornam com o centro amarelo. <sup>(6)</sup> Coloração das colônias.

recebeu 70 kg ha<sup>-1</sup> de N, parcelados em duas vezes: 35 kg ha<sup>-1</sup> de N, no plantio, e 35 kg ha<sup>-1</sup> de N, aos 20 dias da emergência.

As parcelas foram constituídas por seis linhas de 6 m de comprimento, espaçadas em 1,0 m, totalizando 36 m<sup>2</sup> de área total e 10 m<sup>2</sup> de área útil para avaliação.

Foi realizada uma única capina manual, aproximadamente aos 30 dias da emergência das plantas. Por ocasião do florescimento, foram coletadas 10 plantas de cada parcela, na segunda e na quinta linha, para avaliação da nodulação (contagem e quantidade de matéria seca) e parte aérea (produção de matéria seca, teor e acúmulo de N e eficiência relativa).

A colheita foi realizada no dia 6 de março de 2003, quando se avaliaram o rendimento de grãos e o teor de N nos grãos. Para avaliar o rendimento de grãos, a sua umidade foi corrigida para 13 %. O N total foi determinado pelo método semi-microkjedahl, de acordo com Sarruge & Haag (1979), na matéria seca da parte aérea e nos grãos. O N acumulado na matéria seca da parte aérea (MSPA) e nos grãos foi calculado, multiplicando o peso pelo teor de N.

A eficiência relativa de cada parcela foi calculada segundo a expressão:

$$Efr = \frac{MSPA_{inoculada}}{MSPA_{comN}} \times 100$$

sendo Efr: eficiência relativa; MSPA inoculada: matéria seca da parte aérea da planta inoculada; MSPA com N: matéria seca da parte aérea da planta com N.

### Densidade e diversidade fenotípica de populações nativas que nodulam o caupi

O experimento para a captura, contagem e avaliação da eficiência de populações nativas de rizóbios foi realizado, em vasos de Leonard (Vincent, 1970), no Laboratório de Microbiologia do Solo/DCS/UFLA, nos meses de setembro e outubro de 2003, utilizando, como planta-isca, o mesmo cultivar de caupi do experimento de campo.

Foram coletadas duas amostras de solo em área adjacente ao local do experimento de campo, em agosto de 2003, as quais foram encaminhadas ao laboratório, onde foram feitas as diluições seriadas decimais.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições (três de cada amostra de solo) e nove tratamentos. Os tratamentos foram as inoculações com 1 mL da suspensão de solo das diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup> em solução salina (5,5 g L<sup>-1</sup> de NaCl), além de duas testemunhas sem inoculação (uma, com adição de N aplicado em três parcelas com intervalos de 10 dias, totalizando 210 mg vaso<sup>-1</sup> de N, na forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, e outra, sem N) para controle de possível contaminação e para comparações com as plantas inoculadas.

A parte superior dos vasos de Leonard continha uma mistura 1:1 de areia (250 cm<sup>3</sup>) e vermiculita (250 cm<sup>3</sup>), enquanto a inferior continha solução nutritiva de Jensen modificada (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2 g L<sup>-1</sup>, NaCl 0,2 g L<sup>-1</sup>, CaHPO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,1 g L<sup>-1</sup>, em 1 mL sol. micronutrientes), diluída quatro vezes e autoclavada, por 30 min, a 1,5 kg cm<sup>-2</sup> e a 127 °C. Após o preparo, os vasos foram autoclavados, para 1 h, à pressão de 1,5 kg cm<sup>-2</sup> e a 127 °C.

As sementes utilizadas foram desinfestadas superficialmente com etanol 70 %, por 5 min, e hipoclorito de sódio a 1 %, por 3 min. Em seguida, foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Foram então semeadas quatro sementes por vaso e, posteriormente, foi feita a inoculação, colocando-se, junto a cada semente, 1 mL de suspensão proveniente das diluições seriadas. Também foi colocada, sobre a superfície do vaso, uma fina camada de mistura esterilizada de areia, benzeno e parafina (proporção de 5:1:0,015, respectivamente), com a finalidade de evitar possíveis contaminações.

Manteve-se o nível da solução nutritiva nos vasos, repondo periodicamente com solução autoclavada. Decorridos três a cinco dias após a germinação, foi feito o desbaste, deixando-se somente uma planta por vaso. As plantas foram colhidas por ocasião do florescimento (35 dias após a emergência), para avaliação da nodulação (presença ou ausência de nódulos), matéria seca da parte aérea e para o isolamento das bactérias nativas presentes nos nódulos. Para estimar o número mais provável (NMP) de células de rizóbio nas duas amostras coletadas, considerou-se positivo, para presença, e negativo, para ausência de nódulos, em cada diluição, usando o programa "Most Probable Number Estimate" (MPNES) (Woomer et al., 1990).

Três nódulos de cada planta-isca foram utilizados no isolamento de rizóbio. Estes nódulos foram primeiramente imersos em álcool etílico 95 %, por 30 s, com o objetivo de quebrar a tensão superficial, sendo, posteriormente, imersos em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por 1 min, para esterilizar a superfície do nódulo, e depois lavados seis vezes em água esterilizada para a retirada do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os nódulos foram então esmagados com o auxílio de uma pinça devidamente esterilizada, em placas que continham meio de cultura 79, sendo o material interno espalhado nas placas para a obtenção de colônias isoladas (Vincent, 1970). Obtidas as colônias isoladas e puras, os isolados foram então identificados e crescidos, em placas com meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928), para caracterização fenotípica cultural e armazenamento em "deep freezer" (-80 °C). Foram avaliadas as seguintes características culturais dos isolados: taxa de crescimento, medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (crescimento muito rápido – 1 dia; rápido – 2 a 3 dias; intermediário – 4 a 5 dias; lento – 6 a 10 dias e muito lento – mais que 10 dias); diâmetro médio das colônias (< 1 mm, 1 a 2 mm e > 2 mm), modificação do pH do meio

(acidificação, alcalinização e neutro), produção de goma (baixa, média e alta) e coloração das colônias (amarela e branca), conforme Moreira (1991).

Para avaliar as proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), as estirpes usadas como inoculante, os isolados nativos e estirpes tipo e de referência de espécies descritas, após o crescimento em placa, foram então crescidos por dois cultivos sucessivos em meio TY sólido, nas mesmas condições ambientais, fazendo-se, posteriormente, a inoculação de colônias isoladas em 50 mL de meio de cultura líquido TY. O crescimento se deu com agitação constante de 120 rpm, por quatro dias, à temperatura de 28 °C. O meio de crescimento com as bactérias foi então centrifugado a 10.000 rpm, por 10 min, à temperatura de 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e ao "pellet" formado foi adicionado o tampão NaPBS, que foi novamente centrifugado, repetindo-se esse processo três vezes até a total lavagem das células. Foram pesados 70 mg de células de cada isolado em tubo Eppendorf e, em seguida, adicionou-se 0,9 mL do tampão da amostra (TTA) e 0,1 mL SDS 20 %, para a solubilização das proteínas. Posteriormente, aqueceu-se a mistura em banho-maria a 95 °C, por 10 min. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 min, à temperatura de 4 °C, para, em seguida, serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), pelo método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackman (1985) utilizadas para rizóbio por Moreira et al. (1993). Para a eletroforese, utilizou-se um gel de sistema descontínuo, 12 % para o gel separador e 5 % para o gel de concentração. Foram aplicados ao gel 30 µL de cada amostra.

Uma matriz binária dos dados originais foi construída, compreendendo 15 cadeias polipeptídicas (bandas) representativas dos perfis gerados. Os grupos formados foram comparados com as estirpes tipo e de referência de espécies descritas e com as estirpes usadas, como inoculante, no ensaio de campo.

Os dados do ensaio de campo e do ensaio com vasos de Leonard foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística SISVAR, versão 4.0. Os efeitos dos tratamentos foram agrupados pelo teste de Scott-Knott, a 5 %.

Os dados de caracterização fenotípica pelo perfil protéico total das estirpes e dos isolados obtidos foram agrupados pelo método UPGMA ("Average Linkage Clustering"), cujo princípio baseia-se na distância intergrupo, que é a média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos e representados por um dendograma de similaridade (NTSYS-pc, versão 2.01, Slice et al., 1994).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ensaio de campo

Os valores médios das características avaliadas encontram-se no quadro 3. Os tratamentos influenciaram em todas as características avaliadas, de forma significativa.

A inoculação com as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B promoveu maior nodulação das plantas. Estas estirpes ficaram em um grupo superior ao das demais estirpes, incluindo a estirpe de referência, BR 2001. A nodulação por rizóbios nativos não foi

**Quadro 3. Valores médios do número de nódulos por planta (NN), quantidade de matéria seca de nódulos (MSN), produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (Efr), acúmulo de N na parte aérea (ANPA), rendimento de grãos (RG), teor de N nos grãos (TNG) e acúmulo de N nos grãos (ANG), considerando as fontes de nitrogênio do caupi<sup>(1)</sup>**

Fonte de N	NN	MSN	MSPA	Efr (%)	ANPA	RG	TNG	ANG
Test. s/N	15,52 c	180,30 b	7,53 b	56,62 b	261,20 b	341,80 c	3,22 b	10,93 c
BR 2001	24,55 b	197,50 b	8,21 b	62,97 b	296,92 b	473,68 c	3,46 b	16,45 c
UFLA 03-36	25,67 b	202,37 b	8,36 b	61,58 b	296,67 b	703,63 b	3,45 b	24,49 b
UFLA 03-129	23,67 b	199,77 b	8,34 b	63,86 b	300,99 b	717,46 b	3,78 a	27,29 b
UFLA 03-84	31,17 a	226,57 a	8,97 b	72,98 b	353,06 b	949,13 a	3,79 a	36,07 a
INPA 03-11b	31,10 a	250,77 a	11,24 a	84,40 a	436,42 a	957,25 a	4,00 a	38,34 a
Test. c/N	18,07 c	149,65 b	13,63 a	100,00 a	510,87 a	952,00 a	3,98 a	37,82 a
CV (%)	12,76	14,01	19,93	19,71	20,18	12,71	8,68	18,27

<sup>(1)</sup> Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5 %.

significativa, tendo em vista que a testemunha sem N permaneceu no grupo inferior, juntamente com a testemunha com N. As estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B também sobressaíram em relação à quantidade de matéria seca de nódulos (MSN), cujos valores mostraram-se semelhantes aos encontrados por Lacerda et al. (2004) e Martinazzo (1989).

Com relação à produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (Efr) e acúmulo de N na parte aérea, foi observado comportamento semelhante das estirpes, tendo em vista a relação direta entre essas características. A estirpe INPA 03-11B foi a que se destacou, permanecendo em um grupo isolado, superior aos demais tratamentos e semelhante à testemunha com N.

O rendimento de grãos variou de 341 a 952 kg ha<sup>-1</sup> e foi afetado pela ocorrência de chuvas por ocasião da colheita (Quadro 3). No entanto, foram obtidos rendimentos superiores aos da média nacional em alguns tratamentos. As estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B destacaram-se das demais, promovendo rendimentos de grãos semelhantes aos da testemunha com N, que recebeu uma adubação mineral de 70 kg ha<sup>-1</sup> de N-uréia. A estirpe de referência para inoculação no caupi, BR 2001, mostrou-se ineficiente em relação à produção de grãos, situando-se no mesmo grupo da testemunha sem N. Este resultado e os de outros trabalhos em vasos de Leonard e no campo (Martins et al., 1997; Lacerda & Moreira, 2000; Motta, 2002; Lacerda et al., 2004 e Lima et al., 2005) indicam a baixa eficiência da estirpe BR 2001 e a melhor eficiência simbiótica de outras estirpes de rizóbio. As estirpes UFLA 03-129, UFLA 03-84 e INPA 03-11B proporcionaram teores de N nos grãos semelhantes ao teor encontrado na testemunha com N. Já para o acúmulo de N nos grãos, as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B, que proporcionaram maior rendimento, foram também as que se mostraram superiores.

### Densidade e diversidade de rizóbios nativos que nodulam o caupi

Somente as plantas inoculadas com suspensão de solo até à diluição de 10<sup>-2</sup> apresentaram nódulos. Não houve contaminação do experimento porque nenhuma das testemunhas apresentou nódulos em suas raízes.

A população nativa de rizóbio calculada pelo método das diluições sucessivas variou de 23 rizóbios por grama de solo (Amostra 2) a 38 rizóbios por grama de solo (Amostra 1) e, portanto, pode ser considerada muito baixa, o que também pode ter contribuído para o efeito positivo da inoculação. Estes valores são bem inferiores aos encontrados para a cultura do feijoeiro na mesma área (Soares et al., 2006), indicando que, apesar de ser o caupi considerado mais promíscuo do que o feijoeiro (Melloni et al., 2006; Lewin et al, 1987), este fato não foi observado no presente estudo.

As inoculações de suspensões de solo não promoveram aumento na matéria seca da parte aérea (MSPA), evidenciando a ineficiência dos isolados nativos. Foi observada maior produção de MSPA somente na testemunha que recebeu N (210 mg planta<sup>-1</sup>). Isto também ficou evidenciado, visualmente, pelo baixo crescimento das plantas inoculadas com as suspensões de solo, indicando baixa eficiência das populações nativas.

Os 15 isolados obtidos de nódulos das plantas de caupi e as estirpes inoculadas foram agrupados com base em suas características culturais (Quadro 2). Sete grupos foram formados com os isolados nativos da área em estudo, indicando alta diversidade fenotípica cultural da população nativa.

Os isolados da população nativa formaram cinco grupos com base no perfil eletroforético de proteína total (Figuras 1 e 2).

O grupo A foi formado por nove isolados e a estirpe tipo BR 7411 de *Sinorhizobium meliloti*. Nenhuma outra estirpe de referência, nem as estirpes tipo agruparam-se, a 80 % de similaridade, com os demais isolados nativos da área em estudo. Melloni et al. (2006) verificaram que 22 % dos isolados de nódulos de plantas de caupi eram pertencentes ao grupo formado com as estirpes tipo de espécies de *Sinorhizobium* e a maioria desses isolados (74 %) era pertencente ao grupo formado com as estirpes tipo de *Bradyrhizobium*.

Pereira (2000) não encontrou nenhuma relação entre isolados de nódulos de plantas de caupi, inoculadas com suspensões de solos da Amazônia, com espécies conhecidas de *Bradyrhizobium* e de *Rhizobium*, a 80 % de similaridade, com base no perfil protéico total. Somente com similaridades inferiores é que foi encontrada alguma relação.

Os resultados deste trabalho indicam que, apesar de ser o caupi uma espécie geralmente relatada como formadora de simbiose com estirpes de crescimento lento pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, ela pode nodular predominantemente com gêneros de crescimento rápido como *Sinorhizobium*.

Os resultados deste e de outros trabalhos (Lacerda et al., 2004 e Pereira et al., 2004) corroboraram a indicação e aprovação das estirpes INPA 03-11B e UFLA 03-84 como novos inoculantes de caupi em substituição a BR 2001 na RELARE (2004), o que foi referendado na Instrução Normativa do MAPA, publicada, no Diário Oficial da União, em 24/03/2006. Ressalta-se, ainda, que essas estirpes recomendadas pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*, cujos genes relacionados com nodulação e fixação biológica de N<sub>2</sub> localizam-se no cromossomo e, portanto, apresentam maior estabilidade genética destas características, a exemplo das estirpes recomendadas para a soja.

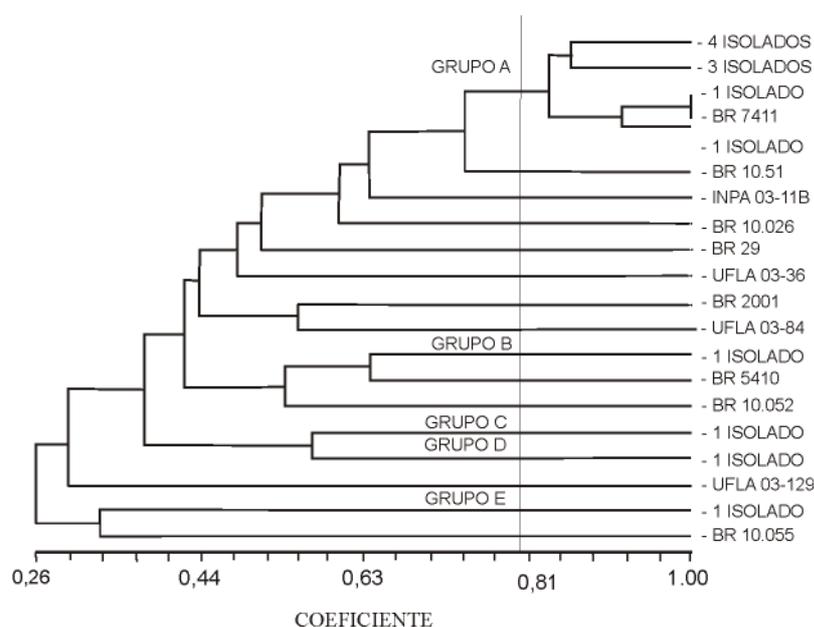


Figura 1. Dendrograma de similaridade construído com base no perfil protéico total dos isolados nativos de caupi, das estirpes inoculantes (INPA 03-11b, UFLA 03-36, UFLA 03-84, UFLA 03-129 e BR 2001) e das estirpes tipo ER 316ci0a<sup>T</sup> (BR 10.051-*Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*); CNF 42<sup>T</sup> (BR 10.026 *Rhizobium etli*); HAMBÍ 540<sup>T</sup> (BR 10.055-*Rhizobium galegae* bv *orientalis*); NZP 4027<sup>T</sup> (BR 7411-*Sinorhizobium melioli*); ORS 571<sup>T</sup> (BR 5410-*Azorhizobium caulinodans*) e de referência BR 29-*Bradyrhizobium elkanii*, obtidos por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE).

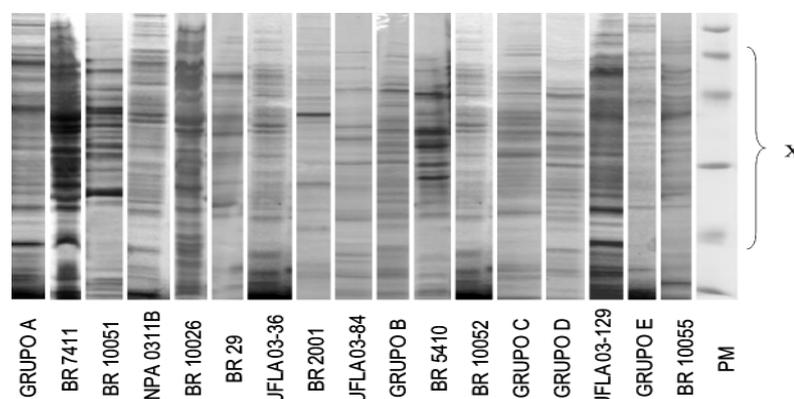


Figura 2. Perfis de proteína celular total de estirpes isoladas do solo da área em estudo, das estirpes de referências e das estirpes tipo obtidas por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE). X = área utilizada - 15 bandas; PM = padrão de peso molecular LMWM.

## CONCLUSÕES

1. A inoculação com as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. UFLA 03-84 e INPA 03-11B contribuiu, de forma significativa, para o aumento no rendimento de grãos do caupi, sendo esses tratamentos superiores ao tratamento inoculado com a estirpe de referência BR 2001.

2. A população nativa apresentou alta diversidade fenotípica cultural e padrões protéicos. No entanto, não houve relação entre os grupos fenotípicos de perfil protéico total e caracterização cultural.

3. Com base no perfil protéico total, a maioria dos isolados da população nativa foi classificada, a 80 % de similaridade, como *Sinorhizobium melioli*.

4. As estirpes inoculadas mostraram-se bastante distintas fenotipicamente de estirpes da população nativa.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão de bolsas de iniciação científica, mestrado e produtividade em pesquisa; à CAPES, pelas bolsas de mestrado e doutorado, e à FAPEMIG, pelo financiamento do projeto CAG1130-02.

### LITERATURA CITADA

- CARDOSO, M.J.; FREIRE FILHO, F.R. & SOBRINHO, C.A. BR14 Mulato: Nova cultivar de feijão macassar para o estado do Piauí. Teresina, Embrapa/UEPAAE, 1990. p.1-4. (Embrapa/UEPAAE. Comunicado Técnico, 48)
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília, 2000. 412p.
- FRED, E.B. & WAKSMAN, S.A. Laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw-Hill Book Company, 1928. 143p.
- FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A. & RIBEIRO, V.Q., eds. Feijão-caupi: Avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519p.
- JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M. & MINNIKIN, D., eds. Chemical methods in bacterial systematics. London, Academic Press, 1985. p.119-129.
- LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B. & SOARES, A.L.L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. R. Ceres, 51:67-82, 2004.
- LACERDA, A.M. & MOREIRA, F.M.S. Eficiência e seleção de isolados de rizóbio em *Vigna unguiculata*. In: XIII CICESAL/UFA, Lavras, 2000. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000. p.146.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685, 1970.
- LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, H.A.; WONG, C.; H. NELSON, L.; MANEN, J.F.; STANLEY, J.; DOWLING, D.N.; DÉNARIE, J. & BROUGHTON, W.J. Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. Plant Mol. Biol., 8:447-459, 1987.
- LIMA, A.S.; PEREIRA, J.P.A.R. & MOREIRA, F.M.S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp de solos da Amazônia. Pesq. Agropec. Bras., 40:1095-1104, 2005.
- MARTINAZZO, A.F. Potencial de fixação em N<sub>2</sub> em *Vigna unguiculata* Walp. em diferentes condições ambientais. Itaguaí, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1989. 154p. (Tese Mestrado)
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P. & RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. Soil Biol. Biochem., 29:1005-1110, 1997.
- MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R. S.A. & SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. R. Bras. Ci. Solo, 30:235-246, 2006.
- MOREIRA, F.M.S. Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. Itaguaí, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1991. 152p. (Tese Doutorado)
- MOREIRA, F.M.S. Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para a produção de inoculantes comerciais. Boletim de Extensão da UFLA, disponível on line: www.ufla.br/editora/publicações/boletim de extensão, 2005, 12p.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K. & FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. Sys. Appl. Microbiol., 16:135-146, 1993.
- MOTTA, J.S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2002. 43p. (Tese de Mestrado)
- PEREIRA E.G. Diversidade de rizóbio em diferentes sistemas de uso da terra da Amazônia. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2000. 93p. (Tese de Doutorado)
- PEREIRA, J.P.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; MOREIRA, F.M.S. & ANDRADE, M.J.B. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* cv Poços de Caldas por estirpes selecionadas de rizóbio em Iguatama, MG. In: CICESAL/UFLA, 17., Lavras, 2004. CD-ROOM
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. Análises químicas em plantas. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros", 1979. 27p.
- SLICE, D.E.; KIM, J. & WALKER, J. NTSYS-Numerical taxonomy and multivariate analysis system: versão 1.80. [S.l.]:[s.n.], 1994.
- SOARES, A.L.L. Eficiência Agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas que nodulam feijão e caupi em Perdões, MG. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2004. 71p. (Tese de Mestrado)
- VINCENT, J.M.A. Manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15)
- WOOMER, P.; BENNET, J. & YOST. R. Overcoming the inflexibility of most-probable-number procedures. Agron. J., 82:349-353, 1990.