



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/PRODUÇÃO VEGETAL

VICENTE PAULO DA COSTA NETO

**NODULAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO-FAVA
INOCULADO COM RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS DA MICRORREGIÃO DO
MÉDIO PARNAÍBA PIAUIENSE**

**TERESINA - PI
FEVEREIRO/2016**

VICENTE PAULO DA COSTA NETO

**NODULAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO-FAVA
INOCULADO COM RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS DA MICRORREGIÃO DO
MÉDIO PARNAÍBA PIAUIENSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Artenisa Cerqueira Rodrigues

Coorientadora: Profa. Dra. Aurenívia Bonifácio de Lima

**Teresina - PI
Fevereiro/2016**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

C837n Costa Neto, Vicente Paulo da
Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em feijão-fava
inoculado com rizóbios isolados de solo da microrregião do mu-
nicípio do Médio Parnaíba Piauiense. / Vicente Paulo da Cos-
ta Neto
59 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Fe-
deral do Piauí, Teresina, 2016.
Orientação: Profª. Drª. Artenisa Cerqueira Rodrigues

1 .*Phaseolus lunatus* L., 2.Simbiose 3. Bactérias 4.Diazotró-
ficas I.Título

CDD 635.651

VICENTE PAULO DA COSTA NETO

**NODULAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO-FAVA
INOCULADO COM RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS DA MICRORREGIÃO DO
MÉDIO PARNAÍBA PIAUIENSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 27 / 02 / 2016

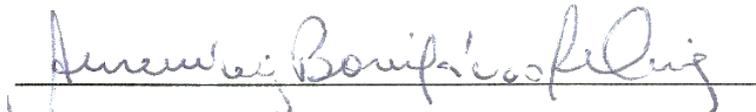
Banca Examinadora:

Rosa Maria Cardoso Mota de Alcântara.

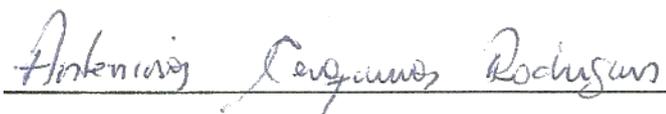
Dra. Rosa Maria Cardoso Mota de Alcântara (Embrapa Meio Norte)



Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira Araújo (UFPI)



Profa. Dra. Aurenívia Bonifácio de Lima (UFT)



Profa. Dra. Artenisa Cerqueira Rodrigues
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Presidente/Orientadora

**Teresina - PI
Fevereiro/2016**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado coragem para estudar.

Agradeço aos meus pais de Barras, Socorro Costa e Xixico da Calú, por me darem educação, ter tido paciência e acreditarem em mim.

Aos meus pais de Ilha Grande de Santa Isabel, Flávio e Fátima Crespo, por terem contribuído com a minha educação, pelos ensinamentos e pela paciência.

A empresa Coca-Cola Brasil Solar^{BR} Grupo de Teresina-PI, pela doação das garrafas utilizadas nos experimentos.

Aos amigos e amigas Janaína, Pablíane, Antônia Daniela, Pedro Guimarães, Carlos Frazão, João Pedro, Abel, Renê, Ediel, Apoliane, Jorge, Welber, Priscila, Ranielson, Hildete, Lucas, Mariana, Jayara, Beatriz, Chico Saraiva, Fábio, Washington e todos que estiveram ao meu lado durante a realização do trabalho.

As professoras Artenisa Cerqueira Rodrigues e Aurenívia Bonifácio pelos ensinamentos, confiança, puxões de orelha, pelas brincadeiras e por estarem sempre à disposição quando eu precisava.

A professora Vilma Maria dos Santos, pelos ensinamentos e confiança.

Ao professor Francisco de Alcântara por ceder o espaço na casa de vegetação para instalação do experimento.

A Sandra Mara e Nilza por me ajudarem em momentos importantes como aqueles aos quais eu me dedicava para obter água destilada.

Aos técnicos do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia, Lindomar e Manoel.

A Antônia Farias técnica do Laboratório de Fitossanidade.

Ao Laboratório de Análises de Solos (LASO/DEAS), na pessoa do Prof. Ademir Sérgio.

Aos meus amigos da turma de mestrado 2014.1.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Produção Vegetal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que eu finalizasse essa jornada, o meu muito obrigado!

RESUMO

Costa Neto, Vicente Paulo. Mestrando em Agronomia (Produção Vegetal). Universidade Federal do Piauí. Fevereiro/2016. **Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em feijão-fava inoculado com rizóbios isolados de solos da microrregião do Médio Parnaíba Piauiense.** Profa. Dra. Artenisa Cerqueira Rodrigues (Orientadora).

A indisponibilidade de nitrogênio no solo representa um fator limitante à produção das culturas. Em leguminosas agronomicamente importantes, como o feijão-fava, esta limitação pode ser contornada com a associação simbiótica destas plantas com rizóbios que fixam e convertem o nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a efetividade da inoculação de sementes de feijão-fava variedade Boca de Moça e Branca com rizóbios isolados de solos da microrregião do Médio Parnaíba Piauiense. O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação com delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial $9 \times 2 \times 3 + 2$, com três repetições. No geral, a inoculação do feijão-fava com os rizóbios ISOL-19, ISOL-32, ISOL-35 ou ISOL-50 induziram incrementos significativos nas variáveis analisadas. Foram observados incrementos na taxa de crescimento absoluto das plantas de feijão-fava var. Boca de Moça e Branca quando inoculadas com o rizóbio ISOL-32 e ISOL-50, respectivamente. Para a eficiência da fixação de nitrogênio, observou-se que este parâmetro foi superior no florescimento para ambas as variedades estudadas, principalmente quando as plantas foram inoculadas com os rizóbios ISOL-50 ou ISOL-18. As duas variedades de feijão-fava apresentaram elevados valores de eficiência da fixação de nitrogênio quando inoculadas com o rizóbio ISOL-50 no enchimento de vagens. Conclui-se que a simbiose entre o rizóbio ISOL-32 ou ISOL-50 e o feijão-fava variedade Boca de moça resulta em maior eficiência na nodulação e na fixação biológica do nitrogênio. Os resultados mostrados aqui são promissores e ressaltam os isolados de rizóbio ISOL-18, ISOL-32 e ISOL-50 como possíveis inoculantes a serem utilizados em feijão-fava nas condições do estado do Piauí.

Palavras-chave: *Phaseolus lunatus* L., simbiose, bactérias diazotróficas.

ABSTRACT

Costa Neto, Vicente Paulo. Master Student in Agronomy (Plant Production). Federal University of Piauí. February/2016. **Nodulation and biological nitrogen fixation in lima bean inoculated with rhizobia isolated from soils of the micro region of the Middle Parnaíba Piauiense.** Prof. PhD. Artenisa Cerqueira Rodrigues (Advisor).

The unavailability of nitrogen in the soil represents a limiting factor to crop production. In agriculturally important legumes, such as lima bean, this limitation can be overcome with the symbiotic association of these plants with rhizobia that fix and convert atmospheric nitrogen into assimilable forms. Given the above, it was aimed to evaluate the effectiveness of seed inoculation of lima bean variety Boca de Moça and Branca with rhizobia isolated from soils of the micro region of Middle Parnaíba Piauiense. The experiment was conducted under greenhouse conditions with randomized design with factorial scheme $9 \times 2 \times 3 + 2$, with three replications. Overall, the inoculation of the lima bean with rhizobia ISOL-19, ISOL-32, ISOL-35 or ISOL-50 induced significant increases in the variables analyzed. It was observed significant increases in the absolute growth rate of the lima bean plants var. Boca de Moça and Branca when inoculated with the rhizobia ISOL-32 and ISOL-50, respectively. To nitrogen fixation efficiency, it was observed that this parameter was higher in flowering for both varieties studied, especially when the plants were inoculated with the rhizobia ISOL-50 or ISOL-18. The two varieties of lima bean displayed high levels of nitrogen fixation efficiency when inoculated with rhizobia ISOL-50 in pod filling. We conclude that the symbiosis between the rhizobia ISOL-32 or ISOL-50 and lima bean variety Boca de Moça result in higher efficiency in nodulation and in biological nitrogen fixation. The results shown here are promising and highlight the isolates of rhizobia ISOL-18, ISOL-32 or ISOL-50 as possible inoculants to be used in lima bean in conditions of the Piauí state.

Keywords: *Phaseolus lunatus* L., symbioses, diazotrophic bacteria.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE APÊNDICES.....	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Aspectos gerais da cultura do feijão-fava	15
2.3 Importância da fixação biológica do nitrogênio	16
2.2 Interação simbiótica entre rizóbios e leguminosas.....	17
2.3 A FBN na simbiose rizóbio-leguminosas.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Multiplicação e preparo dos inoculantes microbianos.....	22
3.2 Seleção e preparo das sementes	23
3.3 Condução do experimento	23
3.4 Coleta de dados e variáveis analisadas.....	24
3.5 Delineamento experimental e análise estatística	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Taxa de crescimento absoluto	26
4.2 Comprimento da raiz.....	27
4.3 Diâmetro do caule.....	28
4.4 Massa seca da parte aérea.....	30
4.5 Massa seca das raízes	32
4.6 Número de nódulos.....	33
4.7 Massa seca de nódulos	35
4.8 Nitrogênio acumulado	37
4.9 Teor de nitrogênio.....	39
4.10 Clorofila total	41
4.11 Nodulação específica.....	43
4.12 Eficiência de fixação do nitrogênio.....	45
5 CONCLUSÃO	48
6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	49
APÊNDICES.....	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Taxa de crescimento absoluto de feijão-fava var. crioula Boca de Moça e Branca inoculadas com diferentes isolados de rizóbio no período de enchimento de vagens. Em cada variedade, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).....26
- Figura 2.** Comprimento da raiz de feijão-fava var. crioula Boca de Moça e Branca inoculadas com diferentes isolados de rizóbio no período de enchimento de vagens. Em cada variedade, médias seguidas por mesma letra não diferem entre si (Teste de Duncan, $P < 0,05$).27
- Figura 3.** Diâmetro do caule de feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Teste de Duncan, $P < 0,05$).29
- Figura 4.** Massa seca da parte aérea de feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).....31
- Figura 5.** Massa seca das raízes de feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).33
- Figura 6.** Número de nódulos no feijão-fava var. crioulas Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).34
- Figura 7.** Massa seca de nódulos de var. crioulas de feijão-fava Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Teste de Duncan, $P < 0,05$).36
- Figura 8.** Nitrogênio acumulado no feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculado com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).38
- Figura 9.** Teor de nitrogênio de feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Teste de Duncan, $P < 0,05$).40
- Figura 10.** Clorofila total de feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculado com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). IFC = índice de clorofila Falker.42
- Figura 11.** Nodulação específica do feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculado com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). MSN = massa seca de nódulos. MSR = massa seca de raízes.44

Figura 12. Eficiência de fixação de nitrogênio do feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculado com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes de rizóbios utilizadas no cultivo de feijão-caupi e feijão comum que se encontram registradas na base de dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). 19

Tabela 2. Rizóbios isolados de amostras de solo de áreas produtoras de feijão-fava (Santos et al., 2009; Antunes et al., 2011; Araújo et al., 2015).22

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Raízes e nódulos de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculadas com isolados de rizóbio provenientes de áreas produtoras de feijão-fava do Piauí. As estirpes BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. e CIAT 899 de *Rhizobium tropici* foram utilizadas como padrões.....58

Apêndice 2. Raízes e nódulos de feijão-fava var. crioula Branca inoculadas com isolados de rizóbio provenientes de áreas produtoras de feijão-fava do Piauí. As estirpes BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. e CIAT 899 de *Rhizobium tropici* foram utilizadas como padrões.....59

1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma leguminosa de grande importância socioeconômica cultivada mundialmente em países com clima tropical ou subtropical (Silva et al., 2014; Lopes et al., 2015). Utilizado na alimentação humana e animal, o feijão-fava é amplamente cultivado por pequenos agricultores no Nordeste do Brasil, região com solos pobres em nitrogênio (Osman e Elaziz, 2010; Freitas et al., 2011). Considerando o elevado custo, torna-se inviável que pequenos agricultores façam uso de fertilizantes nitrogenados no cultivo de feijão-fava. Desta forma, o cultivo desta planta se torna dependente de processos naturais de fornecimento de nitrogênio, como a mineralização da matéria orgânica (Fonseca et al., 2013) e a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (Moreira et al., 2014).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo de conversão do nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis (amônio) para as espécies vegetais, sendo executado por bactérias fixadoras de nitrogênio (rizóbios), em simbiose com plantas da família Fabaceae (Rodrigues et al., 2013). Uma vez que a associação simbiótica entre espécies vegetais e rizóbios supre adequadamente as plantas no tocante ao nitrogênio necessário para o seu crescimento, desenvolvimento e produtividade, a FBN passa a ser uma alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados (Melo e Zilli, 2009; Rodrigues et al., 2012; Fonseca et al., 2013; Moreira et al., 2014). Este processo biológico de captação e fornecimento de nitrogênio para as plantas reduz a necessidade de utilização de adubos nitrogenados e, portanto, diminui os custos de produção.

A FBN é uma prática de grande expressão econômica e traz vários benefícios para sustentabilidade agrícola aliado a um baixo impacto ambiental (Melo e Zilli, 2009). O uso de microrganismos eficientes em otimizar o processo de nodulação e

FBN pode influenciar positivamente na produtividade vegetal e também minimizar possíveis situações de estresse às quais as plantas podem ser expostas (Costa et al., 2014; Marinho et al., 2014). Além disso, a FBN traz vários benefícios para o meio ambiente, tais como redução da poluição do solo e de lençóis freáticos (Gualter et al., 2011). Considerando todos os seus benefícios, pode-se considerar a FBN um importante artifício a ser empregado em sistemas de agricultura sustentável (Lírio et al., 2012; Stambulska e Lushchak, 2015).

Nas leguminosas, a limitação de nitrogênio pode ser contornada com a associação simbiótica destas plantas com rizóbios que executam a fixação e conversão do nitrogênio atmosférico em formas nitrogenadas assimiláveis por estas plantas (Lírio et al., 2012; Voisin et al., 2015). Assim, o sucesso da fixação de nitrogênio por rizóbios em simbiose com leguminosas reflete diretamente e positivamente no desenvolvimento das espécies vegetais. Embora a FBN seja um processo consagrado em leguminosas como feijão comum (Rahmani et al., 2011; Argaw e Akuma 2015; Mulas et al., 2015) e feijão-caupi (Guedes et al., 2010; Silva Júnior et al., 2012; Silva et al., 2012; Saboya et al., 2013), em feijão-fava os estudos ainda são incipientes e principalmente relacionados a avaliação de isolados (Antunes et al., 2011). A hipótese deste estudo é que isolados de rizóbio oriundos de solos de áreas produtoras de feijão-fava no estado do Piauí apresentam eficiência na nodulação e FBN em plantas de feijão-fava. Desta forma, objetivou-se avaliar a simbiose entre o feijão-fava e isolados de rizóbios provenientes de áreas produtoras da microrregião do Médio Parnaíba Piauiense.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da cultura do feijão-fava

O feijão-fava, também conhecido como feijão-lima ou fava, é uma dicotiledônea pertencente à família Fabaceae originária no centro Mesoamericano e Andino (Silva et al., 2010). Cultivada na Europa, no leste e oeste da África, no sudeste da Ásia e na América do Norte e do Sul (Oliveira et al., 2011), o feijão-fava possui folhas trifoliadas, crescimento determinado ou indeterminado trepador e ciclo de vida anual, bianual ou perene (Lopes et al., 2015). Suas vagens podem ser compridas, achatadas ou recurvadas com duas a quatro sementes e os grãos podem ser consumidos verdes ou secos (Melo e Zilli, 2009; Oliveira et al., 2014a).

O consumo de grãos de feijão-fava é baixo em relação aos outros feijões devido ao sabor amargo resultante da presença do ácido cianídrico (Oliveira et al., 2014a). Devido as suas características rústicas, ou seja, maior tolerância à seca, ao excesso de umidade e ao calor, o feijão-fava tem sido cultivado por pequenos produtores na região Nordeste do Brasil, região que possui clima árido e semiárido. A região Nordeste possui 95% da produção brasileira de feijão-fava e apresenta área colhida de 22.804 ha, sendo registrada produção de 616 t ha⁻¹ de feijão-fava no estado do Piauí (IBGE, 2013).

Em comparação com o feijão comum e o feijão-caupi, o cultivo de feijão-fava ainda é considerado pequeno, sendo realizado com pouca ou nenhuma tecnologia que ajude a incrementar a produção deste tipo de grão (Frazão et al., 2010; Silva et al., 2015). O uso de microrganismos eficientes em fixar o nitrogênio atmosférico pode influenciar positivamente na produtividade vegetal (Marinho et al., 2014). Neste sentido, o uso de rizóbios simbiotes representa uma ferramenta moderna com potencial para substituir, total ou parcialmente, a adubação nitrogenada no cultivo de

feijão-fava, com conseqüente redução de custos e beneficiando as plantas e o solo (Oliveira et al., 2014b).

2.3 Importância da fixação biológica do nitrogênio

O nitrogênio compõe aproximadamente 78% da atmosfera terrestre, entretanto se apresenta na forma gasosa (N_2) e não assimilável para as plantas. A FBN é um processo que necessita de grande quantidade de energia metabólica para quebrar a tripla ligação que une as duas moléculas de nitrogênio atmosférico ($N\equiv N$) e convertê-lo em amônio que pode ser fornecido às espécies vegetais (Martins et al., 2013). O nitrogênio é o mineral mais exigido pelas plantas, sendo constituinte de proteínas, ácidos nucléicos, clorofila e outras moléculas biologicamente importantes (Figueiredo et al., 2008). As espécies vegetais não possuem aparato enzimático para converter o N_2 em formas absorvíveis e assimiláveis, entretanto os rizóbios podem captar o N_2 e fixá-lo através da FBN (Figueiredo et al., 2008; Santos et al., 2009).

A capacidade de executar a FBN traz uma grande importância ao uso de rizóbios na agricultura. Os rizóbios são bactérias presentes no solo capazes de estabelecer simbiose com leguminosas (Rahmani et al., 2011) e, portanto, podem reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados. Vale salientar que os adubos nitrogenados possuem custo econômico e ambiental elevado (Khouzani e Nejad, 2015). Devido as perdas que ocorrem após a aplicação dos fertilizantes nitrogenados, o nitrogênio torna-se um poluente ambiental e, ao ser carregado para o lençol freático, pode provocar a contaminação de aquíferos, rios e lagos (Guedes et al., 2010). Desta forma, pode-se afirmar que a FBN é uma alternativa ecologicamente e economicamente viável em relação ao uso de adubos nitrogenados (Almeida et al., 2010; Moraes et al., 2010; Silva et al., 2010; Martins et al., 2013; Costa et al., 2014).

Pesquisas demonstram que a FBN pode substituir, em parte ou totalmente, a adubação nitrogenada no cultivo de leguminosas, principalmente em feijão-caupi e feijão comum (Moraes et al., 2010; Freitas et al., 2012; Costa et al., 2014; Fonseca et al., 2013; Rufini et al., 2014; Argaw e Akuma, 2015). A inoculação de feijão comum com *Rhizobium leguminosarum* reduz a necessidade de aplicação de adubos nitrogenados e melhora a eficiência no uso do nitrogênio (Argaw e Akuma, 2015). Em feijão-caupi, a inoculação com as cepas de rizóbios INPA 03 11B e UFLA 3-155 resultaram em rendimento de grãos equivalente ao observado nas plantas suplementadas com nitrogênio mineral (Costa et al., 2011).

Considerando que a simbiose entre plantas e rizóbios depende de diversos fatores, principalmente os fatores genético-fisiológicos da estirpe bacteriana e da planta hospedeira (Argaw e Akuma, 2015; Sulas et al., 2015), estudos visando otimizar a nodulação e a fixação biológica do nitrogênio são extremamente importantes, particularmente para leguminosas agronomicamente importantes, tais como feijão comum, feijão-caupi e feijão-fava. Desta forma, nota-se que a inoculação de leguminosas com estirpes de rizóbios eficientes em fixar o nitrogênio atmosférico pode promover incrementos significativos na produtividade vegetal (Buchi et al., 2015), mesmo em culturas com baixo nível tecnológico de produção – tal como o feijão-fava. Assim, empregando a FBN, é possível incrementar o rendimento das culturas sem aumentar de custos de produção (Marinho et al., 2014).

2.2 Interação simbiótica entre rizóbios e leguminosas

É crescente a busca por rizóbios capazes de interagir simbioticamente com espécies de leguminosas, que executem a FBN e promovam expressivos ganhos de produção juntamente com a redução de custos e benefícios ao meio ambiente (Figueiredo et al., 2008). O sucesso da simbiose entre rizóbios e leguminosas é reflexo

de um ambiente favorável para as bactérias e seu hospedeiro (Moreira e Siqueira, 2006), sendo necessária uma rizosfera favorável para uma efetiva interação entre estes organismos. Uma rizosfera favorável atua positivamente no crescimento e multiplicação dos rizóbios, garante o desenvolvimento das raízes vegetais e aumenta a capacidade de infecção das raízes por rizóbios, a formação de nódulos e a assimilação do nitrogênio pelas plantas (Uyanoz e Karaca, 2011).

A competitividade e o antagonismo entre a estirpe de rizóbios inoculada e os microrganismos nativos, a grande diversidade de microrganismos nativos e a promiscuidade das plantas em sua interação com os microrganismos presentes no solo estão entre os fatores que podem comprometer a interação entre os rizóbios e as espécies vegetais (Figueiredo et al., 2008). Além destes fatores, alterações no pH, temperatura, umidade, disponibilidade hídrica e quantidade de sais no solo podem afetar as interações entre os rizóbios e as espécies vegetais e, conseqüentemente, influenciam a nodulação e FBN (Aranjuelo et. al., 2014). Em solos com alta variabilidade de pH e temperaturas elevadas, os isolados de rizóbio AUFR128, AUFR132 e AUFR118 apresentaram boa eficiência simbiótica com feijão-caupi (Belay e Assefa, 2011).

Vários autores têm focado seus esforços na seleção de estirpes de rizóbios eficientes em incrementar a FBN e a produtividade vegetal juntamente com a redução dos custos de produção (Almeida et al., 2010; Costa et al., 2011; Freitas et al., 2012; Lima et al., 2012; Costa et al., 2014; Marinho et al., 2014; Rufini et al., 2014). Neste sentido, pesquisas com feijão comum e feijão-caupi resultaram na seleção de estirpes específicas para ambas espécies (Rahmani et al., 2011; Rodrigues et al., 2012; Costa et al., 2014; Marinho et al., 2014; Rufini et al., 2014; Argaw e Akuma, 2015) e estas se

encontram registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, sendo, portanto, recomendadas para uso nas áreas produtoras destes feijões (Tabela 2).

Tabela 1. Estirpes de rizóbios utilizadas no cultivo de feijão-caupi e feijão comum que se encontram registradas na base de dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Espécies de feijão	Microrganismos	Código da estirpe	
		Cepa autorizada	Designação original
Feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i>)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	SEMIA 6462	BR 3267
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	SEMIA 6461	UFLA 3-84
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	SEMIA 6463	INPA 3-11B
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	SEMIA 6464	BR 3262
Feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>Rhizobium tropici</i>	SEMIA 4077	CIAT 899
	<i>Rhizobium tropici</i>	SEMIA 4080	PRF 81
	<i>Rhizobium tropici</i>	SEMIA 4088	H 12

Embora existam estirpes recomendadas para a inoculação do feijão comum e feijão-caupi, os estudos continuam sendo realizados na busca por rizóbios mais eficientes em ambientes diversos (Brito et al., 2011; Fonseca et al., 2013; Costa et al., 2014; Rufini et al., 2014; Carranca et al., 2015). Em feijão-caupi, a nodulação com rizóbios nativos mostrara-se menos eficiente que a inoculação com a estirpe padrão recomendada pelo MAPA nas condições de semiárido brasileiro (Freitas et al., 2012) e em solos nutricionalmente pobres (Rufini et al., 2014). A inoculação de feijão-caupi com isolados de rizóbio provenientes de solos do sudoeste do Piauí provocaram incremento significativo no rendimento de grãos em relação ao observado com as estirpes padrões (Costa et al., 2014), enquanto que a inoculação com os rizóbios BR 3301 e UFLA 3-155 resultou em rendimento de grãos equivalente ao registrado para as plantas suplementadas com nitrogênio mineral (Brito et al., 2011).

O estudo da FBN em plantas de feijão-fava noduladas por rizóbios é um tema muito recente em relação ao volume de resultados gerados nas pesquisas realizadas com feijão-caupi e feijão-comum e, portanto, poucos registros são encontrados na

literatura. Resultados de pesquisas que avaliaram a ontogenia da nodulação de feijão-fava por rizóbios (Santos et al., 2009), o incremento do crescimento de feijão-fava em resposta à inoculação com *Bacillus* sp. (Lima, 2015) e a eficiência simbiótica de alguns isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (Antunes et al., 2011) já foram publicados, entretanto é notável a carência de dados sobre a associação simbiótica de rizóbios com plantas de feijão-fava que possam resultar em um inoculante específico para esta cultura.

2.3 A FBN na simbiose rizóbio-leguminosas

A interação simbiótica entre rizóbios e leguminosas é muito específica entre as bactérias e as plantas que levam à formação de nódulos para a fixação de nitrogênio em raízes de plantas. O desenvolvimento de uma simbiose bem-sucedida abrange várias etapas em que os dois parceiros trocam sinais químicos para que haja uma boa eficiência (Bogino et al., 2015). A eficiência da FBN nos bacteroides pode ser analisada através do teor de nitrogênio, do nitrogênio acumulado, da nodulação específica e da eficiência de fixação do nitrogênio (Rodrigues et al., 2013). O teor de nitrogênio é utilizado para determinar a eficácia das estirpes de rizóbio em realizar a FBN, pois o incremento de nitrogênio fixado leva ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas (Rugheim e Abdelgani, 2009). As leguminosas em simbiose com rizóbios acumulam nitrogênio devido ao processo de FBN que é altamente variável e dependente dos organismos envolvidos e das condições do ambiente (Buchi et al., 2015).

Outras variáveis, tais como o teor de clorofila, número de nódulos e a matéria seca dos nódulos e da parte aérea, são mensuradas nas espécies vegetais em simbiose com rizóbios. O nitrogênio fixado atua na expansão das folhas e influencia na atividade fotossintética das espécies vegetais e, portanto, pode determinar a

capacidade de fixação de carbono e acúmulo de massa seca pela planta (Voisin et al., 2015). Uma vez que o hospedeiro fornece fotoassimilados e abastece os bacteroides com os esqueletos de carbono e a energia necessária para fixar o N_2 (Aranjuelo et al., 2014) fica evidente o vínculo entre o metabolismo do carbono nos vegetais e do metabolismo de nitrogênio nos rizóbios. Desta forma, o número e a massa seca de nódulos podem ser úteis na avaliação da eficiência simbiótica entre rizóbios e leguminosas (Costa et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Multiplicação e preparo dos inoculantes microbianos

Os rizóbios utilizadas foram provenientes de amostras de solo coletadas em áreas produtoras de feijão-fava localizadas nos povoados Nova Esperança e Santa Rita, ambas do município de Água Branca/PI (Tabela 3). Inicialmente, todos os microrganismos foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura YMA (Manitol, Extrato de levedura e Ágar) com indicador vermelho congo para purificação das colônias. Após purificados, os isolados de rizóbio foram repicados para o meio de cultura líquido YM (Manitol e Extrato de levedura) e incubados em agitador rotatório tipo shaker (220 rpm; 28 °C) por 120 h. As estirpes BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. e CIAT 899 de *R. tropici*, cedidas pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica/RJ), foram utilizadas como padrão. Após purificação, as estirpes BR 3267 e CIAT 899, foram repicadas em meio líquido YM e incubadas em agitador rotatório (220 rpm; 28 °C) por 96 h e 72 h, respectivamente.

Tabela 2. Rizóbios isolados de amostras de solo de áreas produtoras de feijão-fava (Santos et al., 2009; Antunes et al., 2011; Araújo et al., 2015).

Isolado (ISOL)	Espécie/Gênero bacteriano [#]	Cultivar hospedeira	Tempo de crescimento	Povoados
ISOL-32	<i>B. japonicum</i>	Fava miúda	Intermediário	Nova Esperança
ISOL-34	<i>Mesorhizobium loti</i>	Fava miúda	Intermediário	Nova Esperança
ISOL-35	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Fava miúda	Intermediário	Nova Esperança
ISOL-50	<i>B. japonicum</i>	Fava miúda	Intermediário	Nova Esperança
ISOL-16	<i>Rhizobium</i> sp.	Boca de moça	Intermediário	Santa Rita
ISOL-18	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Fava miúda	Intermediário	Santa Rita
ISOL-19	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Fava miúda	Intermediário	Santa Rita

[#]Espécie bacteriana identificada por alinhamento com as sequências contidas na base de dados do GenBank - National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.2 Seleção e preparo das sementes

As sementes de feijão-fava das variedades crioulas Boca de Moça e Branca foram escolhidas por serem as mais cultivadas e consumidas na região. Antes da semeadura, as sementes crioulas de feijão-fava foram selecionadas, desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% (60'') e álcool 70% (30'') e, posteriormente, submetidas à sucessivas lavagens com água destilada e autoclavada (Hungria e Araújo, 1994). Após o procedimento, as sementes crioulas de feijão-fava foram dispostas em folhas de papel toalha autoclavado e secas em câmara de fluxo.

3.3 Condução do experimento

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação localizada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (Teresina/PI). Após o preparo do inoculante microbiano e das sementes de feijão-fava, procedeu-se a inoculação e, simultaneamente, a implementação dos tratamentos. Para a inoculação, adicionou-se 1,0 mL do meio de cultura YM contendo o isolado bacteriano na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ à superfície da semente de feijão-fava. As sementes de feijão-fava foram inoculadas e semeadas em vasos de Leonard contendo areia lavada (pH 6,8) e autoclavada (120°C; 101 kPa). Além das plantas inoculadas, conduziu-se duas testemunhas: (1) testemunha absoluta, que consistiu de plantas de feijão-fava não inoculadas e irrigadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Silveira et al. (1998) e isenta de nitrogênio (pH 6,8); e (2) testemunha nitrogenada, que consistiu de plantas não inoculadas e irrigadas com solução nutritiva isenta de nitrogênio, mas que receberam suplementação com nitrogênio mineral (0,0084 g de sulfato de amônio) aos 7, 14 e 21 dias após a germinação. A troca da solução nutritiva foi realizada a cada quatro dias e o pH aferido diariamente.

3.4 Coleta de dados e variáveis analisadas

A coleta foi realizada em três períodos: florescimento (37 dias); emissão de vagens (50 dias) e enchimento das vagens (63 dias), períodos que compreendem desde o estabelecimento da simbiose até a senescência dos nódulos. A altura das plantas foi avaliada com auxílio de trena a cada cinco dias até a última coleta do experimento (63 dias) e com base nestes dados calculou-se a taxa de crescimento absoluto (Benincasa, 2003). O comprimento da raiz, obtido com fita métrica, foi mensurado apenas no período de enchimento das vagens.

Em cada coleta, determinou-se o diâmetro do caule com paquímetro digital e, então, as plantas foram particionadas em parte aérea, raízes e nódulos, transferidas separadamente para sacos de papel e, então, secas em estufa de aeração forçada a 65°C até peso constante. Após a secagem em estufa, as partições foram quantificadas e mensurou-se a massa seca da parte aérea e das raízes (Benincasa, 2003). Os nódulos foram contados manualmente para a determinação do número de nódulos e, então, secos em estufa para determinar a massa seca dos nódulos.

As amostras secas da parte aérea e dos nódulos foram mineralizadas na presença de mistura catalisadora (sulfato de potássio, sulfato de cobre e ácido sulfúrico concentrado) e nestas determinou-se o nitrogênio total conforme método proposto por Kjeldahl (Silva e Queiroz, 1981). Com base nos dados de nitrogênio total e de massa seca da parte aérea, calculou-se o nitrogênio acumulado (Nac) e teor de nitrogênio (Bremner, 1965). A clorofila total foi mensurada com uso do aparelho Clorofilog[®] (Falker, Brasil) em cada ponto de coleta. A nodulação específica e a eficiência da fixação de nitrogênio foram calculadas com base nos valores de nitrogênio total e da massa seca da raízes e nódulos (Gulden e Vessey, 1998)

3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial $9 \times 2 \times 3 + 2$, sendo nove bactérias (sete isolados e dois padrões), duas variedades crioulas de feijão-fava (Boca de Moça e Branca), três períodos de coleta (florescimento, emissão e enchimento das vagens) e duas testemunhas (nitrogenada e absoluta), com três repetições. Os resultados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk (alfa de 5%). Posteriormente, realizou-se a análise de variância (ANOVA), precedido pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, e as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas supracitadas foram realizadas utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7 (versão beta).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Taxa de crescimento absoluto

Considerando que a taxa de crescimento absoluto expressa a velocidade de crescimento das plantas ao longo do seu ciclo de vida, optou-se por mensurar esta variável apenas ao final do experimento. Neste estudo, notou-se que as plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça exibiram menor taxa de crescimento absoluto quando inoculadas com o rizóbio ISOL-18 e com a estirpe CIAT 899, enquanto que a inoculação com o rizóbio ISOL-32 resultou em aumento na taxa de crescimento absoluto do feijão-fava var. crioula Boca de Moça (Figura 1). Similarmente, plantas de feijão-caupi inoculadas com rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia apresentaram incrementos significativos no crescimento vegetativo (Chagas Júnior et al., 2010).

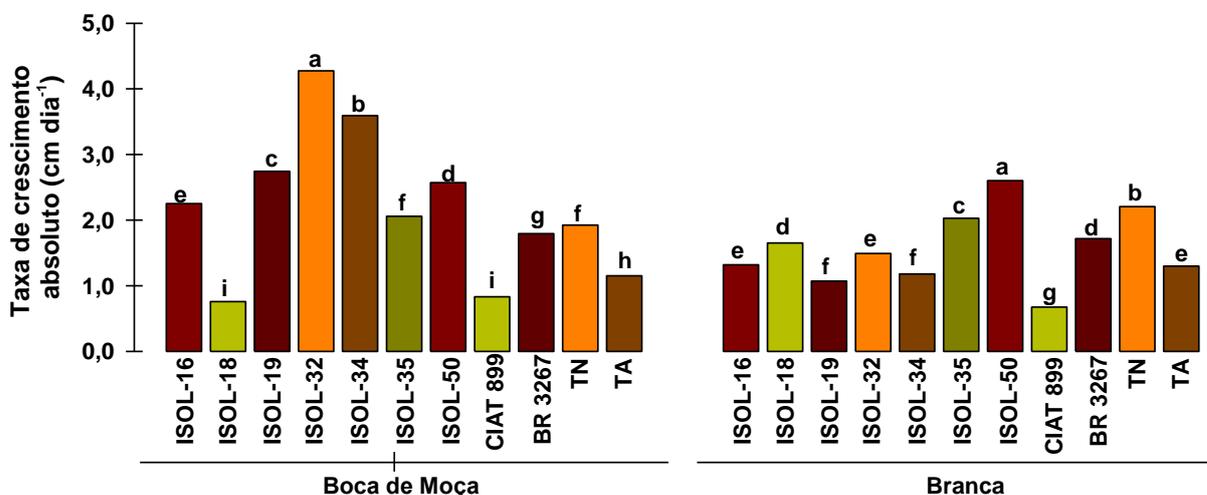


Figura 1. Taxa de crescimento absoluto de feijão-fava var. crioula Boca de Moça e Branca inoculadas com diferentes isolados de rizóbio no período de enchimento de vagens. Em cada variedade, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

No feijão-fava var. crioula Branca foram observadas diferenças entre os rizóbios testados, sendo a interação simbiótica com o rizóbio ISOL-50 superior aos demais pares simbióticos. A simbiose entre o feijão-fava var. crioula Branca e o rizóbio ISOL-50 resultou no aumento de 20%, 51% e 100% da taxa de crescimento absoluto em relação às plantas suplementadas com nitrogênio mineral, às plantas inoculadas

com a estirpe BR 3267 e às plantas sem adubação (testemunha absoluta), respectivamente (Figura 1). Este resultado pode indicar que o rizóbio ISOL-50 pode ter estimulado o crescimento durante o período experimental ainda podendo ser um indicativo de maior acumulação de biomassa pela parte aérea.

4.2 Comprimento da raiz

A inoculação das plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça com os rizóbios isolados das amostras de solo induziu incrementos significativos no comprimento da raiz, principalmente nas plantas inoculadas com o rizóbio ISOL-32 (Figura 2). A interação simbiótica entre o feijão-fava var. crioula Boca de Moça e o rizóbio ISOL-32 resultou em maior comprimento da raiz em relação aos demais rizóbios utilizados e à testemunha nitrogenada. Similarmente, plantas de mucuna-cinza e mucuna-anã incrementaram o comprimento das raízes em resposta à inoculação com isolados de rizóbios nativos (Lima et al., 2012). A inoculação do feijão-fava var. crioula Boca de Moça com o rizóbio ISOL-18 resultou no menor comprimento da raiz, sendo 18% menor que a testemunha absoluta e 60% menor que no feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com o ISOL-32.

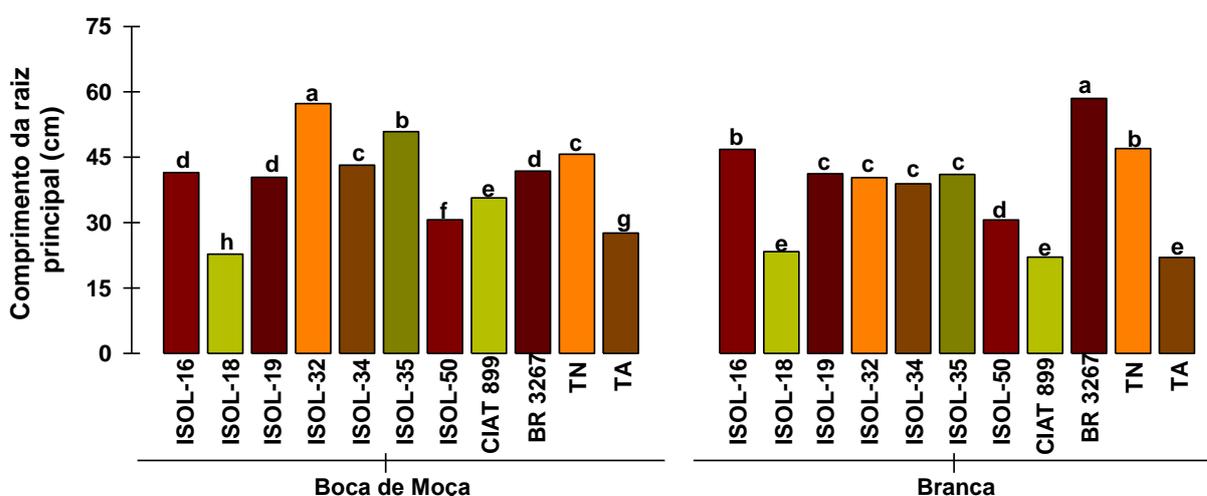


Figura 2. Comprimento da raiz de feijão-fava var. crioula Boca de Moça e Branca inoculadas com diferentes isolados de rizóbio no período de enchimento de vagens. Em cada variedade, médias seguidas por mesma letra não diferem entre si (Teste de Duncan, $P < 0,05$).

É provável que a presença da estirpe BR 3267 ou do rizóbio ISOL-16 na rizosfera das plantas de feijão-fava var. crioula Branca tenha proporcionado aumento na mobilização e disponibilidade de nutrientes e, portanto, incremento significativo das raízes destas plantas. Uma vez que a inoculação do feijão-fava var. crioula Branca com o rizóbio ISOL-18 resultou em menor comprimento da raiz em relação aos demais isolados testados, sendo estatisticamente similar à testemunha absoluta, pode-se inferir que este rizóbio não interagiu positivamente com as raízes do feijão-fava var. crioula Branca e, portanto, pode não ter sido capaz de fixar o nitrogênio atmosférico e, conseqüentemente, estimular o desenvolvimento das raízes destas plantas – conforme verificado por Uyanoz e Karaca (2011).

Houve maior comprimento da raiz quando o feijão-fava var. crioula Branca foi inoculado com a estirpe BR 3267, seguido pelo observado no feijão-fava var. crioula Branca quando inoculado com o rizóbio ISOL-16 e nas plantas suplementadas com nitrogênio mineral (testemunha nitrogenada) (Figura 2). Em plantas de feijão-caupi, observou-se maior comprimento das raízes em resposta à inoculação com a estirpe BR 3267 isolado ou em combinação com bactérias promotoras de crescimento (Rodrigues et al., 2012). Além disso, plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* em combinação com *Bacillus*, *Brevibacillus* e/ou *Paenibacillus* exibiram maior comprimento da raiz independente das bactérias combinadas com *Bradyrhizobium* (Lima et al. 2011).

4.3 Diâmetro do caule

O caule desempenha uma função extremamente importante para a planta, pois promove sua sustentação. Maior diâmetro do caule melhora a sustentação das plantas e diminui a possibilidade de acamamento (Oliveira et al., 2014b). Neste estudo, o feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com o rizóbio ISOL-34 apresentou

menor diâmetro do caule no florescimento em relação aos demais tratamentos, enquanto que a inoculação com a estirpe CIAT 899 resultou em maior diâmetro do caule (Figura 3A). Em plantas de *Enterolobium contortsiliquum*, a adubação com nitrogênio (mineral ou de matéria vegetal decomposta) promoveu maior diâmetro do caule em relação às plantas inoculadas com rizóbios (Sousa et al., 2013).

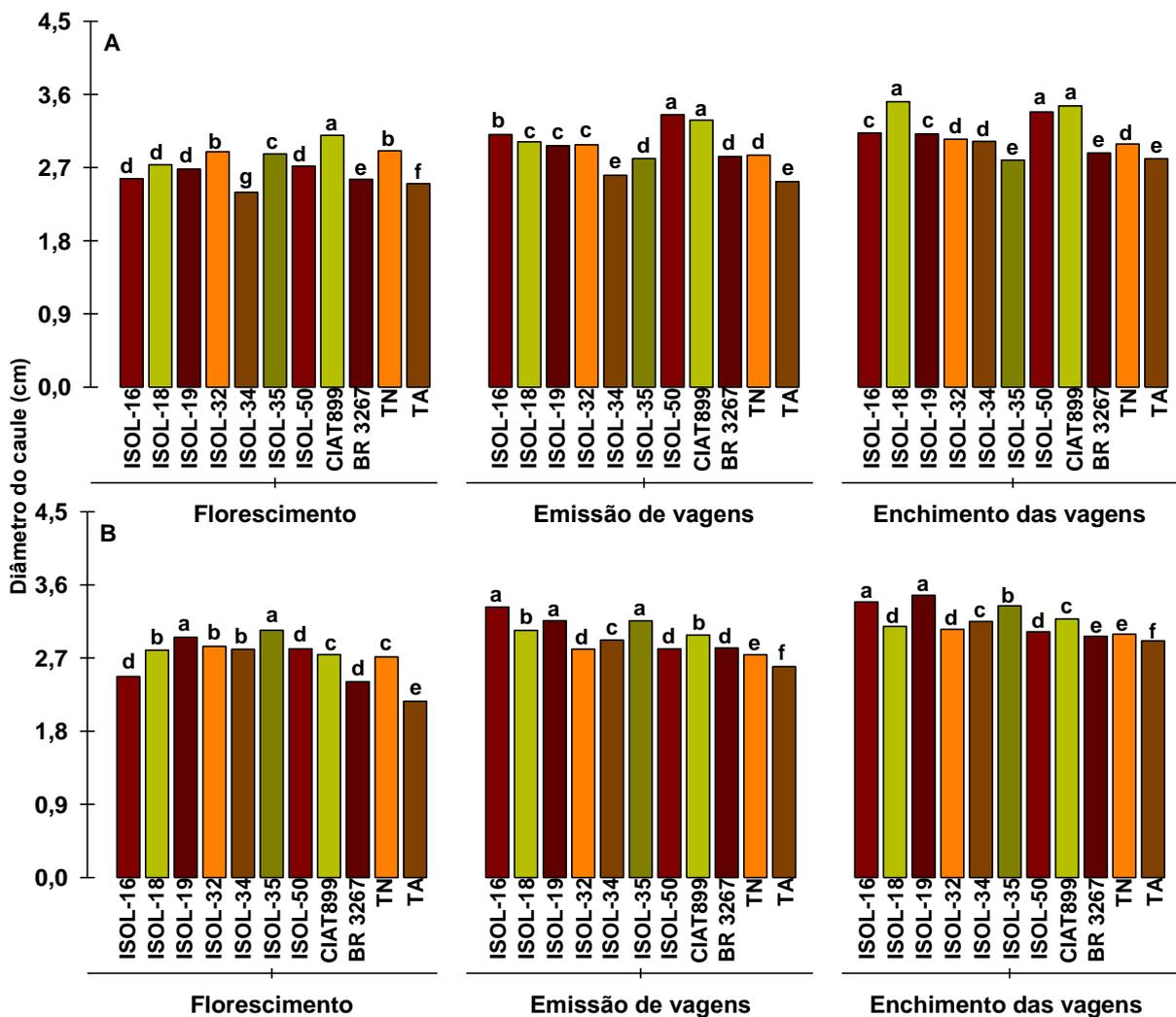


Figura 3. Diâmetro do caule de feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Teste de Duncan, $P < 0,05$).

A inoculação de feijão-fava com o rizóbio ISOL-50 e a estirpe CIAT 899 resultou em maior diâmetro do caule no período de emissão de vagens, enquanto que a inoculação com os rizóbios ISOL-18, ISOL-50 e a estirpe CIAT 899 induziram maior diâmetro do caule no período de enchimento de vagens. Estes resultados indicam que

a inoculação com estes microrganismos influencia no diâmetro do caule de plantas de feijão-fava e, portanto, supõe-se que estas plantas tenham tido um melhor equilíbrio no crescimento da parte aérea e ainda uma maior translocação de fotoassimilados para os órgãos responsáveis pelo crescimento destes vegetais.

No feijão-fava var. crioula Branca, a inoculação com o rizóbio ISOL-19 resultou em aumento no diâmetro do caule nos três períodos avaliados (florescimento, emissão e enchimento de vagens), sendo superior às plantas de feijão-fava que foram inoculadas com as estirpes BR 3267 e CIAT 899 bem como ao observado para as testemunhas nitrogenada e absoluta (Figura 3B). Além do rizóbio ISOL-19, houve destaque para as plantas inoculadas com o ISOL-35 no florescimento e emissão de vagens e com o ISOL-16 na emissão e no enchimento de vagens. Similarmente ao registrado para o feijão-fava var. crioula Branca, a inoculação de *Senna multijuga* e de *P. vulgaris* com rizóbios resultou em maior diâmetro do caule (Lírio et al., 2012).

4.4 Massa seca da parte aérea

Alterações significativas na massa seca da parte aérea foram observadas nas plantas de feijão-fava em resposta à inoculação com diferentes isolados de rizóbios nos três períodos de avaliação (Figura 4). As plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculadas com os rizóbios ISOL-32 ou ISOL-50 ou com a estirpe CIAT 899 apresentaram maior massa seca da parte aérea em relação aos demais tratamentos no período de emissão de vagens, enquanto que as plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculadas com o rizóbio ISOL-32 exibiram maior massa seca da parte aérea no período de enchimento de vagens. Já no feijão-fava var. crioula Branca, a inoculação com o rizóbio ISOL-50 resultou em maior massa seca da parte aérea em relação aos demais tratamentos no período de florescimento e emissão de vagens, sendo expressivamente superior às testemunhas nitrogenada e absoluta (Figura 4A).

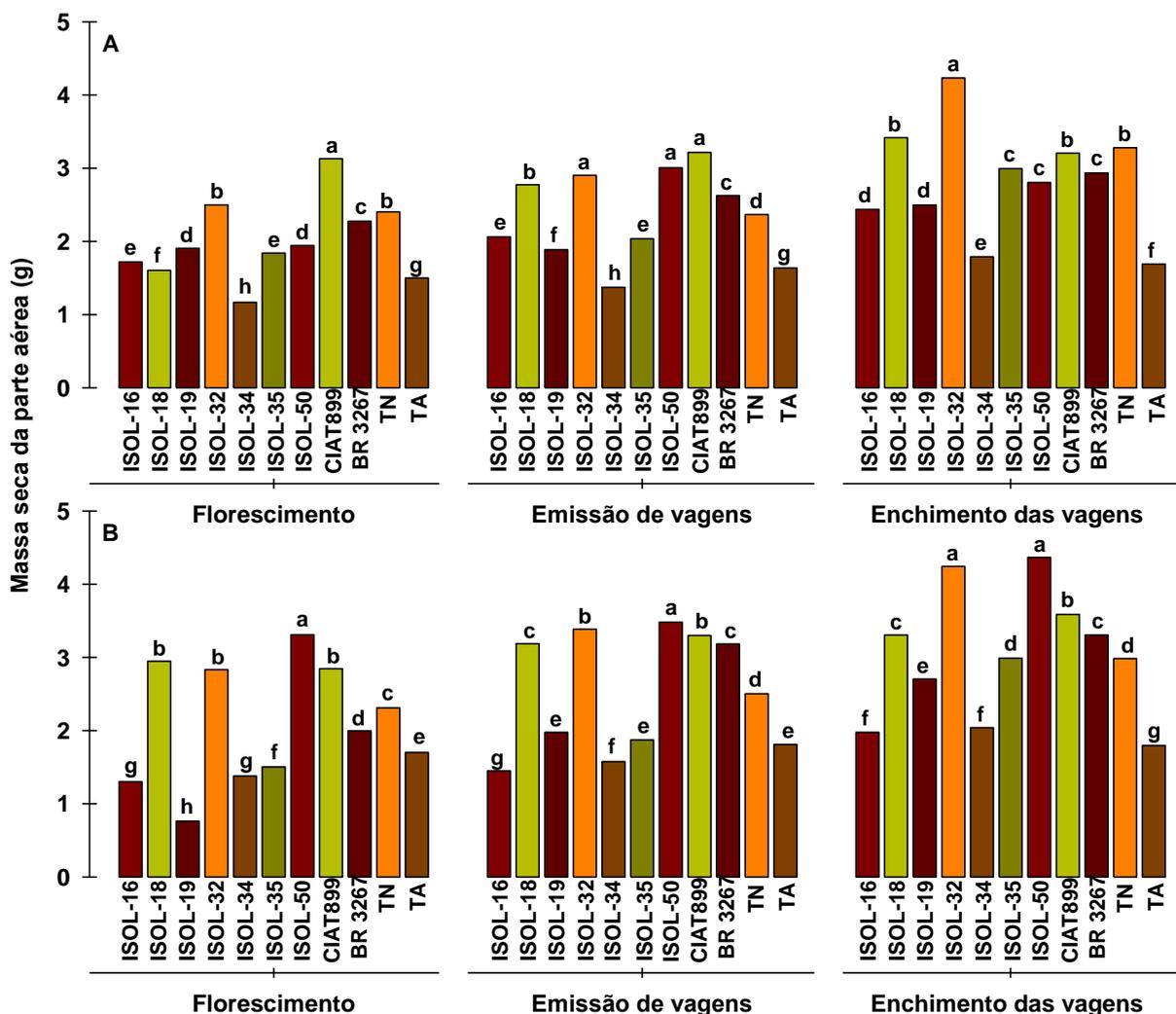


Figura 4. Massa seca da parte aérea de feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

De modo geral, os rizóbios utilizados neste estudo foram eficientes em promover o desenvolvimento das plantas de feijão-fava em taxas superiores ou semelhantes às plantas que receberam adubação nitrogenada, tal fato pode ser atribuído ao aporte de nitrogênio fixado e disponibilizado a estas plantas. Igualmente ao reportado no presente estudo, a inoculação do feijão-caupi com uma nova formulação de inoculante rizobiano proporcionou valores de massa seca da parte aérea semelhantes ao observado no tratamento que recebeu adubação nitrogenada (Silva Júnior et al., 2012). A inoculação de feijão-fava com isolados de rizóbio

resultaram em valores de massa seca da parte aérea estatisticamente similares às plantas inoculadas com a estirpe CIAT 899.

4.5 Massa seca das raízes

As variedades crioulas de feijão-fava (Boca de Moça e Branca) exibiram diferenças significativas na massa seca das raízes em resposta à inoculação com os diferentes isolados de rizóbio testados (Figura 5). Observou-se que as plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculadas com o rizóbio ISOL-19 mostraram incremento significativo na massa seca das raízes no período de florescimento, enquanto que no período de emissão de vagens as plantas inoculadas com este rizóbio foram estatisticamente similares às plantas suplementadas com nitrogênio (testemunha nitrogenada) (Figura 5A). Do mesmo modo, plantas de feijão-caupi inoculadas com isolados de rizóbios nativos de solos da Amazônia exibiram massa seca das raízes similar às plantas suplementadas com nitrogênio mineral (Chagas Júnior et al., 2010). No enchimento de vagens, o feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com o rizóbio ISOL-18 exibiu maior valor de massa seca das raízes e foi 150% superior a testemunha absoluta.

Observou-se incremento significativo na massa seca das raízes do feijão-fava var. crioula Branca suplementado com nitrogênio mineral (testemunha nitrogenada) no florescimento (Figura 5B). A inoculação das plantas de feijão-fava var. crioula Branca com o rizóbio ISOL-18 e com a estirpe BR 3267, e também a testemunha nitrogenada, incrementou a massa seca das raízes no período de emissão de vagens e resultou em incrementos expressivos nesta variável no período de enchimento de vagens, juntamente com o observado nas plantas inoculadas com o rizóbio ISOL-50 (Figura 5B). A inoculação com rizóbios também proporcionou incremento na massa seca das raízes de plantas de mucuna-anã (Lima et al., 2012) e de *Enterolobium*

contortsiliquum (Sousa et al., 2013), sendo estas plantas superiores à testemunha absoluta e nitrogenada.

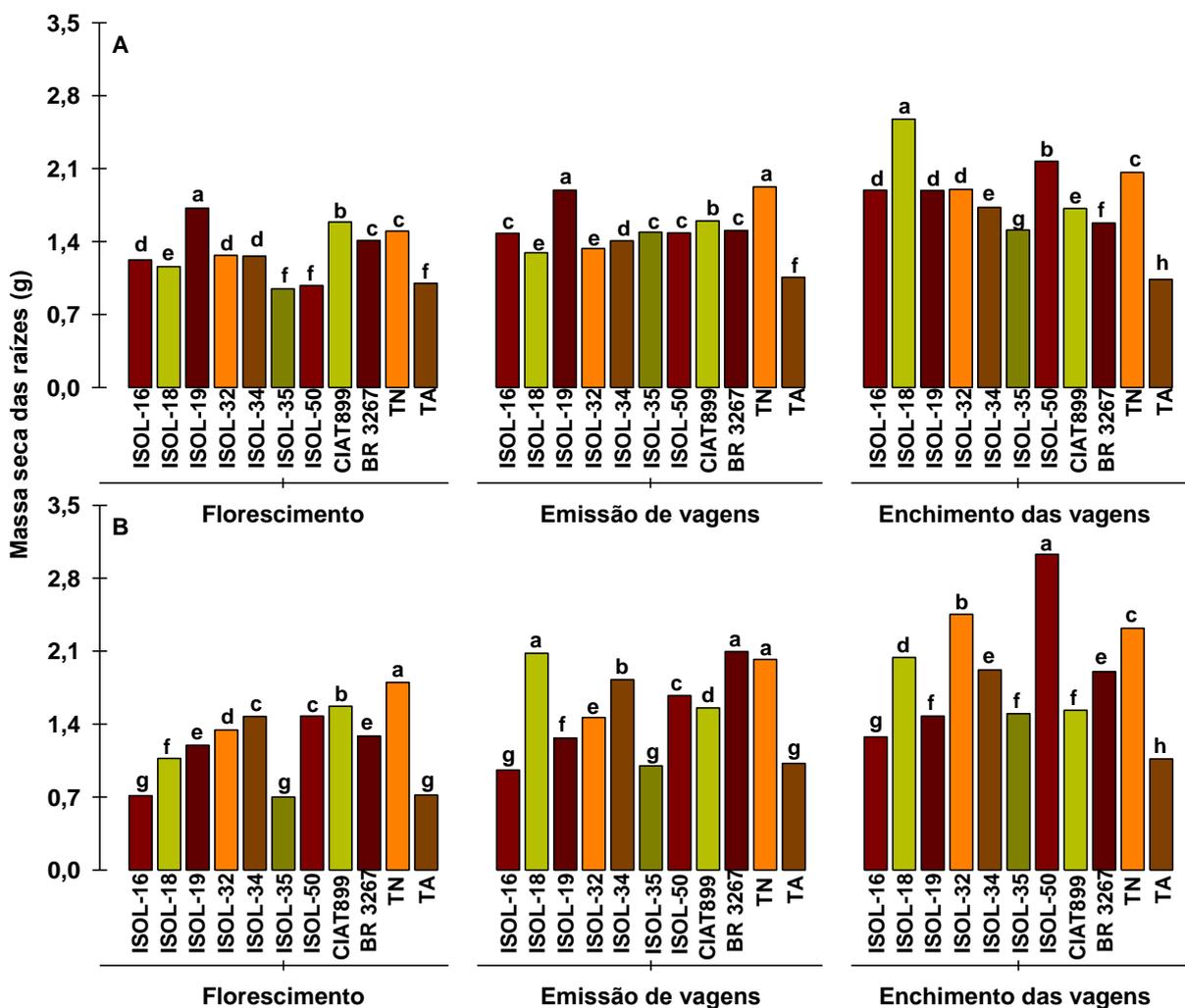


Figura 5. Massa seca das raízes de feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

4.6 Número de nódulos

O número de nódulos foi maior nas plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculadas com o rizóbio ISOL-32 tanto no período de florescimento como também no período de emissão de vagens, enquanto que a inoculação com o rizóbio ISOL-50 resultou em maior número de nódulos no período de enchimento de vagens (Figura 6A). O maior número de nódulos registrado nas plantas inoculadas com os rizóbios ISOL-32 e/ou ISOL-50 pode indicar maior capacidade competitiva destes

isolados em nodular as raízes das plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça. O feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com o rizóbio ISOL-32 apresentou 558 nódulos planta⁻¹ no período de emissão de vagens e o feijão-fava inoculado com o rizóbio ISOL-50 exibiu 630 nódulos planta⁻¹ no período de enchimento de vagens. Já a inoculação com a estirpe CIAT 899 ou com o rizóbio ISOL-35 resultou em 27 nódulos planta⁻¹ na emissão de vagens e no enchimento de vagens, respectivamente.

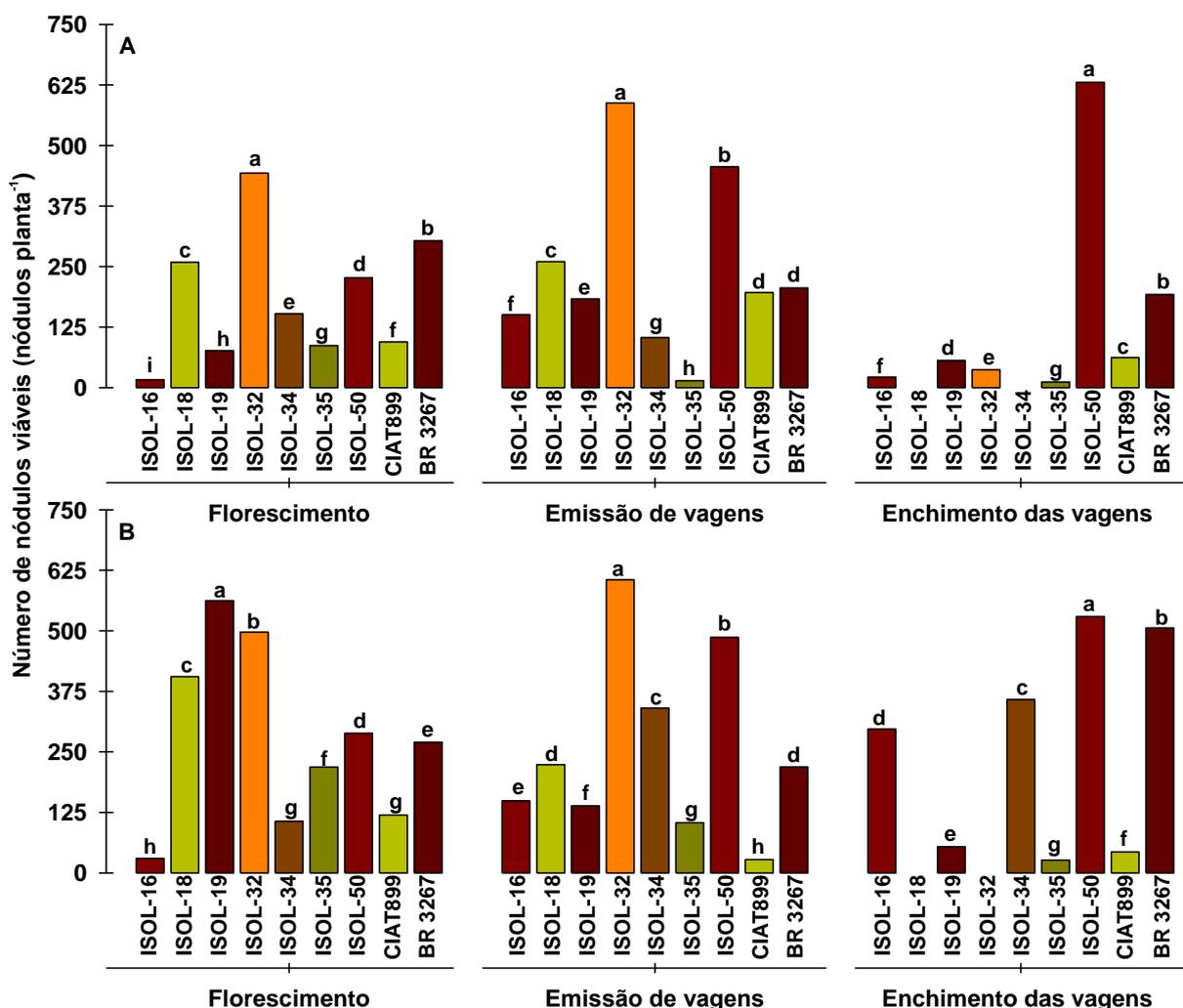


Figura 6. Número de nódulos no feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

No feijão-fava var. crioula Branca, a inoculação com o rizóbio ISOL-19, ISOL-32 e ISOL-50 induziu maior número de nódulos nos períodos de florescimento, emissão e enchimento de vagens, respectivamente (Figura 6B). Segundo Santos

et al. (2009), o número de nódulos nas plantas de feijão-fava aumenta significativamente após 45 dias de cultivo, período posterior ao florescimento destas plantas. O maior número de nódulos observado nas plantas inoculadas com o rizóbio ISOL-19, ISOL-32 e ISOL-50 resultam, provavelmente, de uma interação simbiótica mais favorável entre estes rizóbios e o feijão-fava, particularmente nas plantas inoculadas com o rizóbio ISOL-50 que manteve maior número de nódulos no período mais tardio de avaliação (enchimento das vagens).

A inoculação de feijão-fava com isolados de *R. leguminosarum* bv. *viciae* resultou em números de nódulos diferentes para cada isolado testado (Belay e Assefa, 2011). Em feijão-caupi, registrou-se maior número de nódulos quando as plantas foram inoculadas com a estirpe UFLA 03-154 em relação às plantas inoculadas com a estirpe BR 3267 (Guedes et al., 2010). Similarmente, a simbiose entre feijão-caupi e as estirpes BR 3262, BR 3299T, INPA 03-11B e UFLA 03-84 resultou em elevado número de nódulos (Marinho et al., 2014). Embora o número de nódulos forneça informações interessantes sobre a simbiose planta-rizóbio, este parâmetro não deve ser analisado isoladamente tendo em vista que pode ocorrer a formação de vários nódulos pequenos ineficientes em fixar o nitrogênio atmosférico (Fonseca et al., 2013).

4.7 Massa seca de nódulos

A massa seca de nódulos foi mensurada nas plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça e Branca e observou-se diferenças significativas nesta variável para os três períodos de avaliação (Figura 7). O feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com o rizóbio ISOL-18 apresentou maior valor de massa seca de nódulos no florescimento, enquanto que as plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculadas com o rizóbio ISOL-18 ou ISOL-32 se destacaram em relação aos demais tratamentos com maior massa seca de nódulos no período de emissão de vagens

(Figura 7A). No enchimento das vagens, os nódulos de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com o rizóbio ISOL-50 apresentaram maior massa seca.

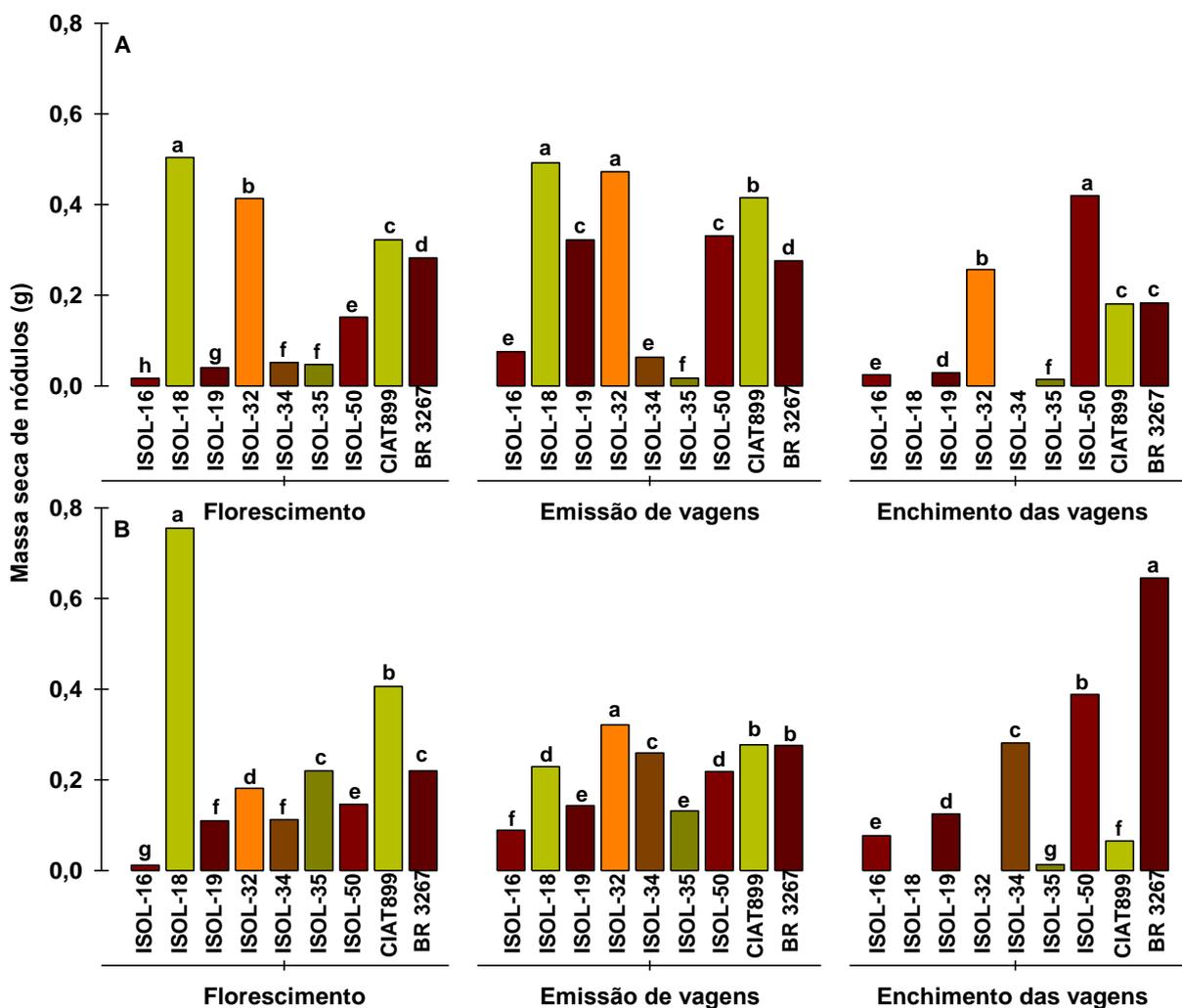


Figura 7. Massa seca de nódulos de var. crioulas de feijão-fava Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Teste de Duncan, $P < 0,05$).

No ponto de florescimento as plantas de feijão-fava var. crioula Branca inoculadas com o rizóbio ISOL-18 ou com o rizóbio ISOL-16 apresentaram o maior e menor valor de massa seca de nódulos, respectivamente (Figura 7B). A massa seca de nódulos das plantas de feijão-fava var. crioula Branca inoculadas com o rizóbio ISOL-32 foi superior aos demais tratamentos no período de emissão de vagens, sendo cerca de 20% superior ao obtido nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3267 ou com *R. tropici* CIAT 899. O feijão-fava var. crioula Branca inoculado com a estirpe

BR 3267 apresentou maior massa seca de nódulos no período de enchimento de vagens, seguido pelas plantas inoculadas com ISOL-50 e ISOL-34 (Figura 7B).

Os isolados de rizóbio ISOL-18, ISOL-32, ISOL-50 e a estirpe BR 3267 proporcionaram maior massa seca de nódulos nas plantas de feijão-fava e, provavelmente, estes isolados podem proporcionar maior eficiência da FBN (Santos et al., 2009). Plantas de feijão-caupi inoculadas com os rizóbios UFLA 3-164 e UFLA 3-155 exibiram valores de massa seca de nódulos semelhantes ao registrado para as estirpes padrões BR 3302, BR 3301 e BR 3267 (Costa et al., 2011). Além disso, a inoculação de feijão macassar com diferentes estirpes de rizóbio não induziu diferenças significativas na massa seca de nódulos e, portanto, foram similares entre si (Vieira et al., 2010). Segundo Costa et al. (2014), a avaliação do número e da massa seca de nódulos são parte do protocolo de avaliação da eficiência simbiótica de rizóbios e são utilizados pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a formalização de inoculantes específicos para as culturas.

4.8 Nitrogênio acumulado

Houve diferença significativa entre os tratamentos aplicados para o nitrogênio acumulado nas plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça e Branca. As plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculadas com o rizóbio ISOL-32 apresentaram nitrogênio acumulado superior às testemunhas e aos padrões, principalmente no florescimento e na emissão de vagens (Figura 8A). A inoculação de plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça com o rizóbio ISOL-18 induziu maior nitrogênio acumulado no período de enchimento de vagens. O maior acúmulo de nitrogênio observado nas plantas inoculadas com os rizóbios ISOL-32 e ISOL-18 podem ser reflexo de uma maior fixação e fornecimento de nitrogênio em comparação

aos outros tratamentos, tal como observado por Costa et al. (2014) em plantas de feijão-caupi inoculadas com estirpes de rizóbios do Sudoeste do Piauí.

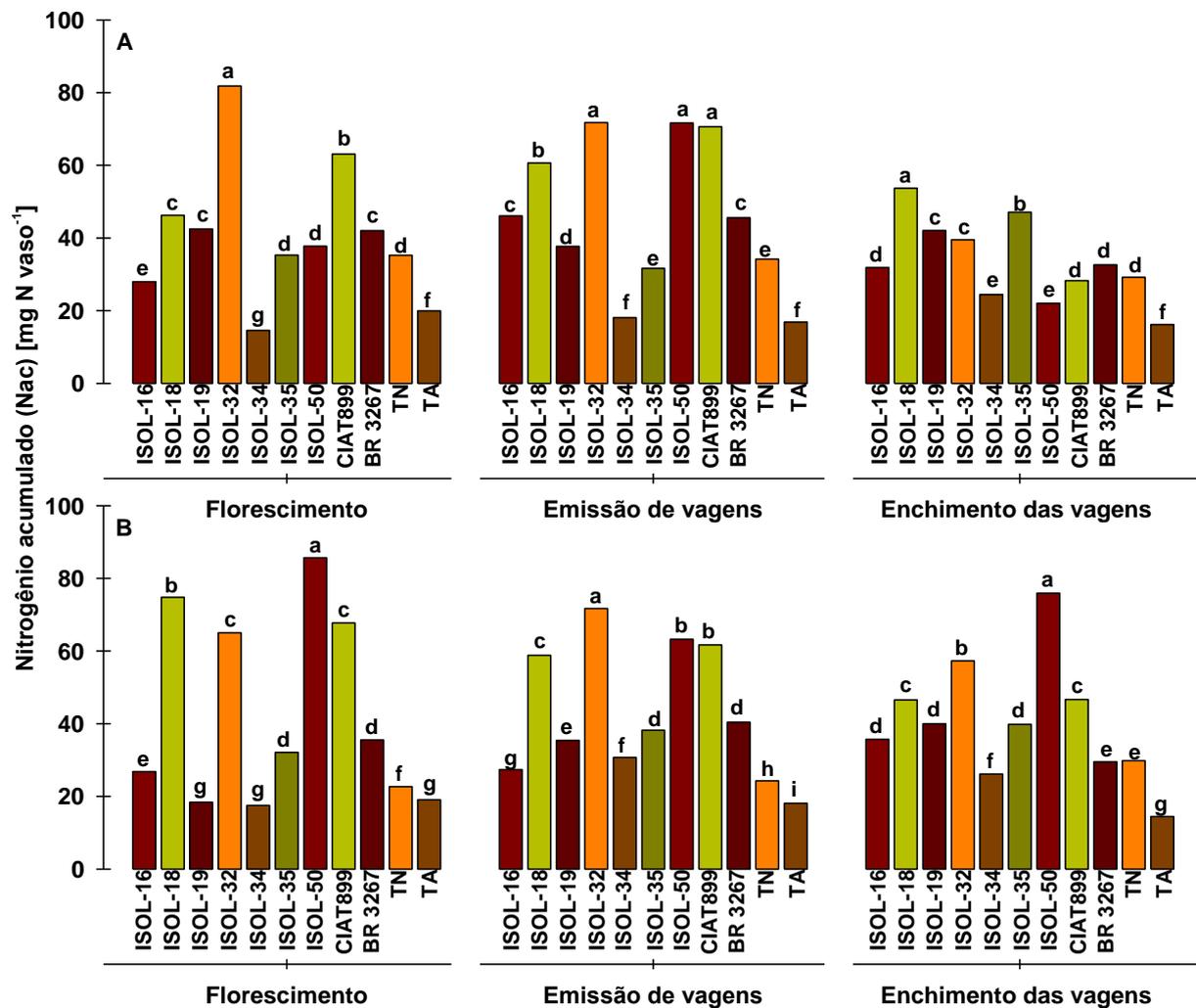


Figura 8. Nitrogênio acumulado no feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculado com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

As plantas de feijão-fava var. crioula Branca inoculadas com o rizóbio ISOL-50 apresentaram maior valor de nitrogênio acumulado no florescimento e no período de enchimento de vagens, enquanto que na emissão de vagens o maior valor foi obtido com o rizóbio ISOL-32 (Figura 8B). O nitrogênio acumulado tem sido considerado um parâmetro indicador de estirpes com potencial para compor inoculantes com elevada eficiência simbiótica (Alcântara et al., 2014). De fato, as plantas de feijão-fava var. crioula Branca inoculadas com o rizóbio ISOL-50 apresentaram maior valor de

nitrogênio acumulado no período de enchimento de vagens e mostraram, portanto, maior eficiência em fixar nitrogênio.

A estirpe CIAT 899 induziu incremento no nitrogênio acumulado no feijão comum cv. União, Radiante e Bolinha, enquanto que a inoculação com a UFLA 04-173 induziu maior nitrogênio acumulado nas cultivares Majestoso, Radiante e Bolinha (Fonseca et al., 2013). O feijão-caupi cv. BRS Guariba inoculado com estirpes de rizóbio no sudoeste do Piauí apresentaram menor teor de nitrogênio em relação às plantas inoculadas com a estirpe BR 3267, entretanto foram semelhantes ao tratamento suplementado com nitrogênio mineral (Costa et al., 2014), diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo. Em estudos realizados com feijão-caupi inoculado com a estirpe BR 3299 e a testemunha nitrogenada apresentaram maior nitrogênio acumulado em relação aos outros rizóbios testados (Gualter et al., 2011).

4.9 Teor de nitrogênio

Comparando os três períodos de avaliação, observou-se menor teor de nitrogênio nas plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça e Branca no período enchimento de vagens (Figura 9). O feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com rizóbio ISOL-32 apresentou maior teor de nitrogênio no período de florescimento, seguido pelas plantas inoculadas com o rizóbio ISOL-18 (Figura 9A). No período de emissão de vagens, as plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculadas com o rizóbio ISOL-32 apresentou o maior teor de nitrogênio em relação aos demais tratamentos. No período de enchimento de vagens, o feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com os rizóbios ISOL-19 apresentou maior teor de nitrogênio, enquanto que a inoculação com os rizóbios ISOL-32 e ISOL-50 não incrementou o teor de nitrogênio em relação a testemunha nitrogenada.

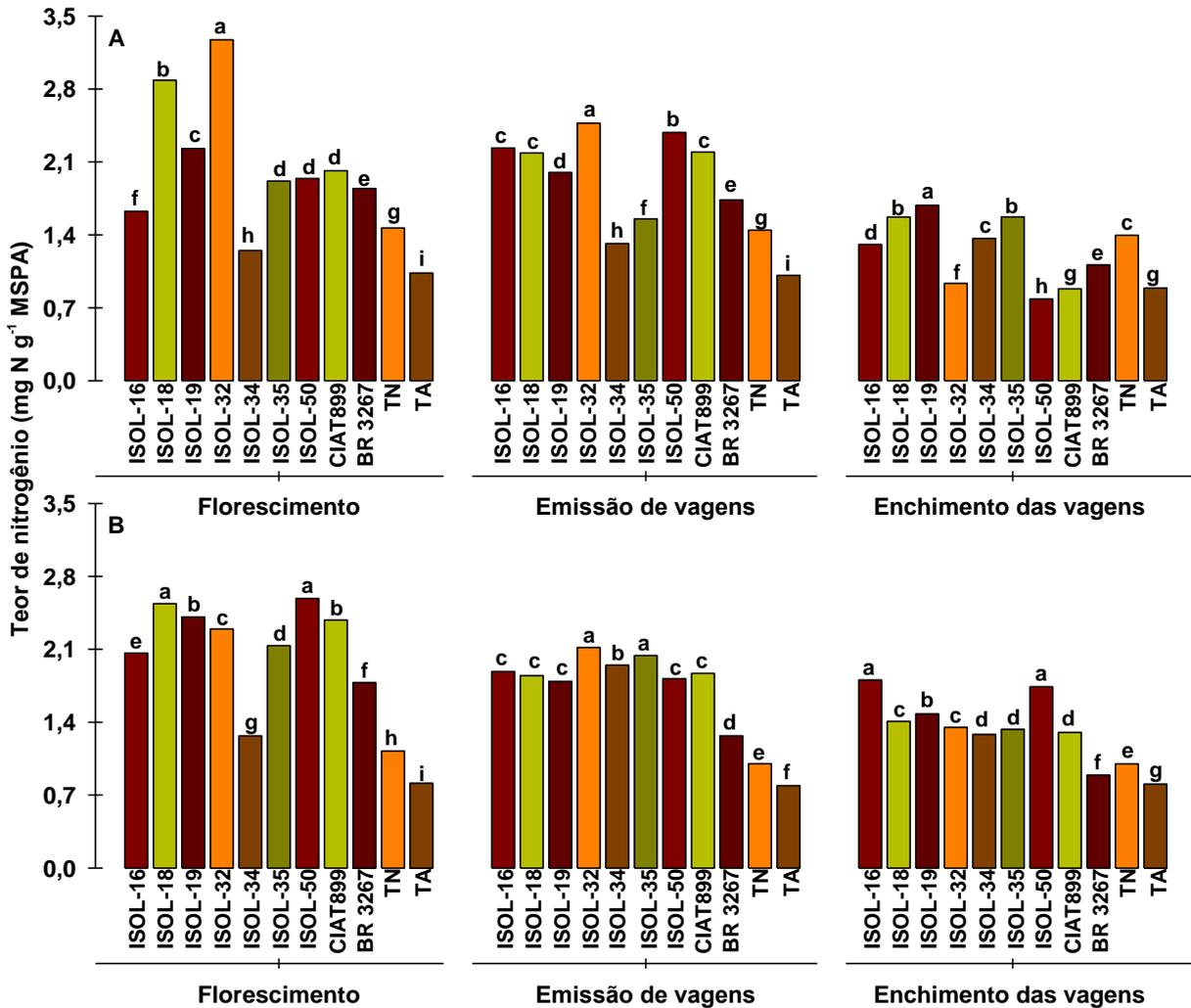


Figura 9. Teor de nitrogênio de feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculadas com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Teste de Duncan, $P < 0,05$).

O teor de nitrogênio nas plantas de feijão-fava var. crioula Branca foi mais elevado no período de florescimento (Figura 9B), principalmente quando estas plantas foram inoculadas com os rizóbios ISOL-50 e ISOL-18. No geral, as plantas de feijão-fava var. crioula Branca cultivadas sem suplementação com nitrogênio (testemunha absoluta) apresentaram menor teor de nitrogênio ($0,8 \text{ mg N g}^{-1} \text{ MSPA}$), em relação a todos os tratamentos, independente do período de avaliação. No período de emissão de vagens, notou-se que as plantas de feijão-fava var. crioula Branca inoculadas com os rizóbios ISOL-32 ou ISOL-35 apresentaram maior teor de nitrogênio, ambas 107% superiores à testemunha nitrogenada. O feijão-fava var. crioula Branca inoculado com

os rizóbios ISOL-16 ou ISOL-50 apresentou maior teor de nitrogênio no enchimento de vagens e, portanto, foram superiores aos demais tratamentos.

Os resultados indicam que as respostas das plantas de feijão-fava foram variáveis devido à inoculação com diferentes isolados e que a FBN realizada pelos rizóbios pode ter contribuído para aumentar o teor de nitrogênio no feijão-fava. Sir et al. (2012) observaram que o teor de nitrogênio em *Vicia faba* foi maior quando inoculadas com o rizóbio ENRRI 9, entretanto não houve diferença deste tratamento com as plantas sob fertilização nitrogenada. Estes resultados contrastam com o observado no presente estudo, especialmente quando o feijão-fava foi inoculado com os rizóbios ISOL-32 e ISOL-50. A inoculação do feijão comum (Souza et al., 2011) e do feijão-fava (Osman e Elaziz, 2010) com *R. tropici* resultou em teor de nitrogênio estatisticamente superior às plantas cultivadas com nitrogênio. Exceto aos 63 dias, as plantas de feijão-fava inoculadas com a estirpe CIAT 899 apresentaram maior teor de nitrogênio – igualmente ao observado por Osman e Elaziz (2010) e Souza et al. (2011).

4.10 Clorofila total

Observa-se na figura 10, alterações significativas nos valores de clorofila total das plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça e Branca quando inoculadas com os diferentes isolados de rizóbios nos três períodos de avaliação. No período de florescimento, os valores de clorofila total foram maiores nas plantas inoculadas com os isolados de rizóbio – exceto para as plantas inoculadas com o rizóbio ISOL-34 (Figura 10A). Observou-se que a inoculação das plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça com o rizóbio ISOL-32 resultou em maior valor de clorofila total no período de emissão de vagens e estas plantas apresentaram incrementos de 90% em relação à testemunha nitrogenada e de 146% quando comparadas à testemunha

absoluta. Já no enchimento de vagens, houve destaque para as plantas inoculadas com a estirpe CIAT 899.

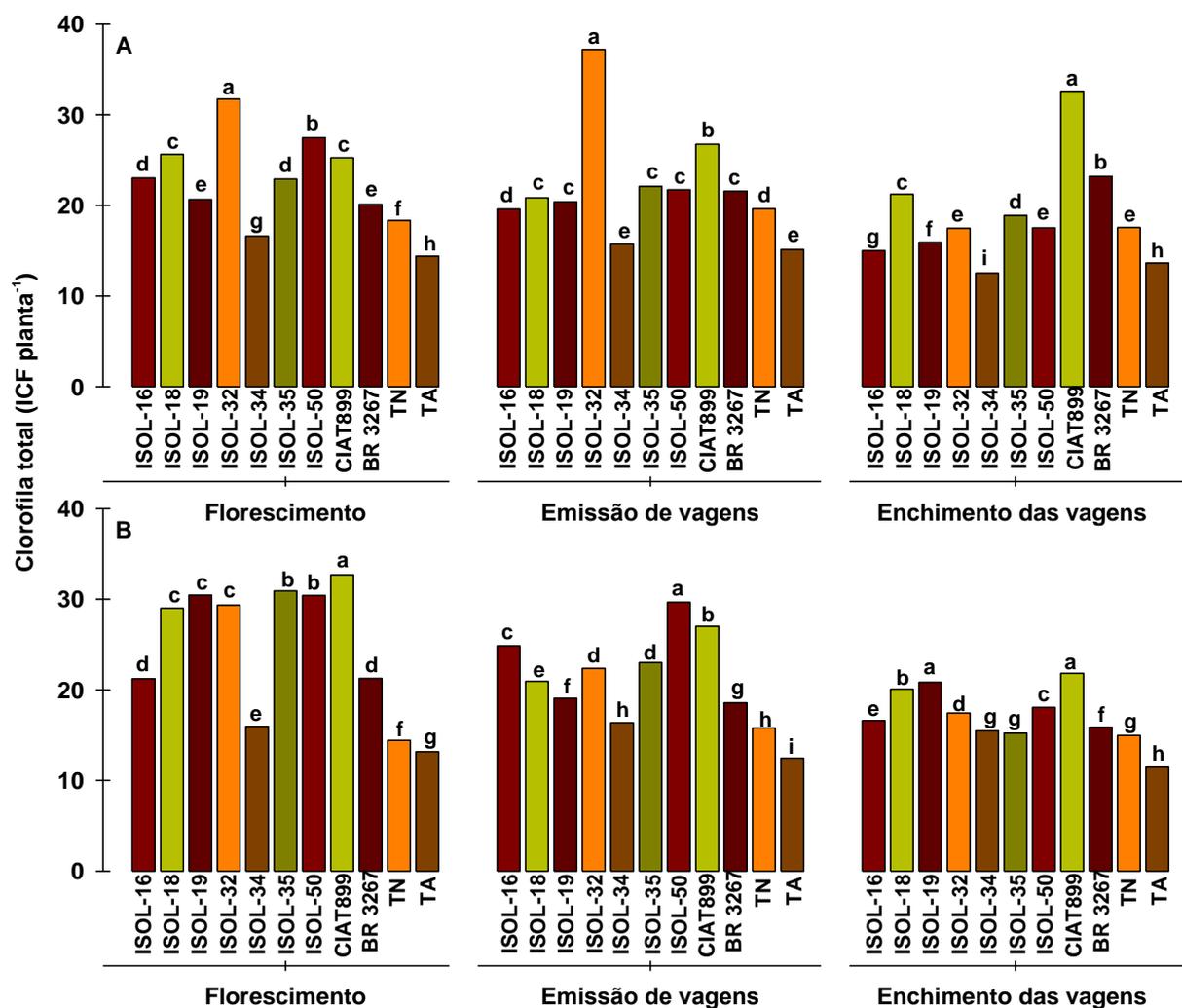


Figura 10. Clorofila total de feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculado com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). IFC = índice de clorofila Falker.

As plantas de feijão-fava var. crioula Branca inoculadas com os isolados de rizóbio ou com as estirpes BR 3267 e CIAT 899 foram superiores às testemunhas (nitrogenada e absoluta) no período de florescimento, com destaque para a estirpe CIAT 899 que apresentou aumento de 130% no valor de clorofila total em comparação à testemunha nitrogenada (Figura 10B). As plantas de feijão-fava var. crioula Branca inoculadas com o rizóbio ISOL-50 foram superiores aos demais tratamentos e apresentaram valor de clorofila total 88% superior à testemunha nitrogenada e 138%

acima da testemunha absoluta. As plantas de feijão-fava inoculadas com o rizóbio ISOL-19 e com a estirpe CIAT 899 se destacaram em relação aos demais tratamentos no enchimento de vagens e foram superiores à testemunha absoluta em 90%.

No geral, o nível de clorofila total foi duplicado nas folhas das duas variedades crioulas de feijão-fava quando estas plantas foram inoculadas com rizóbios. Plantas de ervilha inoculadas com estirpes de rizóbios nativos de solos da Ucrânia ocidental exibiram maior clorofila total que o tratamento controle (Stambulska e Lushchak, 2015), enquanto que o feijão comum cultivado sem pressão de ervas daninhas exibiu acréscimo de 34% no nível de clorofila em resposta à suplementação com nitrogênio (Saberli et al., 2015). É provável que o aumento na clorofila total esteja relacionado à maior disponibilidade de nitrogênio proporcionada pelos rizóbios utilizados. O aumento significativo do teor de clorofila em plantas de feijão-da-Espanha (*P. coccineus*) inoculadas com rizóbios é registrado já no início do ciclo de vida destas plantas (28 dias de experimento) (Stefan et al., 2013), similarmente ao registrado neste estudo. Provavelmente, neste período existe uma maior necessidade de clorofila para atuar na absorção da energia luminosa e, conseqüentemente, na fixação do carbono atmosférico e formação de massa seca vegetal.

4.11 Nodulação específica

Observou-se que o rizóbio ISOL-32 induziu maior nodulação específica nas plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça e, portanto, destacou-se entre os demais tratamentos no período de florescimento (349,5 g MSN g⁻¹ MSR) e de emissão de vagens (441,0 g MSN g⁻¹ MSR) (Figura 11A). Além disso, notou-se que o rizóbio ISOL-50 induziu elevada nodulação específica nas plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça, principalmente no período de enchimento de vagens quando foram

registrados 290,5 g MSN g⁻¹ MSR de nodulação específica para as plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculadas com este isolado de rizóbio.

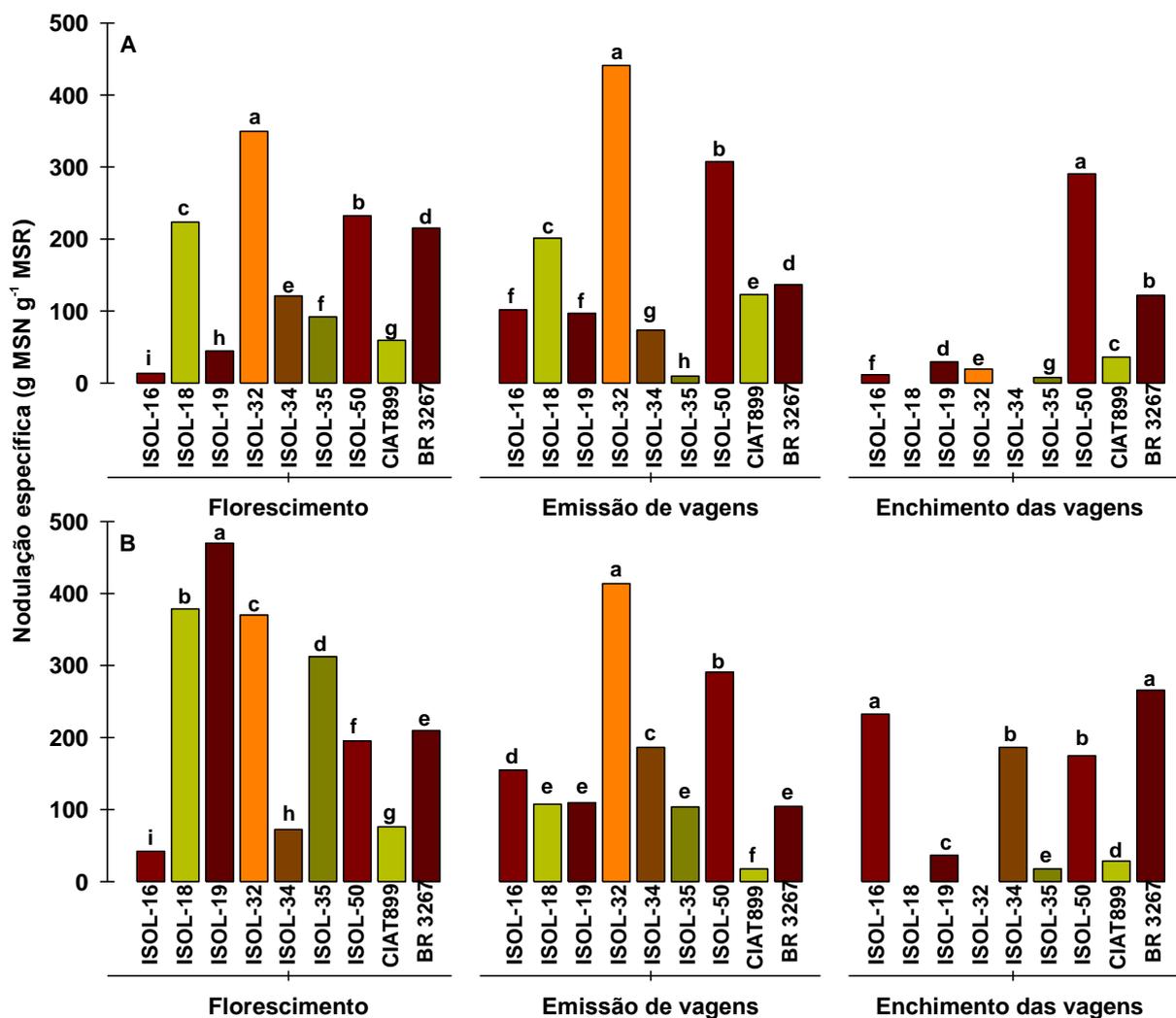


Figura 11. Nodulação específica do feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculado com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). MSN = massa seca de nódulos. MSR = massa seca de raízes.

As plantas de feijão-fava var. Branca inoculadas com os isolados de rizóbio ISOL-19, ISOL-32 e ISOL-16 exibiram maior nodulação específica no florescimento, emissão e enchimento de vagens, respectivamente (Figura 11B). Em feijão-caupi, as diferentes combinações de *Bradyrhizobium* com *Bacillus*, *Brevibacillus* e/ou *Paenibacillus* não induziram diferença na nodulação específica (Lima et al., 2011). Já a combinação entre a BR 3267 e bactérias promotoras de crescimento não resultou em alterações na nodulação específica em feijão-caupi (Rodrigues et al., 2012).

4.12 Eficiência de fixação do nitrogênio

Alterações significativas na eficiência de fixação do nitrogênio foram registradas nas plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça e Branca em resposta à inoculação com os diferentes rizóbios (Figura 12). Os isolados de rizóbio ISOL-18, ISOL-32 e ISOL-50 induziram valores de eficiência da fixação do nitrogênio nas plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça estatisticamente similares às aquelas inoculadas com *R. tropici* CIAT 899 no período de florescimento, entretanto foram cerca de 20% superiores às plantas inoculadas com a estirpe BR 3267 (Figura 12A). O feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com o rizóbio ISOL-18 ou com a estirpe CIAT 899 apresentaram maior eficiência de fixação do nitrogênio no período de emissão de vagens, enquanto que as inoculadas com o rizóbio ISOL-34 apresentaram os menores valores para esta variável.

Constatou-se que o feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com a estirpe CIAT 899 apresentou maior valor de eficiência da fixação do nitrogênio ($49 \text{ mg N g}^{-1} \text{ MSN}$) no período de enchimento de vagens (Figura 12A), e, portanto, se destacou em relação aos demais tratamentos neste período de avaliação. Além deste, a inoculação de plantas de feijão-fava var. crioula Boca de Moça com os isolados de rizóbio ISOL-50, ISOL-19, ISOL-32 e ISOL-16 resultou em elevados valores de eficiência da fixação do nitrogênio no período de enchimento de vagens e estes foram superiores ao registrado para as plantas inoculadas com a estirpe BR 3267 em 38%, 28%, 27% e 13%, respectivamente. O feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculado com o rizóbio ISOL-35 exibiu eficiência de fixação do nitrogênio estatisticamente similar ao registrado para a estirpe BR 3267 no enchimento de vagens.

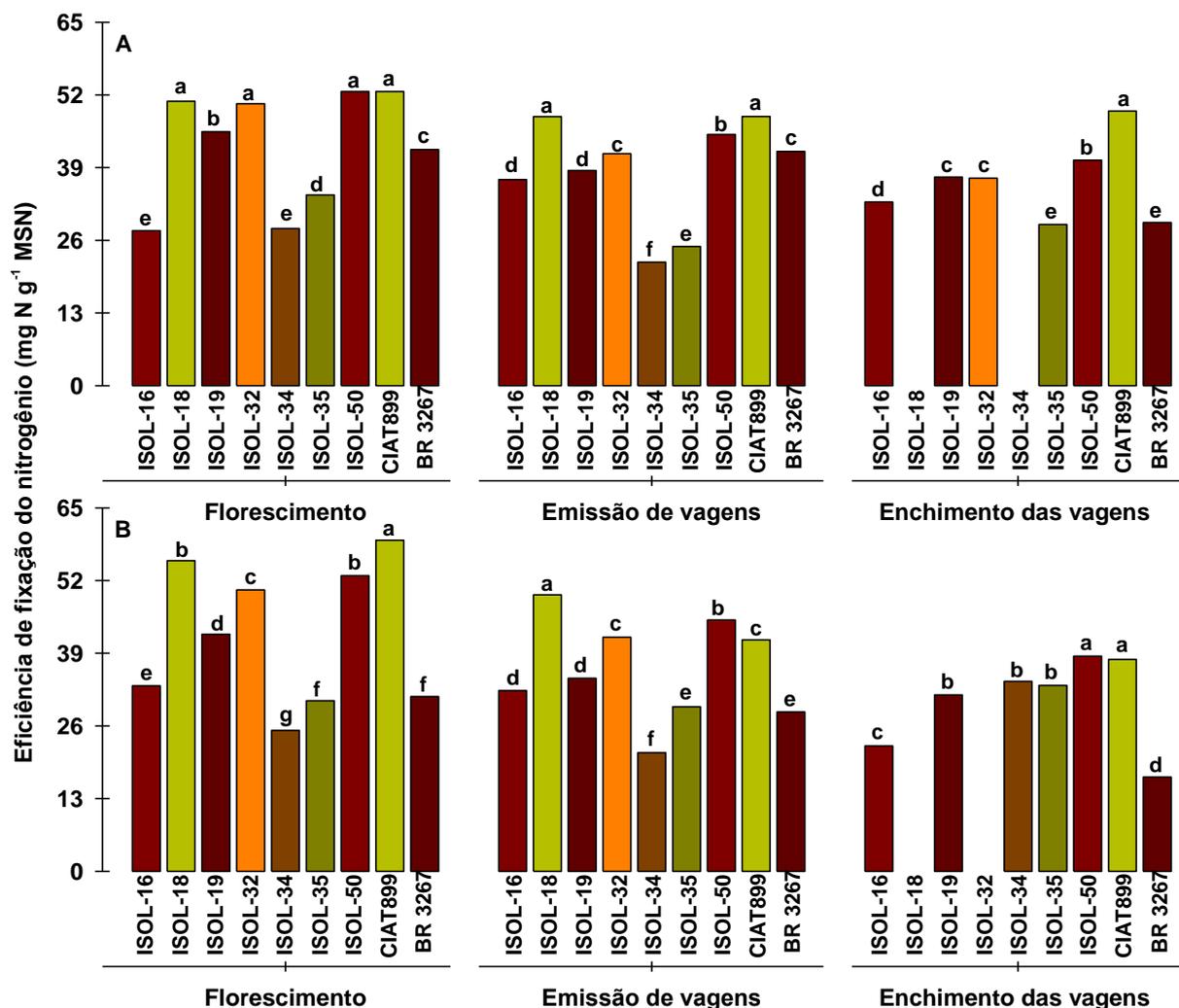


Figura 12. Eficiência de fixação de nitrogênio do feijão-fava var. crioula Boca de Moça (A) e Branca (B) inoculado com diferentes isolados de rizóbio. No período, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Considerando os três períodos de avaliação, notou-se que a eficiência de fixação do nitrogênio no feijão-fava var. crioula Branca inoculado com a estirpe CIAT 899 e também naquelas plantas inoculadas com os rizóbios ISOL-18 e ISOL-50 apresentaram melhores resultados (Figura 12B). Notou-se que a inoculação do feijão-fava var. crioula Branca com os isolados de rizóbio induziu maior eficiência de fixação do nitrogênio em relação às plantas inoculadas com a estirpe BR 3267 no período de emissão de vagens, exceto quando se utilizou o rizóbio ISOL-34. No enchimento de vagens, o feijão-fava var. crioula Branca inoculado com o rizóbio ISOL-50 apresentou maior eficiência de fixação do nitrogênio em relação aos demais tratamentos.

A inoculação de feijão comum com isolados provenientes de solos do Irã resultou em alto desempenho na fixação de nitrogênio (Rahmani et al., 2011) igualmente ao observado no presente trabalho. Segundo Lima et al. (2012), estirpes com menor nodulação podem apresentar nódulos muito eficientes com elevada capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico. Para o feijão-caupi cultivado na região de Teresina/PI e Bom Jesus/PI e na Pré-Amazônia maranhense não foi observado diferença significativa entre as plantas inoculadas com rizóbios e a testemunha nitrogenada (Almeida et al., 2010; Costa et al. 2011; Gualter et al., 2011). Plantas de feijão comum e de *Senna multijuga* inoculadas com *B. japonicum* apresentaram aumento no crescimento vegetativo e os autores ressaltam que esta resposta provavelmente foi decorrente de uma interação positiva da planta com o rizóbio e de uma maior fixação biológica de nitrogênio (Lírio et al., 2012).

5 CONCLUSÃO

Considerando os resultados apresentados, pode-se concluir que os isolados de rizóbio ISOL-18, ISOL-32 e ISOL-50 apresentaram interação simbiótica favorável com plantas de feijão-fava e, portanto, são isolados promissores a serem utilizados na formulação de inoculantes rizobianos para o cultivo destas plantas.

6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L. Produtividade do feijão-caupi cv. BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 3, p. 364-369, 2010.

ALCÂNTARA, M. C.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; ROCHA, M. M.; CARVALHO, J. M. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2014.

ANTUNES, J. E. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; ARAÚJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 751-757, 2011.

ARGAW, A.; AKUMA, A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* sp. inoculation improves the agronomic efficiency of N of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Environmental Systems Research**, n. 4, v. 11, p. 1-13, 2015.

ARANJUELO, I.; IGOR, C. A.; MOLERO, G. Nodule performance within a changing environmental context. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 1076-1090, 2014.

ARAÚJO, A. S. F.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; BESERRA JUNIOR, J. E. A.; ANTUNES, J. E. L.; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Diversity of native rhizobia-nodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Legume Research**, v. 38, n. 5, p. 653-657, 2015.

BELAY, Z.; ASSEFA, F. Symbiotic and phenotypic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from Northern Gondar, Ethiopia. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 21, p. 4372-4379, 2011.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas**: noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.

BOGINO, P. C.; NIEVAS, F. L.; GIORDANO, W. A review: Quorum sensing in Bradyrhizobium. **Applied Soil Ecology**, v. 94, p. 49-58, 2015.

BUCHI, L.; GEBHARD, C. A.; LIEBISCH, F.; SINAJ, S.; RAMSEIER, H.; CHARLES, R. Accumulation of biologically fixed nitrogen by legumes cultivated as cover crops in Switzerland. **Plant and Soil**, v. 393, p. 163-175, 2015.

BREMNER, J. M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A., ed. Methods of soil analysis chemical and microbiological properties. Madison, **American Society of Agronomy**, 1965. Part 2. p.1149-1178.

BRITO, M. M. P.; MURAOKA T.; SILVA, E. C. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão caupi. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p.206-215, 2011.

CARRANCA, C.; TORRES, M. O.; MADEIRA, M. Underestimated role of legume roots for soil N fertility. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, p. 1095-1102, 2015.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; MARTINS, L. V.; AMARAL, F. H. C.; MOREIRA, F. M. S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2011.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; FERREIRA, L. V. M; AMARAL, F. H. C.; NÓBREGA, J. C.A.; SILVA, A. F. T.; FIGUEIREDO, M. V. B. Growth and yield of the cowpea cultivar BRS Guariba inoculated with rhizobia strains in southwest Piauí. **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3073-3084, 2014.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTO, C. E. R. S. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. pp. 17-43.

FONSECA, G. G.; OLIVEIRA, D. P.; SOARES, B. L.; FERREIRA, P. A. A.; TEIXEIRA, C. M.; MARTINS, F. A. D.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B. Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 6, p. 1778-1787, 2013.

FRAZÃO, J. E M.; SANTOS, D.; OLIVEIRA, F. P.; PEREIRA, W. E.; MORAIS, J. F.; Morfologia e fenologia de dez variedades de fava nas fases vegetativa e de inflorescência. **Agropecuária Técnica**, v. 31, n. 1, p. 1-7, 2010.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. O.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. B.; ARAÚJO, E. R.; FRAGA, V. S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga

cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 9, p. 1856-1861, 2011.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 109-114, 2012.

GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.

GUEDES, G. N.; SOUZA, A. S.; LIMA, A. S.; ALVES, L. S. Eficiência agronômica de inoculantes em feijão-caupi no município de Pombal-PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 4, p. 82-89, 2010.

GULDEN, R. H.; VESSEY, J. K. Low concentrations of ammonium inhibit specific nodulation (nodule number g^{-1} root DW) in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). **Plant and Soil**, v. 198, p. 127-16, 1998.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. California: Agriculture Experimental Station Circular. 1950. 347p.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA. 1994.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Produção Agrícola Municipal**. 2013. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 15 out. 2015.

KHOUZANI, M. R. Z.; NEJAD, T. S. Evaluation the effect of bio fertilizer and nitrogen fertilizer on rate of biological nitrogen fixation (BNF) and nodulation of cowpea varieties in Ahwaz, Iran. **Advances in Environmental Biology**, v. 9, n. 4, p. 407-414, 2015.

LIMA, E. F. **Inoculação com *Bacillus* sp. visando a promoção do crescimento em plantas de feijão-fava**. Monografia (Graduação em Engenharia Agrônômica). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 37f, 2015.

LIMA, A. S. T.; BARRETO, M. C. S.; ARAÚJO, J. M.; SELDIN, L.; BURITY, H. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Sinergismo *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, p. 713-721, 2011.

LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S.; NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M.; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de mucuna-cinza e mucuna-anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 337-348, 2012.

LÍRIO, E. J.; ARNHOLZ, E.; HENCKER, C.; ROLDI, M. C.; SOARES, R.; SARNAGLIA JR, V. B.; BONADEU, F.; HEBLING, S. Efeito da inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* (Bradyrhizobiaceae) sobre o desenvolvimento de *Senna multijuga* e *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae). **Natureza Online**, v. 10, n. 4, p. 195-199, 2012.

LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; ARAUJO, A. S. F. **Phaseolus lunatus**: Diversity, Growth and Production. Hauppauge NY: Nova Science Publishers, 2015. 163 p.

MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 395-402, 2014.

MARTINS, R. N. L.; NÓBREGA, R. S. A.; SILVA, A. F. T.; NÓBREGA, J. C. A.; AMARAL, F. H. C.; COSTA, E. M.; LUSTOSA FILHO, J. F.; MARTINS, L. V. Nitrogênio e micronutrientes na produção de grãos de feijão-caupi inoculado. **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1577-1586, 2013.

MELO, S. R.; ZILLI, J. E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1177-1183, 2009.

MORAES, W. B.; MARTINS FILHO, S.; GARCIA, G. O.; CAETANO, S. P.; MORAES, W. B.; COSMI, F. C. Avaliação da fixação biológica do nitrogênio em genótipos de feijoeiros tolerantes a seca. **IDESIA**, v. 28, n.1, p. 61-68, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica do nitrogênio. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: EDUFLA, 2006. pp. 501-529.

MOREIRA, V.; JUSTINO, G. C.; CAMARGOS, L. S.; AGUIAR, L. F. Características adaptativas da associação simbiótica e da fixação biológica do nitrogênio molecular

em plantas jovens de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl., uma leguminosa arbórea nativa do Cerrado. **Rodriguésia**, v. 65, n. 2, p. 517-525, 2014.

MULAS, D.; SECO, V.; CASQUERO, P. A.; VELAZQUEZ, E.; ANDRÉS, F. G. Inoculation with indigenous *rhizobium* strains increases yields of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in northern Spain, although its efficiency is affected by the tillage system. **Symbiosis**, v. 67, n. 1, p. 1-12, 2015.

OLIVEIRA, F. N.; TORRES, S. B.; BEBEDITO, C. P. Caracterização botânica e agrônômica de acessos de feijão-fava em Mossoró, RN. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 1, p. 143-148, 2011.

OLIVEIRA, A. E. S.; SIMEÃO, M.; MOUSINHO, F. E. P.; GOMES, R. L. F. desenvolvimento do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) sob déficit hídrico cultivado em ambiente protegido. **HOLOS**, n. 30, v. 1, p. 1-9, 2014a.

OLIVEIRA, T. C.; SILVA, J.; SANTOS, M. M.; CANCELLIER, E. L.; FIDELIS, R. R. Desempenho agrônômico de cultivares de feijão em função da adubação fosfatada no sul do estado do Tocantins. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 1, p. 50-59, 2014b.

OSMAN, A. G.; ELAZIZ, F. I. A. Effects of biological and mineral fertilization on nodulation, nitrogen and phosphorus content and yield of faba bean (*Vicia faba* L.) cultivar Seleim. **Advances in Environmental Biology**, v. 4, n. 1, p. 86-94, 2010.

RAHMANI, H. A.; RÄSÄNEN, L. A.; AFSHARIA, M.; LINDSTRÖM, K. Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in soils of Iran. **Applied Soil Ecology**, v. 48, p. 287-293, 2011.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 196-202, 2012.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; COSTA, A. F.; OLIVEIRA, J. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Interrelationship of *Bradyrhizobium* sp. and plant growth-promoting bacteria in cowpea: survival and symbiotic performance. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 49-55, 2013.

- RUFINI, M.; SILVA, M. A. P.; FERREIRA, P. A. A.; CASSETARI, A. A.; SOARES, B. L.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a *Rhodic eutrudox*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, p. 115-122, 2014.
- RUGHEIM, A. M. E.; ABDELGANI, M. E. Effects of *Rhizobium* and *Bacillus Megatherium* var. *phosphaticum* strains and chemical fertilizers on symbiotic properties and yield of Faba Bean (*Vicia faba* L.). **Advances in Environmental Biology**, v. 3, n. 3, p. 337-346, 2009.
- SABERALI, S. F.; MODARRES-SANAVY, S. A. M.; BANNAYAN, M.; AGHAALIKHANI, M.; HAGHAYEGH, G.; HOOGENBOOM, G. Common bean canopy characteristics and N assimilation as affected by weed pressure and nitrogen rate. **Journal of Agricultural Science**, p. 1-14, 2015.
- SABOYA, R. C. C.; BORGES, P. R. S.; SABOYA, L. M. F.; MONTEIRO, F. P. R.; SOUZA, S. E. A.; SANTOS, A. F.; SANTOS, E. R. Resposta do feijão-caupi a estirpes fixadoras de nitrogênio em Gurupi-TO. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 1, p. 40-48, 2013.
- SANTOS, J. O.; ARAUJO, A. S.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C.; FIGUEIREDO, M. V. B. Ontogenia da nodulação em feijão-fava (*Phaseolus lunatus*). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 4, p. 426-429, 2009.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV. Pp. 33-46, 1981.
- SILVA, E. F. L.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; NUNES, L. A. P. L.; CANEIRO, R. F. V. Fixação biológica do N₂ em feijão-caupi sob diferentes doses e fontes de fósforo solúvel. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, p. 394-402, 2010.
- SILVA, M. F.; SANTOS, C. E. R. S.; SOUSA, C. A.; ARAÚJO, R. S. L.; STAMFORD, N. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Nodulação e eficiência da fixação do N₂ em feijão-caupi por efeito da taxa do inoculo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 5, p. 1418-1425, 2012.
- SILVA, J. A.; OLIVEIRA, M. G.; SOUZA, L. T.; ASSUNCAO, I. P.; LIMA, G. A.; MICHEREFF, S. J. Reação de genótipos de feijão-fava a *Sclerotium rolfsii*. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 98-101, 2014.

SILVA, V. B.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; DIAS, C. D. S.; SILVA, R. N. O. Crescimento inicial de *Phaseolus lunatus* L. submetido a diferentes substratos orgânicos e aplicação foliar de urina de vaca. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 1, p. 131-135, 2015.

SILVA JÚNIOR, E. B.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; BODDEY, R. M.; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de nova formulação de inoculante rizobiano para feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 138-141, 2012.

SILVEIRA, J. A. G.; CONTADO, J. L.; MAZZA, J. L. M. e OLIVEIRA, J. T. A. Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 9-23, 1998.

SIR, S.; MOHAMED, E.; BABIKER, H. M. Effects of *rhizobium* inoculation and urea fertilization on faba bean (*Vicia faba* L.) Production in a Semi-Desert Zone. **Advances in Environmental Biology**, v. 6, n. 2, p. 824-830, 2012.

SOUSA, W. C.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; BRITO, D. R. S.; MOREIRA, F. M. S. Fontes de nitrogênio e caule decomposto de *Mauritia flexuosa* na nodulação e crescimento de *Enterolobium contortsiliquum*. **Revista Árvore**, v. 37, n. 5, p. 969-979, 2013.

SOUZA, E. F. C.; SORATTO, R. P.; PAGANI, F. A. Aplicação de nitrogênio e inoculação com rizóbio em feijoeiro cultivado após milho consorciado com braquiária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 370-377, 2011.

SULAS, L.; RE, G. A.; SALIS, M.; GARAU, G.; SITZIA, M.; SALES, M. The effect of inoculation on growth, nodulation and nitrogen in annual clover cultivars grown at two Mediterranean locations of Sardinia, Italy. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 43, n. 1, p. 165-172, 2015.

STAMBULSKA, U. Y.; LUSHCHAK, V. I. Efficacy of symbiosis formation by pea plants with local western Ukrainian strains of *Rhizobium*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 5, n. 2, p. 92-98, 2015.

STEFAN, M.; MUNTEANU, N.; STOLERU, V.; MIHASAN, M.; HRITCU, L. Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and

yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 22–29, 2013.

UYANÖZ, R.; KARACA, U. Effects of different salt concentrations and *Rhizobium* inoculation (native and *Rhizobium tropici* CIAT 899) on growth of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 387-391, 2011.

VIEIRA, C. L.; FREITAS, A. D.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V.; ARAÚJO, M. S. Inoculação de variedades locais de feijão-macassar com estirpes selecionadas de rizóbio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 11, p. 1170-1175, 2010.

VOISIN, A. S.; PRUDENT, M.; DUC, G.; SALON, C. Pea nodule gradients explain N nutrition and limited symbiotic fixation in hypernodulating mutants. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, p. 1529-1540, 2015.

APÊNDICES



ISOL-16



ISOL-18



ISOL-19



ISOL-32



ISOL-34



ISOL-35



ISOL-50



CIAT 899



BR 3267



Testemunha nitrogenada



Testemunha absoluta

Apêndice 1. Raízes e nódulos de feijão-fava var. crioula Boca de Moça inoculadas com isolados de rizóbio provenientes de áreas produtoras de feijão-fava do Piauí. As estirpes BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. e CIAT 899 de *Rhizobium tropici* foram utilizadas como padrões.



ISOL-16



ISOL-18



ISOL-19



ISOL-32



ISOL-34



ISOL-35



ISOL-50



CIAT 899



BR 3267



Testemunha nitrogenada



Testemunha absoluta

Apêndice 2. Raízes e nódulos de feijão-fava var. crioula Branca inoculadas com isolados de rizóbio provenientes de áreas produtoras de feijão-fava do Piauí. As estirpes BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. e CIAT 899 de *Rhizobium tropici* foram utilizadas como padrões.