

ALTANYS SILVA CALHEIROS

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE ISOLADOS RIZOBIANOS PARA
CALOPOGÔNIO (*Calopogonium mucunoides*) ORIGINADOS DE UM
ARGISSOLO SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo,
para obtenção do título de Doutor.

RECIFE
PERNAMBUCO - BRASIL
2012

ALTANYS SILVA CALHEIROS

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE ISOLADOS RIZOBIANOS PARA
CALOPOGÔNIO (*Calopogonium mucunoides*) ORIGINADOS DE UM
ARGISSOLO SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo,
para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Mario de Andrade Lira Junior, PhD.

Co-Orientadoras

Dr^a. Márcia do Vale Barreto Figueiredo.

Dr^a. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra.

RECIFE
PERNAMBUCO - BRASIL
2012

Ficha Catalográfica

C152d Calheiros, Altanys Silva
Diversidade e eficiência de isolados rizobianos para calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) originados de um argissolo sob diferentes coberturas vegetais / Altanys Silva Calheiros. -- Recife, 2012.
116 f. : il.

Orientador (a): Mario de Andrade Lira Junior.
Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2012.
Referência.

1. Microbiologia do Solo 2. Diversidade rizobiana 3. Fixação biológica do nitrogênio 4. *Calopogonium mucunoides* desv. 5. Recuperação de pastagens degradada I. Lira Junior, Mario de Andrade, Orientador II. Título

CDD 631.4

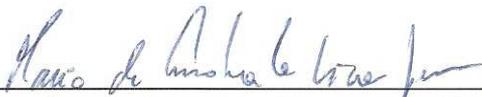
ALTANYS SILVA CALHEIROS

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE ISOLADOS RIZOBIANOS PARA
CALOPOGÔNIO (*Calopogonium Mucunoides*) ORIGINADOS DE UM
ARGISSOLO SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo,
para obtenção do título de Doutor.

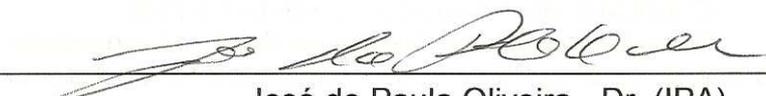
Tese aprovada em 27 de julho de 2012.

Orientador:



Mario de Andrade Lira Junior - Ph.D (DEPA/UFRPE)

Banca examinadora:



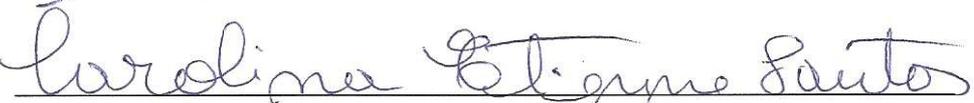
José de Paula Oliveira - Dr. (IPA)



Gláucia Alves e Silva - Dra. (PNPD/UFRPE)



Newton Pereira Stamford - Dr. (DEPA/UFRPE)



Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos - Dra. (DEPA/UFRPE)

RECIFE
PERNAMBUCO - BRASIL

2012

Primeiramente a Deus, que me concebeu o dom da vida;

Aos meus pais: Antônia Célia da Silva e
Jeová Calheiros da Silveira (*In Memoriam*);

Ao meu irmão Altay Silva Calheiros;

A minha amada esposa Emanuely Batista da Silva Calheiros;

Aos meus familiares e a todos que me apoiaram.

DEDICO

A todos os meus familiares, em especial à minha mãe. À minha esposa, e a todos os amigos e docentes, que ajudaram nesta árdua caminhada.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre comigo, guiando e iluminando o meu caminho;

A minha mãe, Antônia Célia da Silva, por todo o apoio, incentivo e conselhos que me guiaram e ajudaram a construir o meu caráter;

Ao meu irmão, Altay Silva Calheiros, por tudo que ele representa para mim;

A minha amada esposa, Emanuely Batista da Silva Calheiros, que por várias vezes me ajudou, não apenas me incentivando a seguir em frente nos momentos difíceis, mas também, presencialmente, lavando placas e vidrarias nos fins de semana enquanto eu isolava e caracterizava as bactérias, bem como, nas montagens e coletas dos experimentos conduzidos em casa de vegetação;

Ao amigo e orientador Prof. PhD. Mario de Andrade Lira Junior por todo apoio, incentivo e ensinamentos durante meu doutoramento e, pelo compartilhamento de suas ideias e experiências durante a orientação do trabalho que originou esse momento de felicidade que é a conclusão de mais uma etapa na minha vida pessoal e profissional. Meu Muito Obrigado;

As minhas Co-Orientadoras Dr^a. Márcia do Vale Barreto Figueiredo e Dr^a. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra;

Ao amigo, professor e orientador durante a graduação e mestrado no CECA/UFAL, Mauro Wagner de Oliveira, por ter me iniciado no meio científico e por sempre acreditar e me incentivar a seguir em frente. Meu Muito Obrigado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela minha formação profissional, bem como a Universidade Federal Rural de Pernambuco;

Ao coordenador da pós-graduação Prof. Dr. Valdomiro Severino de Souza Junior;

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências do Solo, representados por Clístenes Williams Araujo do Nascimento, Maria Betânia Galvão dos Santos Freire, Fernando José Freire, Mateus Rosas Ribeiro, Newton Pereira Stanford, Izabel Cristina de Luna Galindo, Mateus Rosas Ribeiro Filho, Marcelo Metri Correa pelos ensinamentos transmitidos durante o meu doutoramento;

A Maria do Socorro Santana e ao Josué Camilo, pelo bom tratamento na secretaria do programa;

Ao José Fernando Wanderley Fernandes Lima (Zeca), pela disposição em ajudar sempre que preciso no uso das instalações para condução dos experimentos;

Aos estimados colegas bolsistas e estagiários, que muito me ajudaram na construção desse trabalho, Alexandra Vieira de Oliveira, Débora Magalhães Soares e Flávio Henrique de Oliveira Cabral Acioli;

Aos colegas de Pós-Graduação, representados por Alexandra de Andrade Santos, Artenisa Cerqueira Rodrigues, Fernando Luiz Nunes de Oliveira, Jean Cheyson Barros dos Santos, João Paulo Siqueira da Silva, José Thales Pantaleão Ferreira, Karen Cristina Fialho dos Santos, Karla Silva Santos, Luciana Remigio Santos Nascimento, Luiz Guilherme Medeiros Pessoa, Márcio Félix Sobral, Márcio Fléquisson Alves Miranda, Maria da Conceição de Almeida, Marise Conceição Marques, Raiana Lira Cabral, Rômulo Vinícius C. C. de Souza, Sebastião Junior, Vinícius Gedeão Bezerra de Carvalho, Wagner Luís da Silva Souza, Welka Preston Leite Batista da Costa;

Aos amigos e irmãos de orientação do Laboratório de Diversidade Microbiana, representados por Aline Medeiros de Arruda, Alisson Esdras Coutinho, André Barbosa da Silva, Carlos Roberto da Costa Junior, Clayton Albuquerque de Sousa, Cybelle Souza de Oliveira, Erika Socorro Alves Graciano, Francisco Rodolfo Junior, Gláucia Alves e Silva, Ítalo Augusto Ferrer Melo Santos, Lenivânia Maria da Silva, Lisânia Danielle de Albuquerque Silva, Paulo Geovani Silva Martins, Rayssa Pereira Vicentin, Thiago Prates Fernandes, Vanessa Dina Cavalcante Barros;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo de doutorado, bem como, pelo financiamento do projeto de pesquisa;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo financiamento do projeto;

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pela contribuição para a realização deste trabalho;

A todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram para o meu sucesso. Meu muito obrigado.

BIOGRAFIA

ALTANYS SILVA CALHEIROS, filho de Antônia Célia da Silva e Jeová Calheiros da Silveira (*In memoriam*), nasceu na cidade de Maceió, Estado de Alagoas, em 11 de abril de 1984.

Cursou o ensino médio na Escola Agrotécnica Federal de Satuba - Alagoas, onde despertou significativamente seu interesse pelas ciências agrárias.

Ingressou na Universidade Federal de Alagoas, no curso de Agronomia, no ano de 2002, na qual recebeu o grau de Engenheiro Agrônomo no ano de 2007.

Em março de 2007 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal na Universidade Federal de Alagoas e recebeu o grau de Mestre em agosto de 2008.

Em agosto de 2008 ingressou no curso de Doutorado em Agronomia – Ciências do Solo na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Distribuição dos isolados de rizóbio obtidos de nódulos de calopogônio inoculado com solo de pastagens de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e áreas de Mata Atlântica baseada nas características morfológicas tempo de crescimento em dias (T.C.), diâmetro das colônias (D), cor, forma, elevação, borda, transparência (Transp.), superfície (Sup.), produção (P.M.), consistência (C.M.) e elasticidade do muco (E.M.) e produção de ácido ou álcalis (pH).....44

Figura 2. Diagrama tridimensional da análise de componentes principais das características físico-químicas do solo e de isolados rizobianos para as coberturas vegetais das áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE na profundidade de 0-0,2 m.....50

CAPÍTULO II

Figura 1. Acúmulo de MSPA das plantas e MSPA esperada (eixo da esquerda), doses de N e doses de N estimada pela equação (eixo da direita) (Figura A) e Concentração e acúmulo de N na parte aérea das plantas de calopogônio em função das doses de N aplicadas (Figura B).....69

CAPÍTULO III

Figura 1. Acúmulo de matéria seca na parte aérea das plantas de calopogônio em função das doses de N aplicadas ao solo.....92

Figura 2. Concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na parte aérea das plantas de calopogônio no primeiro (A), segundo (B) e terceiro (C) cortes em função das doses de N aplicadas ao solo no início do estudo.....102

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Subclasses, famílias e gêneros de bactérias que nodulam leguminosas..... | 25 |
|--|----|

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Médias e intervalo de confiança (95%) das características físicas e químicas do solo das áreas de <i>Brachiaria decumbens</i> , bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE utilizado para obtenção de nódulos na profundidade de 0-0,2 m..... | 40 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Tabela 2. Médias e intervalo de confiança (95%) da matéria seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), matéria seca (MSN) e número (NN) de nódulos e número de isolados por nódulo (I/N) do experimento para obtenção de nódulos provenientes das áreas de <i>Brachiaria decumbens</i> , bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE na profundidade de 0-0,2 m..... | 43 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Tabela 3. Médias e intervalo de confiança (95%) do número de isolados e de grupos e isolados por grupo e quantidade máxima de isolados em um único grupo, índices de diversidade de Shannon-Weaver (H'), equitabilidade de Pielou (J) e dominância de Simpson (I_s) dos isolados provenientes de áreas de <i>Brachiaria decumbens</i> , bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE na profundidade de 0-0,2 m..... | 47 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Tabela 4. Autovalores, variâncias e coeficientes de ponderação obtidos pela análise de componentes principais (CP) das áreas de <i>Brachiaria decumbens</i> , bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE na profundidade de 0-0,2 m..... | 49 |
|---|----|

| | |
|--|--|
| Tabela 5. Matriz de correlação linear das características físicas e químicas do solo, da matéria seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), matéria seca (MSN) e número (NN) de nódulos, número de isolados (NI), número de grupos (NG), isolados por grupo (I/G), máximo de isolados em um único grupo (M. I/G) e índices de diversidade de Shannon-Weaver (H'), | |
|--|--|

equitabilidade de Pielou (J) e dominância de Simpson (I_s) dos isolados provenientes de áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE na profundidade de 0-0,2 m.....51

CAPÍTULO II

Tabela 1. Médias e intervalo de confiança (95%) das características físicas e químicas do solo das áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE utilizado para obtenção de nódulos na profundidade de 0-0,2 m.....65

Tabela 2. Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de nitrogênio na parte aérea, eficiência relativa (ER) e dose de nitrogênio (Dose N) necessária para atingir a produção de MSPA de diferentes isolados rizobianos de calopogônio de áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica.....70

Tabela 3. Teste de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para proporção de isolados eficientes de áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica.....72

Tabela 4. Coeficientes de correlação da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de nitrogênio na parte aérea, eficiência relativa (ER) e dose de nitrogênio (Dose N) necessária para atingir a produção de MSPA de diferentes isolados rizobianos de calopogônio de áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica.....75

CAPÍTULO III

Tabela 1. Médias e intervalo de confiança (95%) das características físicas e químicas do solo das áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé utilizado para obtenção de nódulos na profundidade de 0-0,2 m e do solo utilizado no experimento.....89

| | |
|--|-----|
| Tabela 2. Valores médios de matéria seca da parte aérea (g planta^{-1}) de diferentes isolados rizobianos de calopogônio nos primeiro, segundo e terceiro cortes..... | 93 |
| Tabela 3. Valores médios de matéria seca da parte aérea (MSPA), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na MSPA, eficiência relativa (ER) e dose de N estimada pela análise de regressão (Dose N) de diferentes isolados rizobianos de calopogônio no primeiro corte..... | 94 |
| Tabela 4. Valores médios de matéria seca da parte aérea (MSPA), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na MSPA, eficiência relativa (ER) e dose de N estimada pela análise de regressão (Dose N) de diferentes isolados rizobianos de calopogônio no segundo corte..... | 96 |
| Tabela 5. Valores médios de matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na MSPA, eficiência relativa (ER) e dose de N estimada pela análise de regressão (Dose N) de diferentes isolados rizobianos de calopogônio no terceiro corte..... | 99 |
| Tabela 6. Coeficientes de correlação da MSPA, concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na parte aérea, eficiência relativa (ER) e dose de N (Dose N) necessária para atingir a produção de MSPA para o primeiro, segundo e terceiro cortes, e MSSR e MSN para o terceiro corte, de diferentes isolados rizobianos de calopogônio de áreas de <i>Brachiaria decumbens</i> , bosques de sabiá e Mata Atlântica..... | 103 |

LISTA DE APÊNDICES

| | |
|--|-----|
| Apêndice 1. Dendrograma das características morfológicas dos isolados de rizóbio de pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> , através do método UPGA (unweighted pair group average) usando o índice de distância euclidiana como coeficiente de similaridade..... | 112 |
| Apêndice 2. Dendrograma das características morfológicas dos isolados de rizóbio de bosque de sabiá, através do método UPGA (unweighted pair group average) usando o índice de distância euclidiana como coeficiente de similaridade..... | 113 |
| Apêndice 3. Dendrograma das características morfológicas dos isolados de rizóbio de solo de Mata Atlântica, através do método UPGA (unweighted pair group average) usando o índice de distância euclidiana como coeficiente de similaridade..... | 114 |
| Apêndice 4. Temperatura (°C) e Umidade relativa do ar (%) máxima, mínima e média semanal durante o período de condução do experimento de eficiência simbiótica em areia:vermiculita em ambiente protegido..... | 115 |
| Apêndice 5. Temperatura (°C) e Umidade relativa do ar (%) máxima, mínima e média semanal durante o período de condução do experimento de eficiência simbiótica em solo em ambiente protegido, no primeiro corte..... | 115 |
| Apêndice 6. Temperatura (°C) e Umidade relativa do ar (%) máxima, mínima e média semanal durante o período de condução do experimento de eficiência simbiótica em solo em ambiente protegido, no segundo corte..... | 116 |

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| LISTA DE TABELAS..... | x |
| LISTA DE APÊNDICES..... | xiii |
| RESUMO GERAL..... | xvi |
| GENERAL ABSTRACT..... | xiii |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 20 |
| SITUAÇÃO DAS PASTAGENS BRASILEIRAS..... | 21 |
| FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO..... | 23 |
| REFERÊNCIAS..... | 26 |
| CAPÍTULO I..... | 36 |
| DIVERSIDADE DE ISOLADOS RIZOBIANOS DE CALOPOGÔNIO DE DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS EM UM ÚNICO SOLO DA ZONA DA MATA SECA DE PERNAMBUCO..... | 36 |
| RESUMO..... | 37 |
| INTRODUÇÃO..... | 37 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 39 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 43 |
| CONCLUSÕES..... | 52 |
| REFERÊNCIAS..... | 53 |
| CAPÍTULO II..... | 60 |
| EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS RIZOBIANOS DE CALOPOGÔNIO DE DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS EM UM SOLO DA ZONA DA MATA SECA DE PERNAMBUCO..... | 60 |
| RESUMO..... | 61 |

| | |
|---|-----|
| INTRODUÇÃO..... | 61 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 64 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 68 |
| CONCLUSÕES..... | 76 |
| REFERÊNCIAS..... | 76 |
| CAPÍTULO III..... | 84 |
| EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS DE CALOPOGÔNIO DE TRÊS COBERTURAS VEGETAIS EM UM ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO DA ZONA DA MATA SECA DE PERNAMBUCO..... | 84 |
| RESUMO..... | 85 |
| INTRODUÇÃO..... | 85 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 87 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 91 |
| CONCLUSÕES..... | 104 |
| REFERÊNCIAS..... | 105 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 111 |
| APÊNDICE..... | 112 |

CALHEIROS, Altanys Silva, Doutor em Agronomia – Ciências do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Julho de 2012. **DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE ISOLADOS RIZOBIANOS PARA CALOPOGÔNIO (*Calopogonium mucunoides*) ORIGINADOS DE UM ARGISSOLO SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS.** Orientador: Mario de Andrade Lira Junior. Co-orientadoras: Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra e Márcia do Vale Barreto Figueiredo.

RESUMO GERAL

A fixação biológica do nitrogênio é um dos mais importantes mecanismos de disponibilização de nitrogênio para as plantas e sabe-se que as leguminosas se associam com 98 espécies de 18 gêneros diferentes e estudos de diversidade de rizóbios nativos do solo são primordiais para a seleção de novas estirpes mais eficientes na fixação biológica do nitrogênio. Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes coberturas vegetais em um mesmo solo na diversidade e eficiência simbiótica de isolados rizobianos de calopogônio. As amostras de solo foram coletadas na camada de 0 - 0,2 m de profundidade em áreas de pastagens de capim *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*), e em áreas de Mata Atlântica, com três áreas diferentes sob cada cobertura. Plântulas de calopogônio foram pré-germinadas em placas de Petri com papel toalha por três dias e transplantadas para copos descartáveis de prolipropilento de 300 mL, sendo inoculadas com 10,0 g de solo e colhidas aos 50 dias. Foram amostrados quatro a cinco nódulos por planta, usados para isolamento em meio YMA e, posteriormente, realizou-se a caracterização morfológica. A autenticação dos isolados foi realizada em blocos casualizados com duas repetições, com apenas um isolado aleatoriamente escolhido de cada grupo em experimento contendo 0,5 kg da mistura areia:vermiculita autoclavada (1:1), recebendo diariamente solução nutritiva de Hoagland sem N e inoculadas com um mL por planta de caldo bacteriano com população estimada de 10^8 células rizobianas mL⁻¹. Aos 45 dias após a inoculação, as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea, raízes e nódulos, que foram secos em estufa até massa constante e em seguida foram pesados. O teste de eficiência simbiótica foi montado em blocos casualizados, com quatro repetições, em sacos de polietileno contendo 1,5 kg da mistura areia:vermiculita autoclavada (1:1). Os tratamentos foram compostos por 122 isolados selecionados em fase anterior, utilizando-se como critério a biomassa seca da parte aérea, cinco tratamentos controles (0; 50; 100; 150 e 200 kg ha⁻¹ de N), além de um tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 6152. O experimento foi conduzido da mesma forma que o da fase anterior. A matéria seca da parte aérea das plantas, após secagem, foi moída, sendo quantificados os teores de nitrogênio. Foram obtidos 1.575 isolados, dos quais 544 de solo com pastagem de *Brachiaria decumbens*, 666 de bosques de sabiá

e 365 isolados de Mata Atlântica. Dos isolados obtidos, 98,5% apresentaram crescimento rápido em meio de cultura apesar da estirpe atualmente recomendada para a cultura ser *Bradyrhizobium japonicum*, considerada de crescimento lento. Após agrupamento foram formados 163, 257 e 77 grupos para os isolados de áreas de pastagem, bosque de sabiá e Mata Atlântica, respectivamente, o que demonstra uma elevada diversidade entre os isolados. As coberturas vegetais influenciaram a diversidade rizobiana obtida no presente estudo. Houve diferença significativa entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas. A produção média das plantas inoculadas com os isolados com melhor desempenho não diferiu estatisticamente do tratamento adubado com a dose equivalente a 150 kg ha⁻¹ de N na forma de nitrato de amônio. A matéria seca da parte aérea das plantas se correlacionou positivamente com todas as variáveis analisadas, exceto com a matéria seca do sistema radicular. A maior proporção de isolados eficientes foi obtida com os isolados provenientes de bosques de sabiá, mostrando que a diferença na eficiência simbiótica desses isolados pode ser explicada pela cobertura vegetal. Houve grande variação nos valores de matéria seca de nódulos, bem como na concentração e acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas, evidenciando uma grande diferença na capacidade simbiótica entre os isolados. Verificou-se aumento no acúmulo de matéria seca da parte aérea para a maioria dos tratamentos no segundo corte. No entanto esse comportamento foi menos expressivo no terceiro corte.

GENERAL ABSTRACT

Biological nitrogen fixation by the legume-rhizobia symbiosis is one of the most important mechanisms of nitrogen supply to plants, and depends on the symbiotic efficiency of the rhizobial strain. We now know that legumes associate with 98 species from 18 different genera of rhizobia and native rhizobia biodiversity is fundamental for the selection of new, more efficient strains for biological nitrogen fixation. To this end, the present work aims to evaluate the effect of different vegetation covers in a single soil on diversity and symbiotic efficiency of calopo rhizobial isolates. Soil samples were collected at the 0-0,2 m deep layer, in areas with *Brachiaria decumbens* pastures, “sabiá” (*Mimosa caesalpiniiifolia*) woodlots and Atlantic forest, with three separate areas for each cover, all in the same soil. Calopo plantlets were pre-germinated in Petri dishes with paper towel for three days, transplanted to Leonard jars, inoculated with 10 g of soil and harvested after 50 days. Four to five nodules were sampled per plant, used to rhizobial isolation in YMA media and later morphologically characterized. 1575 isolates were obtained, which were distributed in 398 groups. Authentication was conducted for a single isolate from each group, in randomized blocks with two replicates, in bags with 0.5 kg of sand:vermiculite (1:1) autoclaved mixture, and received Hoagland solution without N daily. Inoculation was done with 1 mL per plant of a bacterial broth with population estimated in 10^8 cells.mL⁻¹. Plants were harvested 45 days after inoculation and separated in shoot, root and nodules, dried in oven until constant mass and weighted. The symbiotic efficiency test was conducted in randomized blocks, with four replicates, in polyethylene bags with 1.5 kg of the sand:vermiculite 1:1 autoclaved mixture. Treatments were 122 isolates selected after authentication, based on shoot dry mass, five uninoculated controls with 0, 50, 100, 150 and 200 kg.ha⁻¹ of N, and a control inoculated with SEMIA 6152, recommended for the culture. The experiment was conducted as the earlier phase. Shoot dry matter was ground and nitrogen content was measured. 25 isolates were considered efficient and selected for the next phase. An experiment was conducted in randomized blocks, with four replicates, in polyethylene bags with 2.5 kg of soil. Treatments were the 25 selected isolates, five uninoculated treatments with 0, 30, 60, 90 and 120 kg.ha⁻¹ of N, and a treatment inoculated with the SEMIA 6152 strain. Inoculations was done as per the authentication phase. The first cut was 45 days after inoculation, with the remaining cuts 45 days after the previous one. Shoot dry matter was ground and N contents were determined for the first cut. Data was submitted to analysis of variance, and the Scott-Knott means comparison test, and variables were correlated. Over 98% of the isolates have fast growth in culture media, although the recommended strain is *B radyrhizobium japonicum*, considered to have slow growth. After grouping, 163, 257 and 77 groups were found for the pasture, sabiá woodlots and Atlantic Forest areas, respectively, showing high diversity amongst the isolates. Vegetation cover did not affect rhizobial diversity. Mean shoot dry matter for the plants inoculated with the most efficient strains

did not differ from the treatment receiving 150 kg. ha⁻¹ of N. Shoot dry matter correlated positively with all evaluated variables. The highest proportion of efficient isolates was from sabiá woodlots, indicating that symbiotic efficiency may be affected by vegetation cover. There was high variability in nodule dry mass, as well as in N content and accumulation, indicating large differences in symbiotic capability among the isolates. Shoot dry matter was affected by N supply in both cuts. There was an increase in shoot dry matter in the second cut for all treatments, when compared to the first cut. There was no significant effect of vegetation cover in the evaluated variables for both cuts. Higher responses to the isolates were found in the second cut, and some isolates allowed shoot dry matter similar to those of the highest N fertilization treatments.

INTRODUÇÃO GERAL

O N é um dos elementos mais abundantes na natureza, constituindo cerca de 78% dos gases da atmosfera, principalmente na forma de N₂. No entanto, esse grande reservatório de N não se encontra diretamente disponível para os organismos vivos, pois a obtenção de N da atmosfera requer a quebra de uma ligação tripla covalente, muito estável, entre os dois átomos de N.

O N presente nos ecossistemas é proveniente direta ou indiretamente do N₂ transformado para uma forma assimilável pelas plantas para que possa ser incorporado aos ecossistemas. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) representa aproximadamente 63% da entrada anual de N nos ecossistemas terrestres, sendo o restante proveniente da produção industrial de fertilizantes nitrogenados e da fixação não biológica (descargas elétricas), compreendendo 30% e 7% da entrada anual de N nos ecossistemas terrestres, respectivamente (Taiz & Zeiger, 2004), sendo a simbiose entre rizóbios e leguminosas a forma mais importante de aquisição de N nos ecossistemas tropicais (Moreira & Siqueira, 2006).

A inoculação de leguminosas com rizóbios específicos é muito importante para o bom estabelecimento da simbiose, reduzindo assim os custos de produção da cultura pela não utilização da adubação mineral nitrogenada. No entanto, o sucesso da inoculação pode ser prejudicado pela baixa sobrevivência das bactérias no solo, bem como pela baixa competitividade com os rizóbios nativos. Portanto, a seleção de estirpes mais eficientes na FBN e adaptadas as condições edafoclimáticas da região onde se pretende cultivar a cultura é de suma importância para o sucesso da simbiose (Santos et al., 2005; Lima et al., 2009).

Para o estudo de diversidade e seleção de estirpes de rizóbio pode-se realizar a coleta de nódulos diretamente no campo em plantas com ocorrência natural na região onde se pretende realizar o estudo, ou por meio da coleta de solo para posterior obtenção de nódulos em condições controladas para que seja realizado o isolamento das bactérias (Santos et al., 2007; Chagas Junior et al., 2010a).

Inicialmente estes estudos envolvem um número elevado de isolados que após a caracterização morfológica são agrupados de forma a reduzir esse número nas fases posteriores do estudo. Esse método tem como principais

vantagens a rapidez e o custo relativamente baixo comparativamente aos métodos genotípicos, permitindo uma avaliação prévia da diversidade de isolados (Chagas Junior et al., 2009; Chagas Junior et al., 2010a). Estes isolados posteriormente são testados quanto à eficiência simbiótica, inclusive em nível de campo, objetivando selecionar os mais eficientes para uso futuro como inoculante (Chagas Junior et al., 2010b).

A utilização de leguminosas forrageiras em pastagens, inoculadas com rizóbios mais eficientes na FBN pode ser uma alternativa ao uso da adubação nitrogenada, além de representar uma estratégia para a recuperação de pastagens degradadas ou em vias de degradação (Carvalho & Pires, 2008).

Situação das pastagens brasileiras

Agropecuária sustentável é aquela que satisfaz necessidades humanas, melhora da qualidade ambiental e dos recursos naturais, utilização eficiente dos recursos não renováveis, viabilidade econômica e melhora da qualidade de vida (Graham & Vance, 2000; Schiere et al., 2002).

As pastagens constituem a principal e mais sustentável fonte de alimento em um sistema de produção animal, sendo a forma mais prática e de menor custo para os produtores. Esse aspecto tem contribuído para a pecuária brasileira se tornar fortemente competitiva, levando o país a ser o maior exportador de carnes, passando também de importador a um dos maiores exportadores de leite (Zanine & Silva, 2006).

Quando se analisa a utilização das terras no país verifica-se que a maior parte é ocupada por pastagens (49%), seguida de matas e florestas (28%) e de lavouras (22%) (Ibge, 2006). No entanto grande parte dessas pastagens encontra-se em algum grau de degradação (Mapa, 2011), que pode ser evitada pela boa formação e diversificação, manejo adequado e reposição de nutrientes (Dias-Filho & Andrade, 2005; Zimmer & Barbosa, 2005).

O manejo e a utilização adequada das pastagens podem resultar em importantes benefícios para esses ecossistemas, pois serão reduzidas as perdas de água, solo e nutrientes, e poderá haver uma grande contribuição para a redução do efeito estufa pelo sequestro de carbono e redução nas emissões de metano e óxido nitroso (Zimmer & Barbosa, 2005). Outro ponto importante é que a recuperação de pastagens degradadas contribuirá para a redução de abertura de novas áreas para pastagens (Barcellos et al., 2008).

Dentre os nutrientes requeridos pelas plantas, o N e o P são normalmente os que representam maior custo no estabelecimento da pastagem (Carvalho & Pires, 2008) e geralmente são os principais responsáveis pelo declínio dos pastos, quando em deficiência (Boddey et al., 2004). Portanto, a utilização de leguminosas forrageiras pode constituir uma alternativa ao uso do N em particular devido à FBN (Gobbi et al., 2009; Lenzi et al., 2009; Melo et al., 2009; Oliveira et al., 2009; Paris et al., 2009; Silva et al., 2010).

As leguminosas forrageiras vêm sendo utilizadas em diversas regiões pecuárias do Brasil, tanto plantadas exclusivamente, como consorciadas com gramíneas, visando a maior produção de forragem e aumento no teor protéico (Melo et al., 2009; Oliveira et al., 2009; Paris et al., 2009; Silva et al., 2010). Dentre os benefícios da utilização de leguminosas em consorciação com gramíneas, destaca-se o aumento no aporte de N nas pastagens (Perin et al., 2003), a oferta de forragem em determinadas épocas do ano (Carvalho & Pires, 2008), melhoria da qualidade nutricional (Aroeira et al., 2005) e aumento da produtividade animal (Paciullo et al., 2003; Paris et al., 2009), além de reduzir os custos de produção quando comparado a pastagens de gramíneas exclusivas adubadas com N mineral (Carvalho & Pires, 2008).

Lira et al. (2006) estimaram que o potencial da FBN de uma leguminosa forrageira seria aproximadamente equivalente a uma adubação anual com 100 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N, caso esta leguminosa compusesse aproximadamente 25% da composição botânica de uma pastagem consorciada, na base massa seca, e fixasse 60 kg ha⁻¹ de N anualmente. Diversos trabalhos relatam que estas estimativas de fixação podem ser consideradas relativamente conservadoras, que indicam valores de 93 a 545 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N (Cadisch et al., 1994; Viera-Vargas et al., 1995; Perin et al., 2003; Fernandes et al., 2005; Herridge et al., 2008).

Nos últimos anos, vêm sendo realizados diversos estudos com algumas espécies de leguminosas forrageiras no Brasil, como as dos gêneros *Stylosanthes* (Paciullo et al., 2003; Aroeira et al., 2005; Moreira et al., 2005; Santos et al., 2007; Melo et al., 2009;), *Arachis* (Miranda et al., 2008; Gobbi et al., 2009; Lenzi et al., 2009; Paris et al., 2009), *Calopogonium* (Pádua et al., 2004; Oliveira et al., 2009; Silva et al., 2010; Teixeira et al., 2010) e *Clitoria* (Souza et al., 2007; Teixeira, 2008).

A seleção de leguminosas forrageiras de menor palatabilidade, aliada a uma elevada eficiência na capacidade de FBN proporcionará uma maior capacidade de competição com a gramínea, contribuindo para significativos incrementos na produtividade das pastagens. Exemplos são as pastagens consorciadas com calopogônio devido à sua pequena aceitação pelos animais durante o período de máximo crescimento da gramínea, possibilitando o acúmulo de biomassa, reprodução e persistência desta leguminosa na pastagem (Carvalho & Pires, 2008).

O calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.) é uma leguminosa perene originária da América do Sul tropical, com hábito de crescimento trepador (Formentini et al., 2008), de ocorrência espontânea na Zona da Mata Pernambucana muito utilizada como adubo verde ou como planta forrageira em consorciação em pastagens, que apresenta grande capacidade de produção de biomassa (Teodoro et al., 2011).

Teodoro et al. (2011) verificaram que o calopogônio foi uma das leguminosas que conferiu cobertura plena do solo e a de maior capacidade de retenção da umidade e inibição das plantas espontâneas, em estudos com diferentes leguminosas forrageiras com potenciais para uso como cobertura do solo na Caatinga Mineira. Os autores relataram que esta leguminosa pode contribuir de forma significativa para o incremento de N e aporte de outros nutrientes, bem como para o incremento de matéria orgânica do solo.

Fixação biológica do nitrogênio

A simbiose entre rizóbios e leguminosas é um dos mais importantes sistemas simbióticos entre microrganismos e plantas, devido à eficiência do processo de FBN, à amplitude e distribuição geográfica dos hospedeiros e ao impacto econômico para a agricultura, devido à substancial economia no uso de fertilizantes nitrogenados (Herridge et al., 2008; Belay & Assefa, 2011; Freitas et al., 2011; Gualte et al., 2011).

Inicialmente, todas as bactérias que formavam nódulos em leguminosas pertenciam a família Rhizobiaceae e eram denominadas de *Rhizobium*. Entretanto, na década de 80, os rizóbios passaram a ser classificados em dois gêneros e seis espécies, de acordo com o tempo de crescimento de suas colônias em meio de cultura, com as de crescimento rápido agrupadas no gênero *Rhizobium* e as de crescimento lento no gênero *Bradyrhizobium*,

pertencente à família Bradyrhizobiaceae (Jordan, 1982). Em 2000 o grupo tradicional de rizóbios já era definido em seis gêneros (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium*) e mais de 30 espécies (Brandão Junior & Hungria, 2000a, b), todos pertencentes à subclasse α -proteobactéria.

Atualmente a taxonomia de rizóbios vem sofrendo mudanças consideráveis e já são descritos 18 gêneros distribuídos em 10 famílias, 98 espécies e várias biovares (Weir, 2012) que, além dos tradicionalmente pertencentes à subclasse α -proteobactéria, também foram incluídos gêneros de bactérias que nodulam leguminosas pertencentes às subclasses β -proteobactéria (Moulin et al., 2001; Valverde et al., 2003; Vandamme & Coenye, 2004) e até mesmo γ -proteobactéria (Shiraishi et al., 2010; Mahdhi et al., 2012) (Tabela 1).

Apesar de atualmente a classificação a nível de gêneros de rizóbios ser baseada principalmente na filogenia dos genes 16S rRNA e a definição de espécies na análise polifásica (Chang et al., 2011), as características culturais ainda são importantes, já que podem indicar diferenças morfofisiológicas importantes (Zhang et al., 2008; Chagas Junior et al., 2010a), representando o primeiro passo em estudos de diversidade de rizóbios (Medeiros et al., 2009; Chagas Junior et al., 2010a).

Em estudos de diversidade é interessante a coleta de material em diferentes tipos de solo, como também em diferentes sistemas de cultivo e/ou diferentes coberturas vegetais, pois a população bacteriana pode variar em tamanho e diversidade de indivíduos de acordo com o solo, ambiente ou cobertura vegetal, aumentando assim, as chances de se obter um isolado mais eficiente na FBN (Jesus et al., 2005; Santos et al., 2007).

Por exemplo, Santos et al. (2007) em estudos com 433 isolados provenientes de sete solos da Zona da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco, com diferentes coberturas vegetais, verificaram a ocorrência de uma elevada diversidade de rizóbios capazes de nodular as espécies *Arachis hypogaea*, *Arachis villosulicarpa*, *Stylosanthes guyanensis*, *Stylosanthes scabra*, *Aeschynomene americana*, *Aeschynomene paniculata* e *Aeschynomene histrix*. Os autores obtiveram índices de diversidade de Shannon-Weaver variando de 2,12 em solo cultivado com amendoim na Zona da Mata, chegando a 3,78 em solo sob Caatinga Nativa no Sertão e concluíram que a elevada diversidade

encontrada na região Nordeste do Brasil pode contribuir para a seleção de estirpes de rizóbios mais adaptadas, competitivas e mais eficientes na FBN.

Influências da cobertura vegetal na composição de comunidades bacterianas também foram verificadas por Jesus et al. (2005) em estudos de diversidade com 257 isolados de rizóbio que nodulam siratro em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental, que obtiveram índices de diversidade de 2,64 em áreas de floresta, 2,73 em cultivo de pupunheira e 3,11 em área cultivada com mandioca.

Tabela 1. Subclasses, famílias e gêneros de bactérias que nodulam leguminosas.

| Subclasse | Família | Gênero | Referências | |
|---------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| α-proteobactéria | Rhizobiaceae | <i>Rhizobium</i> | (Frank, 1889) | |
| | | <i>Ensifer</i> (anteriormente) | (Casida Junior, 1982; | |
| | | <i>Sinorhizobium</i>) | Chen et al., 1988) | |
| | | <i>Allorhizobium</i> | (De Lajudie et al., 1998) | |
| | Bradyrhizobiaceae | <i>Shinella</i> | (Lin et al., 2008) | |
| | | <i>Bradyrhizobium</i> | (Jordan, 1982) | |
| | α-proteobactéria | Phyllobacteriaceae | <i>Blastobacter</i> | (Van Berkum & Eardly, 2002) |
| | | | <i>Mesorhizobium</i> | (Jarvis et al., 1997) |
| | | Xanthobacteriaceae | <i>Phyllobacterium</i> | (Valverde et al., 2005) |
| | | | <i>Azorhizobium</i> | (Dreyfus et al., 1988) |
| Methylobacteriaceae | | <i>Methylobacterium</i> | (Jourand et al., 2004) | |
| | | <i>Microvirga</i> | (Ardley et al., 2012) | |
| Hyphomicrobiaceae | <i>Devosia</i> | (Rivas et al., 2003) | | |
| Brucellaceae | <i>Ochrobactrum</i> | (Trujillo et al., 2005) | | |
| β-proteobactéria | Burkholderiaceae | <i>Burkholderia</i> | (Moulin et al., 2001) | |
| | | <i>Cupriavidus</i> | (Vandamme & Coenye, 2004) | |
| | | <i>Herbaspirillum</i> | (Valverde et al., 2003) | |
| γ-proteobactéria | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas</i> | (Shiraishi et al., 2010) | |
| | Micrococcaceae | <i>Kocuria</i> | (Mahdhi et al., 2012) | |

Resultados semelhantes também foram obtidos por Santos et al. (2005) que obtiveram diferenças na eficiência da FBN de isolados de amendoim em função da cobertura vegetal em um Cambissolo Háplico Tb Eutrófico, do município de Serra Talhada, Pernambuco.

A tese está dividida em três capítulos na forma de artigo. O primeiro capítulo aborda a influência de diferentes coberturas vegetais sobre a diversidade de isolados rizobianos de *Calopogonium mucunoides*, através da caracterização morfológica de colônias isoladas.

O segundo capítulo trata da eficiência simbiótica dos isolados selecionados após agrupamento baseado nas características morfológicas de colônias isoladas no primeiro capítulo e selecionados após autenticação. Neste capítulo, os isolados foram caracterizados simbioticamente em estudos com substrato estéril para selecionar os isolados mais eficientes e verificar o efeito das coberturas vegetais na eficiência média de suas populações rizobianas.

No terceiro capítulo os isolados mais eficientes do segundo capítulo foram testados em vasos com solo não esterilizado em três cortes para verificar o potencial simbiótico e a competitividade desses isolados com as estirpes nativas do solo, a fim de selecionar os isolados com maiores potenciais para experimentação em campo e possível utilização como inoculante comercial.

Por fim, nas considerações finais são apresentadas as principais conclusões sobre o estudo e as perspectivas para pesquisas futuras.

Assim o presente trabalho objetivou avaliar a diversidade e selecionar estirpes rizobianas mais eficientes na FBN, provenientes de um Argissolo Vermelho-amarelo distrófico da Zona da Mata Seca de Pernambuco, sob diferentes coberturas vegetais, e selecionar, em estudos futuros, estirpes de rizóbio com potencial para inoculante.

Referências

ARDLEY, J. K.; PARKER, M. A.; DE MEYER, S. E.; TRENGOVE, R. D.; O'HARA, G. W.; REEVE, W. G.; YATES, R. J.; DILWORTH, M. J.; WILLEMS, A.; HOWIESON, J. G. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov., and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are Alphaproteobacterial root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2012.

AROEIRA, L. J. M.; PACIULLO, D. S. C.; LOPES, F. C. F.; MORENZ, M. J. F.; SALIBA, E. S.; SILVA, J. J.; DUCATTI, C. Disponibilidade, composição bromatológica e consumo de matéria seca em pastagem consorciada de

Brachiaria decumbens com Stylosanthes guianensis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 413-418, 2005.

BARCELLOS, A. O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G. B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 51-67, 2008.

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

BODDEY, R. M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R. M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O. C.; REZENDE, C. P.; CANTARUTTI, R. B.; PEREIRA, J. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in Brachiaria pastures: The key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 103, p. 389-403, 2004.

BRANDÃO JUNIOR, O.; HUNGRIA, M. Efeito de concentrações de solução açucarada na aderência do inoculante turfoso às sementes, na nodulação e no rendimento da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 515-526, 2000a.

BRANDÃO JUNIOR, O.; HUNGRIA, M. Efeito de doses de inoculante turfoso na fixação biológica do nitrogênio pela cultura da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, 2000b.

CADISCH, G.; SCHUNKE, R. M.; GILLER, K. E. Nitrogen cycling in a pure grass pasture and a grass-legume mixture on a red latosol in Brazil. **Tropical Grasslands**, v. 28, p. 43-52, 1994.

CARVALHO, G. G. P. & PIRES, A. J. V. Leguminosas tropicais herbáceas em associação com pastagens. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, p. 103-113, 2008.

CASIDA JUNIOR, L. E. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 339-345, 1982.

CHAGAS JUNIOR, 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, p. 161-169, 2010a.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; ANDRÉ, L. W. Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 489-494, 2009.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, G. R.; CHAGAS, L. F. B. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, p. 709-714, 2010b.

CHANG, Y. L.; WANG, E. T.; SUI, X. H.; ZHANG, X. X.; CHEN, W. X. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Lablab purpureus* (Linn.) grown in Southern China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 276-284, 2011.

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

DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FUTELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M. D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1277-1290, 1998.

DIAS-FILHO, M. B. & ANDRADE, C. M. S. Pastagens no ecossistema do tropico úmido. Simpósio sobre pastagens nos ecossistemas brasileiros: alternativas variáveis visando a sustentabilidade dos ecossistemas de produção de ruminantes nos deferentes ecossistemas, Goiânia, **Anais...Goiânia: SBZ**, p. 95-104, 2005.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; Gillis, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 89-98, 1988.

FERNANDES, C. D.; GROF, B.; CHAKRABORTY, S.; VERZIGNASSI, J. R. Estilosantes Campo Grande in Brazil: A tropical forage legume success story. **Tropical Grasslands**, v. 39, p. 223, 2005.

FORMENTINI, E. A.; LÓSS, F. R.; BAYERL, M. P.; LOVATI, R. D.; BAPTISTI, E. **Cartilha sobre adubação verde e compostagem**. INCAPER, 2008, 27 p.

FRANK, B. Ueber die pilzsymbiose der leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 7, p. 332-346, 1889.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. O.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. 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, p. 1856-1861, 2011.

GOBBI, K. F.; GARCIA, R.; GARCEZ NETO, A. F.; PEREIRA, O. G.; VENTRELLA, M. C.; ROCHA, G. C. Características morfológicas, estruturais e produtividade do capimbraquiária e do amendoim forrageiro submetidos ao sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 1645-1654, 2009.

GRAHAM, P. H. & VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: An overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v. 65, p. 93-106, 2000.

GUALTE, 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, p. 303-308, 2011.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário**. 2006, 141 p.

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

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

JORDAN, D. C., Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 136-139, 1982.

JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BÉNA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2269-2273, 2004.

LENZI, A.; CECATO, U.; MACHADO FILHO, L. C. P.; GASPARINO, E.; ROMA, C. F. C.; BARBERO, L. M.; LIMÃO, V. A. Produção e qualidade do pasto de coastcross consorciado ou não com amendoim forrageiro com ou sem aplicação de nitrogênio. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 918-926, 2009.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. D. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, p. 127-145, 2009.

LIN, D. X.; WANG, E. T.; TANG, H.; HAN, T. X.; HE, Y. R.; GUAN, S. H.; CHEN, W. X. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1409-1413, 2008.

LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; LIRA JUNIOR, M. A.; MELLO, A. C. L. Sistemas de produção de forragem: alternativas para sustentabilidade da pecuária. **Anais de Simpósios da 43ª Reunião Anual da SBZ** - João Pessoa - PB, p. 405-423, 2006.

MAHDHI, M.; FTERICH, A.; REJILI, M.; RODRIGUEZ-LLORENTE, I. D.; MARS, M.; Legume-nodulating bacteria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella maritima* and *Hedysarum spinosissimum*) in Tunisia. **Annals of Microbiology**, v. 62, p. 61-68, 2012.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Recuperação de áreas degradadas**. programa ABC, 2011.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do estado do rio grande do norte. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, p. 529-535, 2009.

MELO, R. F.; DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V.; OLIVEIRA, J. A. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 455-465, 2009.

MIRANDA, E. M.; SAGGIN JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para o amendoim forrageiro consorciado com braquiária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1185-1191, 2008.

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

MOREIRA, L. M.; FONSECA, D. M.; VÍTOR, C. M. T.; ASSIS, A. J.; NASCIMENTO JUNIOR, D. D.; RIBEIRO JUNIOR, J. I.; OBEID, J. A.

Renovação de pastagem degradada de capim-gordura com a introdução de forrageiras tropicais adubadas com nitrogênio ou em consórcios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 442-453, 2005.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the B-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.

OLIVEIRA, I. P.; COSTA, K. A. P.; FAQUIN, V.; MACIEL, G. A.; NEVES, B. P.; MACHADO, E. L. Efeitos de fontes de cálcio no desenvolvimento de gramíneas solteiras e consorciadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 592-598, 2009.

PACIULLO, D. S. C.; AROEIRA, L. J. M.; ALVIM, M. J.; CARVALHO, M. M., Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 421-426, 2003.

PÁDUA, F. T.; ALMEIDA, J. C. C.; MAGIEIRO, J. Q.; NEPOMUCENO, D. D.; SILVA, T. O.; ROCHA, N. S. Produção de matéria seca e de sementes de leguminosas forrageiras tropicais cultivadas em diferentes espaçamentos. **Revista da Universidade Rural**, v. 24, p. 67-71, 2004.

PARIS, W.; CECATO, U.; BRANCO, A. F.; BARBERO, L. M.; GALBEIRO, S. Produção de novilhas de corte em pastagem de Coastcross-1 consorciada com *Arachis pintoi* com e sem adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 122-129, 2009.

PERIN, A.; GUERRA, J. G. M.; TEIXEIRA, M. G. Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 791-796, 2003.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; KROPPESTEDT, R. M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 47-53, 2003.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SOUTO, S. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 27, p. 301-307, 2005.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SCHIERE, J. B.; IBRAHIM, M. N. M.; VAN KEULEN, H. The role of livestock for sustainability in mixed farming: Criteria and scenario studies under varying resource allocation. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 90, p. 139-153, 2002.

SHIRAISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and Betaproteobacteria *Burkholderia* sp.. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 269-274, 2010.

SILVA, V. J.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; TEIXEIRA, V. I.; SANTOS, M. V. F.; LIRA, M. A.; MELLO, A. C. L. Características morfológicas e produtivas de leguminosas forrageiras tropicais submetidas a duas frequências de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 97-102, 2010.

SOUZA, L. A. G.; BEZERRA NETO, E.; SANTOS, C. E. D. R. S.; STAMFORD, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 207-217, 2007.

TAIZ, L., & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, Artmed, 2004, 526 p.

TEIXEIRA, V. I. **Aspectos agrônômicos e bromatológicos de leguminosas forrageiras na Zona da Mata Seca de Pernambuco**. Recife 2008. 53 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

TEIXEIRA, V. I.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; SANTOS, M. V. F.; LIRA JUNIOR, M. A.; LIRA, M. A.; SILVA, H. M. S. Aspectos agronômicos e bromatológicos de leguminosas forrageiras no nordeste brasileiro. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 245-254, 2010.

TEODORO, R. B.; OLIVEIRA, F. L.; SILVA, D. M. N.; FÁVERO, C.; QUARESMA, M. A. L. Leguminosas herbáceas perenes para utilização como coberturas permanentes de solo na Caatinga Mineira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 292-300, 2011.

TRUJILLO, M. E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A. M.; RIVAS, R.; LUDEÑA, D.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov.. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1318-1327, 2005.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, F.; VIZCAÍNO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILEMS, A. *Phyllobacterium trifolli* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1985-1989, 2005.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVENTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VAN BERKUM, P. & EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1132-1136, 2002.

VANDAMME, P., & COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2285-2289, 2004.

VIERA-VARGAS, M. S.; SOUTO, C. M.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Quantification of the contribution of N₂ fixation to tropical forage legumes and

transfer to associated grass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p. 1193-1200, 1995.

WEIR, B. S. **The current taxonomy of rhizobia**. New Zealand rhizobia website. http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia_, Last updated: 10 April, 2012.

ZANINE, A. M. & SILVA, C. C. Mercado internacional da carne bovina. **Revista Científica eletrônica de Medicina Veterinária**, p. 1-9, 2006.

ZHANG, Y. F.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; WANG, F. Q.; HAN, L. L.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, p. 146-154, 2008.

ZIMMER, A. H. & BARBOSA, R. A. Manejo de pastagens para produção sustentável, **Anais do ZOOTEC'2005**, Campo Grande - MS, 2005, 33 p.

CAPÍTULO 1

**DIVERSIDADE DE ISOLADOS RIZOBIANOS DE CALOPOGÔNIO DE
DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS EM UM ÚNICO SOLO DA ZONA
DA MATA SECA DE PERNAMBUCO**

Diversidade de isolados rizobianos de calopogônio de diferentes coberturas vegetais em um único solo da Zona da Mata Seca de Pernambuco

Resumo

Atualmente sabe-se que as leguminosas se associam com grande diversidade de rizóbios nativos do solo, que pode ser afetada pela cobertura vegetal. Esta diversidade é essencial para a seleção de estirpes mais eficientes na fixação biológica do nitrogênio. Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes coberturas vegetais em um mesmo solo na diversidade de isolados rizobianos de calopogônio. As amostras de solo foram coletadas na camada de 0 - 0,2 m de profundidade em áreas de pastagens de capim *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*), e em áreas de Mata Atlântica, com três áreas diferentes sob cada cobertura. Plântulas de calopogônio foram pré-germinadas em placas de Petri com papel toalha por três dias e transplantadas para vasos de Leonard, sendo inoculadas com 10 g de solo e colhidas aos 50 dias. Foram amostrados quatro a cinco nódulos por planta, usados para isolamento em meio YMA e caracterização morfológica. Foram obtidos 1.575 isolados, dos quais 544 de solo com pastagem de *Brachiaria decumbens*, 666 de bosques de sabiá e 365 isolados de Mata Atlântica. Destes, 98,5% apresentaram crescimento rápido em meio de cultura apesar da estirpe atualmente recomendada para a cultura ser *Bradyrhizobium japonicum*, considerada de crescimento lento. Após agrupamento foram formados 163, 257 e 77 grupos para os isolados de áreas de pastagem, bosque de sabiá e Mata Atlântica, respectivamente, o que demonstra uma elevada diversidade entre os isolados. As coberturas vegetais não diferiram muito com relação a diversidade rizobiana obtida no presente estudo e isso deve-se provavelmente a pequena diferença existente entre os atributos físicos e químicos do solo sob essas coberturas vegetais .

Palavras-Chave: biodiversidade; eficiência simbiótica; fixação biológica; leguminosas.

Introdução

O calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.) é uma leguminosa forrageira perene originária da América do Sul tropical (Formentini et al., 2008) e as leguminosas forrageiras vem sendo objeto de estudos em diversas regiões do Brasil, visando à maior produção de forragens e aumento no teor protéico (Oliveira et al., 2009; Silva et al., 2010; Teixeira et al., 2010b).

O emprego de leguminosas forrageiras em cultivo consorciado com gramíneas ajuda na manutenção ou melhoria das características físicas, químicas e biológicas dos solos, com destaque para as associações simbióticas com bactérias fixadoras de N₂, o que resulta no aporte de

quantidades expressivas desse nutriente no sistema solo-planta (Lima et al., 2009; Melo et al., 2009).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um dos processos mais importantes na natureza, sendo a simbiose entre rizóbios e leguminosas um dos mais importantes sistemas simbióticos, devido à eficiência da FBN, a distribuição geográfica dos hospedeiros e à grande economia no uso de fertilizantes nitrogenados (Herridge et al., 2008; Lima et al., 2009; Belay & Assefa, 2011; Freitas et al., 2011; Gualte et al., 2011;).

Atualmente sabe-se que as leguminosas se associam com 98 espécies de 18 gêneros (*Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Microvirga*, *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Shinella*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* e *Kocuria*) (De Lajudie et al., 1998; Van Berkum & Eardly, 2002; Valverde et al., 2003; Shiraishi et al., 2010; Mahdhi et al., 2012; Weir, 2012) e estudos de diversidade de rizóbios nativos do solo são primordiais para a seleção de novas estirpes mais eficientes na FBN (Elboutahiri et al., 2009).

Uma forma de se obter estirpes de rizóbio mais eficientes na FBN e adaptadas às condições edafoclimáticas e competitivas com as estirpes nativas do solo onde se pretende cultivar a leguminosa é através de estudos de diversidade e seleção de estirpes em diferentes sistemas de cultivo (Elboutahiri et al., 2010; Lorite et al., 2010; Chang et al., 2011; Fontoura et al., 2011; Martins et al., 2011).

Em estudos com diferentes coberturas vegetais em sete solos da Zona da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco, Santos et al. (2007) verificaram a ocorrência de uma elevada diversidade de rizóbios capazes de nodular as espécies estudadas e concluíram que a elevada diversidade encontrada na região Nordeste do Brasil pode contribuir para a seleção de estirpes de rizóbios mais adaptadas, competitivas e mais eficientes na FBN.

Jesus et al. (2005) também verificaram a influência da cobertura vegetal na composição de comunidades bacterianas em estudos de diversidade de rizóbio que nodulam siratro em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade de isolados rizobianos de calopogônio através da caracterização

morfológica, cultivado em solo proveniente de pastagens com *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e áreas de Mata Atlântica da Zona da Mata Seca de Pernambuco.

Material e Métodos

A coleta de solo foi realizada em Março de 2010, na Estação Experimental de Itambé do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) na Zona da Mata Seca de Pernambuco. A estação é localizada aos 07°25' S, 35°06' W, e 190 m acima do nível do mar, tem precipitação média anual de 1200 mm, temperatura média anual de 24 °C e a umidade relativa média do ar de 80% e tipo climático é AS', segundo a classificação de Köppen (IPA, 1994). Os solos de referência da região de Itambé são classificados como Argissolos Vermelho-amarelo distrófico, com horizonte A proeminente de textura média/argilosa, fase floresta tropical subcaducifólia e relevo suave ondulado (Jacomine et al., 1973) atualizado de acordo com Embrapa (2006).

As amostras de solo foram coletadas na camada de 0 - 0,2 m de profundidade em áreas de pastagens de capim *B. decumbens*, bosques de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*), e em áreas de Mata Atlântica, com três áreas diferentes para cada cobertura, tendo-se coletado 20 amostras simples por área.

As pastagens de capim *B. decumbens* foram estabelecidas no fim da década de 1980, sendo pastejadas desde então, enquanto os bosques de sabiá foram implantados nos anos de 1987 e 1990 e as áreas de Mata Atlântica têm aproximadamente 60 anos (Lira, 2011 – comunicação pessoal¹). Vale ressaltar que as pastagens de *B. decumbens* receberam calagem na forma de calcário dolomítico (PRNT 80%), sendo aplicado 1 t ha⁻¹ nos anos de 2008 e 2009, além de adubações de 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e K₂O em 2008 e 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 20 kg ha⁻¹ de K₂O em 2009, na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente. Tanto a calagem, quanto as adubações foram feitas a lanço, sem incorporação.

Uma subamostra do solo de cada área foi conservada em refrigerador a aproximadamente 4 °C até a inoculação das plantas no experimento para obtenção de nódulos. Outra parte das amostras foi peneirada e posteriormente

¹ Lira, Mario de Andrade - Comunicação pessoal baseada na pesquisa desenvolvida na Estação Experimental de Itambé desde o fim da década de 1960 em conversa com a equipe em julho de 2011.

realizaram-se as análises físicas e químicas das mesmas (Tabela 1) segundo metodologia descrita por Ruiz (2005) e Embrapa (1999), respectivamente.

Tabela 1. Médias e intervalo de confiança (95%) das características físicas e químicas do solo das áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE utilizado para obtenção de nódulos na profundidade de 0-0,2 m.

| Cobertura vegetal | Características Físicas | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Areia | Silte | Argila | Classe textural | | | | | |
| ----- g kg ⁻¹ ----- | | | | | | | | | |
| Pastagem | 661 ± 42 | 26 ± 18 | 312 ± 60 | Franco argilo arenoso | | | | | |
| <i>B. decumbens</i> | | | | | | | | | |
| Bosque de Sabiá | 657 ± 85 | 55 ± 18 | 288 ± 90 | Franco argilo arenoso | | | | | |
| Mata Atlântica | 647 ± 73 | 55 ± 12 | 297 ± 84 | Franco argilo arenoso | | | | | |
| Características Químicas | | | | | | | | | |
| | pH | C | P | K | Ca | Mg | Na | Al | H+Al |
| | água | g kg ⁻¹ | mg dm ⁻³ | ----- cmol _c dm ⁻³ ----- | | | | | |
| Pastagem | 5,61 ± 0,37 | 5,26 ± 1,49 | 23,33 ± 11,0 | 0,79 ± 0,44 | 2,30 ± 0,28 | 2,35 ± 0,26 | 0,06 ± 0,04 | 0,13 ± 0,14 | 6,27 ± 1,60 |
| <i>B. decumbens</i> | | | | | | | | | |
| Bosque de Sabiá | 5,00 ± 0,38 | 5,38 ± 0,39 | 7,00 ± 0,00 | 0,34 ± 0,28 | 2,38 ± 0,92 | 2,15 ± 0,91 | 0,11 ± 0,16 | 0,53 ± 0,46 | 7,55 ± 1,30 |
| Mata Atlântica | 4,86 ± 0,39 | 6,75 ± 0,80 | 5,67 ± 0,65 | 0,18 ± 0,05 | 3,37 ± 0,45 | 2,67 ± 0,56 | 0,06 ± 0,03 | 0,38 ± 0,41 | 7,55 ± 1,30 |

X±Y, onde X = Médias e Y = Intervalo de Confiança; pH em água (1:2,5); P, K e Na = Mehlich-1; Ca, Mg, e Al = KCl 1 mol L⁻¹(H+Al) = acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ a pH 7,0

Um experimento foi conduzido para a obtenção de nódulos em casa de vegetação em julho de 2010. Sementes de *Calopogonium mucunoides* foram escarificadas quimicamente com H₂SO₄ concentrado por 20 minutos, e lavadas com água destilada por várias vezes (Costa et al., 2008) e, posteriormente, foram imersas em álcool por 10 segundos e desinfestadas com hipoclorito de sódio a 5%, por cinco minutos, sendo em seguida lavadas com água destilada.

As plântulas foram pré-germinadas em placas de Petri com papel toalha por três dias. Posteriormente, foram transplantadas para copos descartáveis de polipropileno de 300 mL contendo areia:vermiculita (1:1) autoclavada, tendo-se utilizado uma planta por copo, e inoculadas com 10,0 g de solo por planta, recebendo solução nutritiva de Hoagland sem N (Hoagland & Arnon, 1950). As nove áreas amostrais foram avaliadas separadamente, com 20 réplicas de cada área, e ao final de 50 dias as plantas foram coletadas, com os nódulos sendo separados e acondicionados em tubos com sílica-gel para secagem e conservação e posterior isolamento.

Foram amostrados aleatoriamente quatro a cinco nódulos por planta, seguindo o procedimento padrão como sintetizado em Hungria (1994). Os

nódulos amostrados de cada tubo foram reidratados, e em seguida imersos em álcool 95% para quebra da tensão capilar superficial, seguido por desinfestação superficial por imersão em hipoclorito de sódio a 5% por cinco minutos, e lavados em água destilada esterilizada por seis vezes. O isolamento foi conduzido em placas de Petri com meio YMA, com azul de bromotimol (Vincent, 1970).

A caracterização morfológica foi baseada na velocidade de aparecimento de colônias isoladas (< 3 dias; > 3 dias), diâmetro (< 2 mm; > 2 mm), cor (incolor; branca; creme; amarela; rosa), forma (circular; irregular; puntiforme), elevação (plana; lente; convexa; drop-like; umbilicada; umbanada), borda (inteira; ondulada; filamentosa; lobada; denteada; nenhuma), transparência (translúcida; opaca), superfície (rugosa; lisa; papilosa), produção de muco (escasso; pouco; moderado; abundante), consistência do muco (seca; aquosa; gomosa; viscosa; butírica), elasticidade do muco (sem; com) e modificação do pH do meio de cultura (ácido; neutro; alcalino) (Vincent, 1974; Silva et al., 2007).

A partir das características morfológicas dos isolados, foi constituída uma matriz binária (presença e ausência da característica), sendo realizado um agrupamento para cada cobertura vegetal, além de um agrupamento utilizando-se todos os isolados dos diferentes ambientes. Utilizou-se a matriz de similaridade através da distância euclidiana, pelo método da ligação simples, em que os indivíduos são reunidos de acordo com a proximidade existente entre eles.

A diversidade para as diferentes coberturas vegetais foi avaliada pelo índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') (Shannon & Weaver, 1949), com a seguinte equação:

$$H' = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} P_i \log P_i$$

Onde: $P_i = n_i/n$ (n_i = número de isolados de cada grupo; n = número total de isolados). Quanto maior for o valor obtido, maior será a diversidade da população estudada.

A relação entre as espécies detectadas foi avaliada pelo índice de uniformidade de Pielou (J') (Pielou, 1959), que é um índice de equitabilidade derivado do índice de diversidade de Shannon-Weaver proporcional à diversidade e inversamente proporcional à dominância e com uma amplitude

que vai de 0 a 1 para a mínima e máxima uniformidade, respectivamente, sendo calculado pela seguinte equação:

$$J' = H/(\log S).$$

Onde: S = número de grupos detectados; H = índice de Shannon-Weaver.

Verificou-se também a dominância de espécies através do índice de dominância de Simpson (Simpson, 1949), que reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Este índice varia de 0 a 1 e quanto maior for o valor obtido, maior será a probabilidade de serem da mesma espécie, ou seja, maior será a dominância e menor a diversidade de espécies, sendo esta dominância inversamente proporcional a equitabilidade.

A dominância de Simpson é calculada pela seguinte equação:

$$I_s = \frac{\sum ni (ni - 1)}{N (N - 1)}$$

Onde: ni = número de indivíduos de cada espécie; N = o número total de indivíduos. Os índices de diversidade de Shannon, uniformidade de Pielou e dominância de Simpson foram calculados pelo software PAST[®] (Hammer et al., 2001).

Também foi feita a análise de componentes principais com os valores obtidos através da caracterização física e química do solo, matéria seca da parte aérea e de raiz, matéria seca e número de nódulos, número de isolados por nódulo, número de isolados e de grupos obtidos, média de isolados por grupo e número máximo de isolados em um único grupo para cada cobertura vegetal e dos índices de Shannon-Weaver, Pielou e Simpson.

O software STATISTICA 8.0 (Statsoft, 2008) foi utilizado para a análise de agrupamento através do método da distância euclidiana e para a análise de componentes principais, por meio de procedimentos estatísticos multivariados.

Os dados de matéria seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), matéria seca (MSN) e número (NN) de nódulos e número de isolados por nódulo (I/N) foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Knott para comparação das médias, e o índice de Shannon-Weaver submetido ao teste Tukey, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.3 (Ferreira, 2008).

Resultados e Discussão

Foram obtidos 1.575 isolados de rizóbios provenientes das áreas em estudo. Desses, 544 foram provenientes das áreas de pastagens com *Brachiaria decumbens*; 666 de bosques de sabiá e os demais 365 isolados de áreas de Mata Atlântica. A menor quantidade de representantes provenientes de áreas de Mata Atlântica deveu-se à baixa nodulação das plantas de calopogônio inoculadas com o solo proveniente desta cobertura vegetal. No entanto não houve diferenças significativas entre as coberturas de Mata Atlântica e bosques de sabiá (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e intervalo de confiança (95%) da matéria seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), matéria seca (MSN) e número (NN) de nódulos e número de isolados por nódulo (I/N) do experimento para obtenção de nódulos provenientes das áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE na profundidade de 0-0,2 m.

| Cobertura vegetal | MSPA ¹ | MSSR ¹ | MSN ¹ | NN ¹ | I/N ² |
|------------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------|------------------|
| | ----- g planta ⁻¹ ----- | | mg planta ⁻¹ | | |
| Pastagem <i>B. decumbens</i> | 0,78a ± 0,11 | 0,13a ± 0,01 | 48,55a ± 8,10 | 28,10a ± 5,62 | 2,09b ± 0,09 |
| Bosque de Sabiá | 0,36b ± 0,05 | 0,10b ± 0,01 | 24,55b ± 4,31 | 14,87b ± 2,81 | 2,56a ± 0,15 |
| Mata Atlântica | 0,47b ± 0,06 | 0,11b ± 0,01 | 22,32b ± 4,37 | 9,92b ± 2,12 | 1,52c ± 0,09 |

Na coluna, médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente a 5% pelo teste Scott Knott. ¹Médias de 60 repetições; ²Médias de 260 nódulos para pastagem *B. decumbens* e bosque de sabiá e de 240 nódulos para Mata Atlântica.

A menor nodulação encontrada em solos provenientes das áreas de Mata Atlântica pode ser devido às condições desfavoráveis para o estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa, pois esses ecossistemas florestais possuem baixa necessidade de nitrogênio e eficiente ciclagem desse nutriente, diminuindo assim o estímulo para a ocorrência da simbiose e, conseqüentemente, da FBN. Resultados semelhantes foram obtidos por Jesus et al. (2005) e por Lima et al. (2009) em estudos com siratro (*Macroptilium atropurpureum*) em diferentes sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental.

De maneira geral, os isolados de rizóbios obtidos no presente estudo apresentaram crescimento rápido. Dos 1.575 isolados avaliados, apenas 24 (1,5%) apresentaram crescimento após três dias em meio de cultura YMA com azul de bromotimol. Nas demais características morfológicas das colônias, 63,5% dos isolados apresentaram diâmetro inferior a dois milímetros, 90,2%

possuem coloração creme, 48,5% forma irregular, 37,7% elevação convexa, 51,9% borda inteira, 92,4% translúcida, 71,6% superfície lisa. Quanto à produção de muco, 46,8% dos isolados apresentaram pouca produção e 48,1% produzem elevada produção de muco (moderado e abundante) e, 37,7% possuem consistência do muco viscosa (Figura 1).

Os dados de velocidade de aparecimento de colônias isoladas corroboram os resultados de Santos et al. (2007), em estudos com *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene* cultivadas em diferentes solos da Zona da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco, os de Medeiros et al. (2009), trabalhando com isolados de feijão caupi provenientes de seis áreas de Caatinga do Rio Grande do Norte, e de Teixeira et al. (2010a), em estudos com *Cratylia mollis*, *Calliandra depauperata* e *Mimosa tenuiflora* cultivadas em solo de Caatinga.

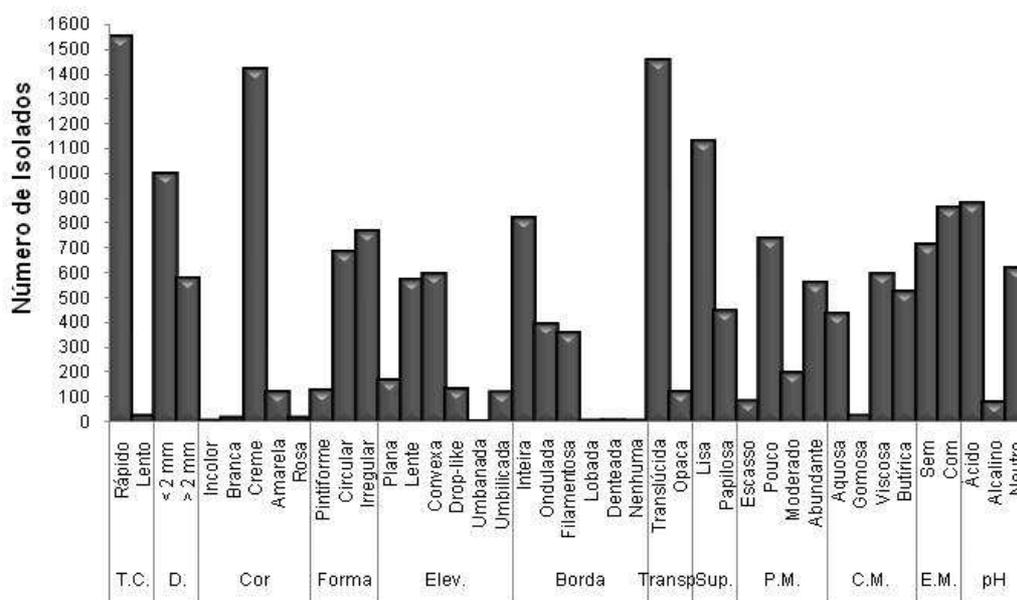


Figura 1. Distribuição dos isolados de rizóbio obtidos de nódulos de calopogônio inoculado com solo de pastagens de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e áreas de Mata Atlântica baseada nas características morfológicas tempo de crescimento em dias (T.C.), diâmetro das colônias (D), cor, forma, elevação, borda, transparência (Transp.), superfície (Sup.), produção (P.M.), consistência (C.M.) e elasticidade do muco (E.M.) e produção de ácido ou álcalis (pH).

Com relação à formação de ácidos e de álcalis, 55,6% dos isolados acidificaram o pH do meio de cultura e apenas 5,1% dos isolados promoveram a alcalinização (Figura 1). Esse comportamento de acidificação do meio de cultura também foi verificado por Leite et al. (2009) em estudos com cinco

cultivares de feijão caupi em diferentes solos da Bahia, por Santos et al. (2007) avaliando o comportamento de isolados de rizóbio em *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene* em diferentes solos da Zona da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco e por Batista et al. (2007), em estudos com a cultura da soja no Cerrado Brasileiro.

Esta característica de crescimento rápido é uma estratégia de sobrevivência e pode conferir vantagem competitiva na rizosfera (Norris, 1965). Vale salientar que a estirpe atualmente recomendada para a produção de inoculante para o calopogônio é a SEMIA 6152 (=BR1602, *Bradyrhizobium japonicum*, acesso Genbank AY904756, recomendada pela Embrapa Agrobiologia com base em teste em campo) (Secretaria de Defesa Agropecuária - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2011). Inicialmente as bactérias pertencentes a este gênero foram classificadas como rizóbios de crescimento lento (Jordan, 1982).

O estudo da diversidade de rizóbios em solos tropicais é muito importante para a obtenção de estirpes mais eficientes simbioticamente, que possam contribuir para o fornecimento de N para a leguminosa hospedeira, bem como para o solo (Jesus et al., 2005; Santos et al., 2007; Lima et al., 2009). No presente estudo foram obtidos 1.575 isolados que formaram 163 grupos para os isolados provenientes de áreas de pastagem de *Brachiaria decumbens*, 257 grupos para bosques de sabiá e 77 grupos para Mata Atlântica, com 100% de similaridade, o que denota elevada diversidade entre os isolados.

Na tabela 3 são apresentados os valores médios do número de isolados e de grupos, número de isolados por grupo e máximo de isolados em um único grupo (I/G) e os índices de Shannon-Weaver (H'), Pielou (J) e Simpson (I_s). A diversidade de espécie foi influenciada pelas diferentes coberturas vegetais estudadas, sendo os maiores índices de Shannon-Weaver obtidos nas áreas de bosques de sabiá, os quais foram significativamente superiores aos obtidos em áreas de Mata Atlântica ($p < 0,10$) (Tabela 3). Não foi obtida diferença significativa na diversidade de espécie entre a cobertura de pastagens de *B. decumbens* e as demais coberturas avaliadas.

Índices de diversidade de Shannon próximos aos do presente estudo foram verificados por Santos et al. (2007), que obtiveram índices variando de 2,12 a 3,78 em estudos com *Arachis hypogaea*, *Arachis villosulicarpa*,

Stylosanthes guyanensis, *Stylosanthes scabra*, *Aeschynomene americana*, *Aeschynomene paniculata* e *Aeschynomene histrix* em diferentes coberturas vegetais e sistemas de cultivo em solos da Zona da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco e por Jesus et al. (2005) em estudos de diversidade com 257 isolados de rizóbio que nodulam siratro em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental, que obtiveram maior índice de diversidade na área cultivada com mandioca (3,11), diferindo estatisticamente da área cultivada com pumpunheira (2,73) e da área de floresta (2,64), as quais não diferiram estatisticamente entre si.

Influências da cobertura vegetal na composição de comunidades bacterianas também foram verificadas por Leite et al. (2009), em estudos com 581 isolados rizobianos e cinco cultivares de feijão-caupi em solos com diferentes sistemas de uso da terra do Vale do São Francisco, Pernambuco. Os autores obtiveram índices de diversidade de Shannon-Weaver variando de 2,47 a 3,88 para os diferentes sistemas de uso da terra e de 3,47 a 4,38 para as diferentes cultivares de feijão.

Os maiores índices de diversidade do presente estudo foram obtidos em áreas de bosque de sabiá e foram significativamente superiores aos obtidos em áreas de Mata Atlântica, que apresentaram menor diversidade, provavelmente devido a estas áreas sob bosques de sabiá possuir leguminosas geralmente consideradas promíscuas, que favorece a relação simbiótica entre rizóbios e leguminosas, comparativamente as áreas de Mata Atlântica, com baixa demanda por N devido à ciclagem deste nutriente.

Para as demais variáveis avaliadas na tabela 3 não foi observado efeito significativo das coberturas vegetais, apesar da elevada diferença observada para a dominância de Simpson entre as áreas de bosque de sabiá e de Mata Atlântica.

Quando todos os isolados foram avaliados em conjunto, houve a formação de 398 grupos, sendo 78 grupos formados com representantes de origens diferentes. Destes, dois grandes grupos se destacaram pelo número elevado de representantes com relação aos demais e foram frequentes em todas as áreas estudadas. O primeiro foi formado por 362 isolados, o que representa 23% do total de isolados e tem como características principais, apresentarem crescimento rápido, maior que dois milímetros, de coloração creme, forma circular, produção de muco abundante, consistência aquosa e

reação ácida, e o segundo grupo foi formado por 145 isolados, correspondente a 9% dos isolados obtidos e se diferencia do outro grupo apenas por apresentar consistência do muco viscosa.

Os demais grupos que também tiveram número elevado de representantes contêm 57; 33 e 29 isolados, o que corresponde a apenas 3,6%; 2,1% e 1,8% dos isolados obtidos, respectivamente, com os demais grupos formados por número de isolados bem menor, com 245 grupos formados por apenas um representante cada, o que representa 61,6% do total de grupos. Vale salientar que foram formados 377 grupos com isolados de crescimento rápido e apenas 21 grupos com isolados de crescimento lento e isto se deu devido ao elevado número de isolados de crescimento rápido.

Leite et al. (2009) em estudos com 581 isolados rizobianos e cinco cultivares de feijão-caupi em solos com diferentes sistemas de uso da terra do Vale do São Francisco, Pernambuco, verificaram que apesar de 62% dos isolados apresentarem crescimento rápido, esses apresentaram menor diversidade que os isolados de crescimento lento, os quais formaram maior número de grupos com base nas características morfológicas.

Tabela 3. Médias e intervalo de confiança (95%) do número de isolados e de grupos e isolados por grupo e quantidade máxima de isolados em um único grupo, índices de diversidade de Shannon-Weaver (H'), equitabilidade de Pielou (J) e dominância de Simpson (I_s) dos isolados provenientes de áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE na profundidade de 0-0,2 m.

| Variáveis | Cobertura vegetal | | |
|--------------------|------------------------------|-----------------|----------------|
| | Pastagem <i>B. decumbens</i> | Bosque de Sabiá | Mata Atlântica |
| Número de Isolados | 181,33 ± 22,75 | 188,67 ± 76,58 | 121,67 ± 51,51 |
| Número de Grupos | 71,67 ± 19,48 | 104,67 ± 22,33 | 31,67 ± 19,93 |
| Isolados por Grupo | 2,67 ± 1,10 | 2,10 ± 0,12 | 4,31 ± 1,80 |
| Máximo de I/G | 49,00 ± 46,97 | 41,00 ± 27,04 | 55,33 ± 20,38 |
| Shannon-Weaver | 3,29ab ± 0,21 | 3,56a ± 0,22 | 3,03b ± 0,71 |
| Pielou | 0,92 ± 0,03 | 0,94 ± 0,04 | 0,87 ± 0,14 |
| Simpson | 0,15 ± 0,02 | 0,11 ± 0,03 | 0,19 ± 0,14 |

$X \pm Y$, onde X = Médias e Y = Intervalo de Confiança

Na linha, apenas para o índice de Shannon-Weaver, médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente a 10% pelo teste Tukey.

Com relação à uniformidade de Peilou, Kaschuk et al. (2006) obtiveram resultados semelhantes ao do presente estudo ao avaliarem a diversidade genética de rizóbios associados a feijão comum, sendo ligeiramente superior em área de plantio direto (0,97), comparativamente a área de sistema

convencional (0,94). Roesch et al. (2007) obtiveram índices variando de 0,62 a 0,95 em estudos de diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a milho em diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Índices de dominância de Simpson próximos aos do presente estudo foram obtidos por Leite et al. (2009) em estudos com feijão-caupi em solos do Vale do São Francisco.

Para a análise conjunta das variáveis avaliadas no presente estudo para as diferentes coberturas vegetais foi feita a análise de componentes principais (Tabela 4 e Figuras 2 e 3). Na tabela 4 pode-se verificar que apesar da análise de componentes principais concentrar a variação dos dados nos primeiros componentes, seria preciso o uso dos cinco primeiros componentes para a obtenção de variância acumulada superior a 80%. Ainda pela análise desta tabela, verifica-se que para o primeiro componente as variáveis que apresentaram maiores coeficientes de contribuição foram o pH, Al, H+Al, MSN e o índice de Shannon. Para o segundo componente, a variável que mais contribuiu foi o silte e para o terceiro componente foram NG, I/G e M. I/G. Verifica-se ainda, que a maioria das variáveis analisadas apresentaram baixos coeficientes de contribuição para a análise de componentes principais.

Na figura 2 é apresentada a ordenação das diferentes coberturas vegetais quanto às variáveis apresentadas da tabela 4. Pode-se verificar que não houve agrupamento específico de cada cobertura e que foram formados cinco grupos entre as diferentes coberturas. Grupos distintos foram formados pelas coberturas Decumbens 1 e 3 e Mata 3, enquanto que as coberturas Sabiá 1 e Decumbens 2 formaram um grupo e as coberturas Mata 1 e 2 e Sabiá 2 e 3 foram reunidas em outro grupo.

A área de Mata 3, dentre as áreas estudadas foi a que apresentou comportamento mais distinto e isso se deveu aos baixos valores de pH, MSN e índice de Shannon com influência no CP1, além do baixo NG e elevada média de I/G de maior contribuição no CP3. As áreas de Decumbens 1 e 3, apesar de estarem geograficamente próximas, divergiram muito em seus valores de pH e H+Al, o que foi determinante para a falta de agrupamento entre essas duas áreas, as quais apresentaram comportamento muito semelhante na MSN, com valores muito superior ao observado para as demais áreas.

Tabela 4. Autovalores, variâncias e coeficientes de ponderação obtidos pela análise de componentes principais (CP) das áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE na profundidade de 0-0,2 m.

| | CP1 | CP2 | CP3 | CP4 | CP5 | CP6 | CP7 | CP8 |
|---------------|---------------|---------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Autovalor | 7,40 | 4,26 | 3,52 | 3,21 | 1,86 | 1,30 | 0,87 | 0,58 |
| Variância (%) | 32,19 | 18,51 | 15,30 | 13,96 | 8,09 | 5,65 | 3,77 | 2,54 |
| Areia | -0,593 | -0,394 | -0,255 | -0,481 | 0,203 | -0,386 | 0,009 | 0,078 |
| Silte | 0,073 | -0,901 | -0,188 | -0,088 | -0,124 | 0,301 | 0,054 | 0,176 |
| Argila | 0,492 | 0,623 | 0,281 | 0,443 | -0,136 | 0,244 | -0,027 | -0,126 |
| pH | -0,891 | 0,140 | -0,083 | 0,380 | 0,170 | 0,058 | 0,019 | -0,051 |
| C | 0,513 | -0,262 | -0,037 | 0,212 | -0,501 | -0,461 | -0,113 | -0,382 |
| P | -0,434 | 0,564 | 0,161 | 0,359 | 0,467 | -0,277 | -0,065 | -0,200 |
| K | -0,619 | 0,415 | 0,132 | 0,479 | 0,345 | 0,116 | -0,223 | 0,127 |
| Ca | 0,224 | -0,638 | -0,393 | 0,489 | -0,019 | -0,260 | 0,276 | 0,072 |
| Mg | -0,173 | -0,438 | -0,150 | 0,825 | -0,201 | -0,114 | 0,132 | 0,055 |
| Na | -0,077 | -0,251 | 0,538 | 0,660 | -0,237 | 0,385 | 0,036 | 0,011 |
| Al | 0,708 | 0,214 | 0,246 | -0,553 | -0,047 | 0,140 | -0,192 | 0,166 |
| H+Al | 0,837 | 0,189 | 0,278 | -0,318 | -0,290 | -0,028 | 0,000 | -0,036 |
| MSPA | -0,651 | 0,385 | -0,511 | -0,060 | -0,388 | 0,068 | 0,072 | -0,055 |
| MSSR | -0,557 | 0,579 | -0,312 | 0,009 | -0,315 | -0,243 | -0,012 | 0,315 |
| MSN | -0,742 | 0,364 | -0,340 | -0,116 | -0,396 | 0,173 | 0,039 | 0,021 |
| NN | -0,558 | 0,463 | -0,175 | -0,293 | -0,514 | 0,130 | 0,216 | -0,174 |
| Nlso | -0,665 | -0,263 | 0,133 | -0,529 | 0,309 | -0,016 | 0,124 | -0,283 |
| NG | -0,410 | -0,142 | 0,768 | -0,181 | 0,071 | 0,152 | 0,398 | -0,048 |
| I/G | 0,442 | -0,111 | -0,733 | 0,138 | 0,113 | 0,232 | -0,374 | -0,175 |
| M. I/G | -0,295 | -0,353 | -0,735 | -0,135 | 0,168 | 0,423 | -0,088 | -0,125 |
| Shannon | -0,701 | -0,517 | 0,365 | -0,083 | -0,151 | 0,193 | -0,148 | -0,139 |
| Pielou | -0,691 | -0,285 | 0,416 | -0,050 | -0,265 | -0,189 | -0,389 | 0,089 |
| Simpson | 0,657 | 0,423 | -0,434 | 0,036 | 0,282 | 0,076 | 0,340 | -0,001 |

Nlso = número de isolados; NG = número de grupos; I/G = média de isolados por grupo; M. I/G = máximo de isolados por grupo.

O grupo formado pelo maior número de representantes (Sabiá 2 e 3 e Mata 1 e 2) teve como principal característica determinante para o agrupamento o elevado teor de silte, bem superior ao teor observado para as demais áreas e foram muito parecidas na maioria das características de maior contribuição para os três primeiros componentes principais. Provavelmente estas característica comum a essas áreas seja devido à proximidade geográfica entre as mesmas. Já com relação ao outro grupo, formado pelas áreas de Decumbens 2 e Sabiá 1, estes foram os que apresentaram os menores valores para silte e para o M. I/G, fatores que foram determinantes para diferencia-los das demais áreas estudadas.

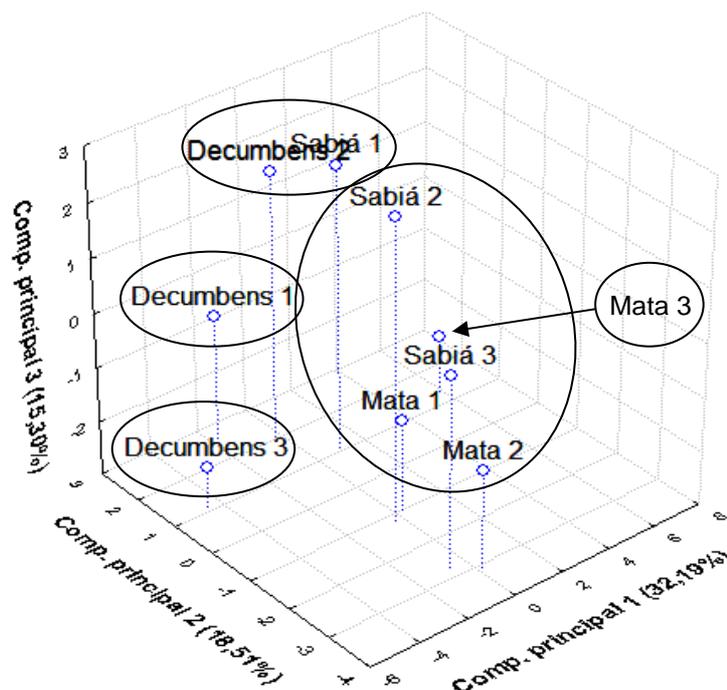


Figura 2. Diagrama tridimensional da análise de componentes principais das características físico-químicas do solo e de isolados rizobianos para as coberturas vegetais das áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE na profundidade de 0-0,2 m.

Na tabela 5 é apresentada a matriz de correlação das variáveis estudadas. Correlações positivas e significativas ($p < 0,05$) foram obtidas para pH e P com o K; para os teores de Ca com Mg; e para Al com H+Al para as características químicas do solo, além de areia com NI.

De maneira geral as características físicas e químicas do solo não variaram muito (Tabela 1), exceção apenas para o pH e para os teores de P e K das áreas de pastagens, os quais foram mais elevados que os valores obtidos nas demais áreas provavelmente devido às calagens e adubações realizadas nessas pastagens, e que podem ter contribuído para os elevados coeficientes de correlação entre essas variáveis.

A relação Ca:Mg do solo no presente estudo ficou próximo de um. Em estudos com diferentes relações Ca:Mg, Silva et al. (2012) verificaram que a relação Ca:Mg de 1:1 foi a que proporcionou maior produção de matéria seca e maiores teores de P, K, Mg, Fe e Zn na matéria seca da parte aérea da soja. Correlações positivas e significativas entre teores de Ca e Mg foram relatadas por Siqueira Neto et al. (2009) em áreas de pastagens, plantio convencional e plantio direto.

Tabela 5. Matriz de correlação linear das características físicas e químicas do solo, da matéria seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), matéria seca (MSN) e número (NN) de nódulos, número de isolados (NI), número de grupos (NG), isolados por grupo (I/G), máximo de isolados em um único grupo (M. I/G) e índices de diversidade de Shannon-Weaver (H'), equitabilidade de Pielou (J) e dominância de Simpson (I_s) dos isolados provenientes de áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE na profundidade de 0-0,2 m.

| | Silte | Argila | pH | C | P | K | Ca | Mg | Na | Al | H+Al | MSPA | MSSR | MSN | NN | NI | NG | I/G | M. I/G | H' | J' | I _s | |
|--------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|----------------|-------|
| Areia | 0,28 | -0,95* | 0,32 | -0,25 | 0,01 | -0,03 | 0,09 | -0,07 | -0,51 | -0,35 | -0,54 | 0,29 | 0,23 | 0,29 | 0,17 | 0,77* | 0,15 | -0,18 | 0,43 | 0,45 | 0,46 | -0,43 | |
| Silte | - | -0,55 | -0,22 | 0,11 | -0,78* | -0,48 | 0,57 | 0,34 | 0,21 | -0,07 | -0,11 | -0,23 | -0,48 | -0,20 | -0,31 | 0,12 | 0,02 | 0,26 | 0,53 | 0,40 | 0,10 | -0,25 | |
| Argila | - | - | -0,21 | 0,18 | 0,24 | 0,17 | -0,26 | -0,05 | 0,37 | 0,33 | 0,50 | -0,18 | -0,05 | -0,19 | -0,05 | -0,70* | -0,13 | 0,08 | -0,53 | -0,51 | -0,43 | 0,45 | |
| pH | - | - | - | -0,50 | 0,66 | 0,84* | -0,09 | 0,38 | 0,22 | -0,84* | -0,91* | 0,60 | 0,52 | 0,64 | 0,40 | 0,41 | 0,24 | -0,26 | 0,28 | 0,48 | 0,45 | -0,42 | |
| C | - | - | - | - | -0,32 | -0,58 | 0,47 | 0,32 | 0,08 | 0,10 | 0,47 | -0,25 | -0,27 | -0,38 | -0,22 | -0,44 | -0,37 | 0,26 | -0,28 | -0,20 | -0,08 | 0,04 | |
| P | - | - | - | - | - | 0,81* | -0,31 | 0,02 | -0,01 | -0,43 | -0,45 | 0,20 | 0,38 | 0,19 | 0,11 | 0,17 | 0,13 | -0,27 | -0,25 | -0,04 | 0,12 | -0,01 | |
| K | - | - | - | - | - | - | -0,31 | 0,20 | 0,29 | -0,52 | -0,66 | 0,32 | 0,45 | 0,39 | 0,14 | 0,11 | 0,16 | -0,22 | -0,02 | 0,21 | 0,33 | -0,24 | |
| Ca | - | - | - | - | - | - | - | 0,78* | 0,17 | -0,42 | -0,19 | -0,21 | -0,28 | -0,35 | -0,47 | -0,28 | -0,33 | 0,35 | 0,23 | -0,11 | -0,21 | 0,13 | |
| Mg | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,60 | -0,73* | -0,47 | 0,05 | 0,00 | -0,01 | -0,21 | -0,29 | -0,11 | 0,09 | 0,10 | 0,21 | 0,17 | -0,22 | |
| Na | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -0,28 | -0,11 | -0,24 | -0,28 | -0,13 | -0,18 | -0,24 | 0,42 | -0,26 | -0,25 | 0,43 | 0,29 | -0,39 | |
| Al | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,88* | -0,47 | -0,32 | -0,43 | -0,20 | -0,29 | -0,10 | 0,10 | -0,34 | -0,43 | -0,35 | 0,36 | |
| H+Al | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -0,48 | -0,36 | -0,50 | -0,18 | -0,48 | -0,12 | 0,07 | -0,53 | -0,51 | -0,42 | 0,41 | |
| MSPA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,83* | 0,97* | 0,88* | 0,20 | -0,15 | -0,01 | 0,40 | 0,14 | 0,19 | -0,13 | |
| MSSR | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,82* | 0,70* | -0,01 | -0,17 | -0,22 | -0,01 | -0,06 | 0,25 | -0,10 | |
| MSN | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,91* | 0,29 | 0,03 | -0,16 | 0,36 | 0,30 | 0,33 | -0,27 | |
| NN | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,30 | 0,16 | -0,29 | 0,14 | 0,21 | 0,21 | -0,17 | |
| NI | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,59 | -0,40 | 0,33 | 0,67 | 0,46 | -0,50 | |
| NG | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -0,85* | -0,32 | 0,62 | 0,45 | -0,50 |
| I/G | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,60 | -0,42 | -0,53 | 0,49 | |
| M. I/G | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,22 | -0,10 | 0,02 | |
| H' | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,84* | -0,92* | |
| J' | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -0,98* | |

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

Correlações positivas também foram obtidas para a MSPA com MSR, MSN e NN; para MSR com MSN e NN; da MSN com NN e para o índice de Shannon com o de Pielou (Tabela 5). Este comportamento ocorreu devido a essas variáveis serem dependentes, pois para que se tenha um incremento na MSPA é preciso que haja contribuição do sistema radicular para a absorção de água e nutrientes, bem como da nodulação para a FBN. Já com relação aos índices de diversidade de Shannon e uniformidade de Pielou, a elevada correlação é explicada pela proporcionalidade do índice de Pielou com a diversidade.

Ainda pela análise da tabela 5, verificam-se correlações negativas e significativas entre areia e argila, silte e P, argila e NI, do pH com AI e H+AI, de Mg com AI, do NG com I/G e dos índices de Shannon e Pielou com o índice de Simpson.

No presente estudo foi obtida uma elevada diversidade entre os isolados, com diferenças de diversidade entre as coberturas vegetais e essa diversidade existente entre os isolados de rizóbios nativos de solos é relatada por diversos autores em estudos realizados em diferentes condições edafoclimáticas (Jesus et al., 2005; Santos et al., 2007; Leite et al., 2009; Lima et al., 2009), havendo a necessidade de estudos mais detalhados para uma melhor diferenciação entre as espécies de rizóbio, bem como, objetivando selecionar futuramente isolados mais eficientes na FBN.

Conclusões

Foi obtida grande diversidade entre os isolados, o que indica a possibilidade de existência de elevada diversidade também para a capacidade de FBN e o calopogônio mostrou-se bem eficiente na nodulação e obtenção de isolados rizobianos, podendo, portanto, ser utilizado em estudos futuros de biodiversidade em outras áreas da região;

As áreas sob bosque de sabiá foram as que apresentaram maior diversidade, sendo interessante estudar futuramente o comportamento desses isolados quanto à capacidade de nodulação e FBN em *Mimosa caesalpinifolia*.

Referências

BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 270-284, 2007.

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

CHANG, Y. L.; WANG, E. T.; SUI, X. H.; ZHANG, X. X.; CHEN, W. X. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Lablab purpureus* (Linn.) grown in Southern China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 276-284, 2011.

COSTA, N. L.; BENDAHAN, A. B.; GIANLUPPI, V.; RIBEIRO, P. S. M.; BRAGA, R. M. Formação e manejo de bancos-de-proteína em Roraima. **Comunicado Técnico - Embrapa**, 2008, 5 p.

DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FUTELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M. D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1277-1290, 1998.

ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I.; UDUPA, S. M. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium melilot* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 1-13, 2010.

ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I.; ZAÏD, E.; UDUPA, S. M. Genotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sllae* by rep-PCR, RAPD and ARDRA analyses. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 975-985, 2009.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, Embrapa Solos/Embrapa Informática Agropecuária/Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2006, 306 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FONTOURA, R. A.; FRIZZO, M. L. S.; SÁ, E. L. S.; OSÓRIO FILHO, B. D.; TONON, B. C.; BINZ, A.; SILVA, M. C.; CAMARGO, F. A. O.; SELBACH, P. A. Rizóbios nativos do Rio Grande do Sul simbioticamente eficientes em *Lotus glaber*. **Ciência Rural**, v. 41, p. 440-446, 2011.

FORMENTINI, E. A.; LÓSS, F. R.; BAYERL, M. P.; LOVATI, R. D.; BAPTISTI, E. **Cartilha sobre adubação verde e compostagem**. INCAPER, 2008, 27 p.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. O.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. 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, p. 1856-1861, 2011.

GUALTE, 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, p. 303-308, 2011.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 1-9, 2001.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.

HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley, California Agricultural Experiment Station, 1950, 32 p.

HUNGRIA, M. **Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios**. In: HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília, Embrapa, p. 45-62, 1994.

IPA - Instituto Agronômico de Pernambuco. **Banco de dados agrometeorológicos**, 1994, 100 p.

JACOMINE, P. K. T.; CAVALCANTI, A. C.; BURGOS, N.; PESSOA, S. C. P.; SILVEIRA, C. O. **Levantamento exploratório - reconhecimento de solos do Estado de Pernambuco**. Boletim Técnico 26 Série Pedologia, 14: Recife, SUDENE, 1973, 359 p.

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

JORDAN, D. C., Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 136-139, 1982.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 32, p. 210-220, 2006.

LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco river valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1215-1226, 2009.

LENZI, A.; CECATO, U.; MACHADO FILHO, L. C. P.; GASPARINO, E.; ROMA, C. F. C.; BARBERO, L. M.; LIMÃO, V. A. Produção e qualidade do pasto de coastcross consorciado ou não com amendoim forrageiro com ou sem aplicação de nitrogênio. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 918-926, 2009.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. D. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation

of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, p. 127-145, 2009.

LORITE, M. J.; MUÑOZ, S.; OLIVARES, J.; SOTO, M. J.; SANJUÁN, J. Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* spp. in saline soils of Granada, Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 4019-4026, 2010.

MAHDHI, M.; FTERICH, A.; REJILI, M.; RODRIGUEZ-LLORENTE, I. D.; MARS, M.; Legume-nodulating bacteria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella maritima* and *Hedysarum spinosissimum*) in Tunisia. **Annals of Microbiology**, v. 62, p. 61-68, 2012.

MARTINS, A. F.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SAMPAIO, J. A. T.; ARAÚJO, J. H. B.; TURCATEL, A. T.; DIEMER, G. D.; SÁ, E. L. S. Diversidade genética, tolerância aos fatores de acidez e eficiência simbiótica de rizóbios para cornichão de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1855-1864, 2011.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do estado do rio grande do norte. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, p. 529-535, 2009.

MELO, R. F.; DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V.; OLIVEIRA, J. A. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 455-465, 2009.

MOREIRA, L. M.; FONSECA, D. M.; VÍTOR, C. M. T.; ASSIS, A. J.; NASCIMENTO JUNIOR, D. D.; RIBEIRO JUNIOR, J. I.; OBEID, J. A. Renovação de pastagem degradada de capim-gordura com a introdução de forrageiras tropicais adubadas com nitrogênio ou em consórcios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 442-453, 2005.

NORRIS, D. O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, v. 22, p. 143-166, 1965.

OLIVEIRA, I. P.; COSTA, K. A. P.; FAQUIN, V.; MACIEL, G. A.; NEVES, B. P.; MACHADO, E. L. Efeitos de fontes de cálcio no desenvolvimento de gramíneas solteiras e consorciadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 592-598, 2009.

PIELOU, E. C. The use of point to plant distances in the study of the pattern of plant populations. **Journal of Ecology [S.I.]**, v. 47, p. 607-613, 1959.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1367-1380, 2007.

RUIZ, H. A. Incremento da exatidão da análise granulométrica do solo por meio da coleta da suspensão (silte + argila). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 297-300, 2005.

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais: *In* FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba, Agrolivros, p. 17-41, 2008.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº13, de 24 de março de 2011**. Diário Oficial da União - Seção 1, Brasília, Imprensa Nacional, p. 3-7, 2011.

SHANNON, C. E. & WEAVER, W. The mathematical theory of communication. **Urbana: University of Illinois Press**, 1949.

SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and Betaproteobacteria

Burkholderia sp.. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 269-274, 2010.

SILVA, G. R.; SENA, W. L.; MATOS, G. S. B.; FERNANDES, A. R.; GAMA, M. A. P. Crescimento e estado nutricional da soja influenciados pela relação Ca:Mg em solo do cerrado paraense. **Revista Ciências Agrárias**, v. 55, p. 52-57, 2012.

SILVA, V. J.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; TEIXEIRA, V. I.; SANTOS, M. V. F.; LIRA, M. A.; MELLO, A. C. L. Características morfológicas e produtivas de leguminosas forrageiras tropicais submetidas a duas frequências de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 97-102, 2010.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, p. 16-21, 2007.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, p. 688, 1949.

SIQUEIRA NETO, M.; PICCOLO, M. C.; SCOPEL, E.; COSTA JUNIOR, C.; CERRI, C. C.; BERNOUX, M. Carbono total e atributos químicos com diferentes usos do solo no Cerrado. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, p. 709-717, 2009.

STATSOFT. Statistica: data analysis software systems. **Tulsa: StatSoft**, 2008.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 201-208, 2010a.

TEIXEIRA, V. I.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; SANTOS, M. V. F.; LIRA JUNIOR, M. A.; LIRA, M. A.; SILVA, H. M. S. Aspectos agronômicos e bromatológicos de leguminosas forrageiras no nordeste brasileiro. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 245-254, 2010b.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVENTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VAN BERKUM, P. & EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1132-1136, 2002.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford, Blackwell, 1970, 164 p.

VINCENT, J. M. Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. In QUISPEL, A. **The biology of nitrogen fixation**. Amsterdam, North-Holland Publishing Company, p. 265-341, 1974.

WEIR, B. S. **The current taxonomy of rhizobia**. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>., Last updated: 10 April, 2012.

CAPÍTULO 2

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS RIZOBIANOS DE CALOPOGÔNIO
DE DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS EM UM SOLO DA ZONA DA
MATA SECA DE PERNAMBUCO**

Eficiência simbiótica de isolados rizobianos de calopogônio de diferentes coberturas vegetais em um solo da Zona da Mata Seca de Pernambuco

Resumo

A fixação biológica do nitrogênio pela simbiose leguminosa-rizóbio é um dos mais importantes mecanismos de disponibilização de N para as plantas e depende muito da eficiência simbiótica da estirpe rizobiana. Diante disto, o presente trabalho objetivou caracterizar simbioticamente isolados rizobianos de calopogônio provenientes de um solo sob pastagens de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*) e áreas de Mata Atlântica da Zona da Mata Seca de Pernambuco. Foram obtidos 1.575 isolados distribuídos em 398 grupos. A autenticação foi realizada para apenas um isolado de cada grupo. O estudo foi em blocos casualizados com duas repetições, em sacos contendo 0,5 kg da mistura areia:vermiculita autoclavada (1:1), recebendo diariamente solução nutritiva de Hoagland sem N. A inoculação foi feita com um mL por planta de caldo bacteriano com população estimada de 10^8 células rizobianas mL^{-1} . Aos 45 dias após a inoculação, as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea, raízes e nódulos, que foram secos em estufa até massa constante e em seguida pesados. Em seguida, o teste de eficiência simbiótica foi montado em blocos casualizados, com duas repetições, em sacos de polietileno contendo 1,5 kg da mistura areia:vermiculita autoclavada (1:1). Os tratamentos foram compostos por 122 isolados selecionados após a autenticação, com base na matéria seca da parte aérea, bem como cinco tratamentos controles (0; 50; 100; 150 e 200 kg ha^{-1} de N), e um tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 6152, recomendada para a cultura. O experimento foi conduzido da mesma forma que o da fase anterior. A matéria seca da parte aérea das plantas, após secagem, foi moída, e os teores de N foram quantificados. O acúmulo médio de matéria seca das plantas inoculadas com os isolados de melhor desempenho não diferiu do tratamento adubado com dose de 150 kg ha^{-1} de N. A matéria seca da parte aérea das plantas se correlacionou positivamente com todas as variáveis analisadas. A maior proporção de isolados eficientes foi obtida com os isolados de bosques de sabiá, mostrando que a diferença na eficiência simbiótica desses isolados pode ser explicada pela cobertura vegetal. Houve grande variação nos valores de matéria seca de nódulos, bem como na concentração e acúmulo de N das plantas, evidenciando uma grande diferença na capacidade simbiótica entre os isolados.

Palavras-Chave: *Calopogonium mucunoides*; eficiência simbiótica; fixação biológica; leguminosas.

Introdução

A área ocupada por pastagens no Brasil é de pouco mais de 172 milhões de hectares, o que representa 49% da utilização das terras no país, sendo a base da alimentação animal para a produção de carne, leite e outros produtos de origem animal (IBGE, 2006). Além disto, devido ao custo de produção comparativamente baixo, a pecuária brasileira é fortemente

competitiva, o que tem levado o país a ser o maior exportador de carnes, passando também de importador a um dos maiores exportadores de leite (Caleman & Cunha, 2011).

Atualmente cerca de 30 milhões de hectares de pastagens encontram-se em algum estágio de degradação, com baixíssima produtividade de biomassa, limitando o consumo animal (MAPA, 2011) e a correta utilização de tecnologias pode reinserir essas áreas ao processo produtivo (Zanine et al., 2005; Zimmer & Barbosa, 2005; Benett et al., 2008).

Geralmente a deficiência de N e P é a principal responsável pelo declínio das pastagens (Boddey et al., 2004), principalmente o N devido às elevadas perdas no sistema solo-planta-animal (Lira et al., 2006). Uma alternativa interessante e que pode contribuir para a incorporação de N a esse sistema é a introdução de leguminosas em consorciação com as pastagens, devido à fixação de N₂ atmosférico (Santos et al., 2005; Herridge et al., 2008; Fontoura et al., 2011).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um dos mais importantes mecanismos de disponibilização de N para as plantas, realizada por microrganismos procariotos denominados diazotróficos, incluindo as bactérias que nodulam as leguminosas (Lima et al., 2009).

Devido à importância econômica e ecológica da simbiose entre rizóbios e leguminosas, a seleção de estirpes rizobianas tem sido intensamente estudada em diversas partes do mundo com diferentes espécies de leguminosas (Lima et al., 2009; Chagas Junior et al., 2010; Freitas et al., 2011; Martins et al., 2011; Rahmani et al., 2011). Maiores acúmulos de matéria seca, e conseqüentemente de N pelas leguminosas, podem ser obtidos através da seleção dessas estirpes mais eficientes na FBN (Antunes et al., 2011; Belay & Assefa, 2011; Rahmani et al., 2011).

Em estudos com três leguminosas forrageiras da Caatinga Paraibana cultivadas em diferentes solos, com e sem adubação, Freitas et al. (2011) verificaram que as leguminosas apresentaram abundante nodulação e elevada FBN, onde a maioria das plantas apresentou valores superiores a 50%, chegando a 85% de eficiência simbiótica. Lima et al. (2009) em estudos com *Macrotillium atropurpureum* em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental também verificaram que a maioria dos isolados proporcionaram fixação do N de forma eficiente e que alguns isolados

possibilitaram acúmulos de N superiores ao tratamento com adubação nitrogenada equivalente a 65 kg ha⁻¹ de N.

O calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) é uma leguminosa promissora para consorciação com gramíneas tropicais devido à sua baixa palatabilidade, e, portanto menor aceitação pelos animais durante o período de máximo crescimento da gramínea, permitindo com isso o acúmulo de biomassa, reprodução e persistência da leguminosa na pastagem (Nunes et al., 2006; Carvalho & Pires, 2008).

Em estudos com diferentes leguminosas forrageiras com potenciais para uso como cobertura do solo na Caatinga Mineira, Teodoro et al. (2011) verificaram que o calopogônio foi uma das leguminosas que conferiu cobertura plena do solo e a de maior capacidade de retenção da umidade e inibição das plantas espontâneas. Os autores relataram que esta leguminosa pode contribuir de forma significativa para o incremento de N e aporte de outros nutrientes, bem como para o incremento de matéria orgânica do solo.

Uma forma de se obter maior diversidade de isolados rizobianos e aumentar as chances de obtenção de isolados mais eficientes simbioticamente é através de coletas de solo em diferentes regiões, sob diferentes coberturas vegetais ou sistemas de cultivo, pois a população bacteriana pode variar em tamanho e diversidade de indivíduos de acordo com o solo, ambiente ou cobertura vegetal. Esta diversidade e eficácia de isolados em função do sistema de cultivo predominante dos diferentes ambientes foram verificadas em diversos estudos (Depret et al., 2004; McInnes et al., 2004; Jesus et al., 2005; Santos et al., 2005; Santos et al., 2007; Elboutahiri et al., 2009; Lima et al., 2009; Elboutahiri et al., 2010; Chang et al., 2011).

Jesus et al. (2005) em estudos de diversidade de isolados rizobianos que nodulam siratro em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental, verificaram que a cobertura vegetal influenciou a diversidade dos isolados e que a maior riqueza e diversidade de bactérias foram obtidas na área sob cultivo de mandioca, não havendo diferença significativa na diversidade das áreas de floresta e de cultivo de pupunheira.

Diferenças na eficiência simbiótica de isolados em função da cobertura vegetal foram obtidas por Santos et al. (2005), em estudos com diferentes isolados rizobianos de diferentes coberturas na cultura do amendoim em um Cambissolo Háplico Tb Eutrófico de Serra Talhada, Pernambuco. Os autores

verificaram que a população rizobiana da cobertura vegetal sob caatinga foi a que proporcionou maior acúmulo de N-total e rendimento de biomassa seca da parte aérea e maior taxa de eficácia das plantas de amendoim, quando comparado à população rizobiana dos solos sob cultivo de leucena, sabiá e amendoim.

Diante do exposto, objetivou-se caracterizar simbioticamente isolados rizobianos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.) provenientes de um solo sob pastagens de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e áreas de Mata Atlântica da Zona da Mata Seca de Pernambuco, em substrato estéril.

Material e Métodos

A coleta de solo foi realizada em Março de 2010, na Estação Experimental de Itambé do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) na Zona da Mata Seca de Pernambuco. A estação é localizada aos 07°25' S, 35°06' W, e 190 m acima do nível do mar, tem precipitação média anual de 1200 mm, temperatura média anual de 24 °C, umidade relativa média do ar de 80% e tipo climático AS', segundo a classificação de Köppen (IPA, 1994). Os solos de referência da região de Itambé são classificados como Argissolo Vermelho-amarelo distrófico, com horizonte A proeminente de textura média/argilosa, fase floresta tropical subcaducifólia e relevo suave ondulado (Jacomine et al., 1973) atualizado de acordo com Embrapa (2006).

As amostras de solo foram coletadas na camada de 0 - 0,2 m de profundidade em áreas de pastagens de capim *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*), e em áreas de Mata Atlântica, com três áreas diferentes sob cada cobertura.

As pastagens de capim *Brachiaria decumbens* foram estabelecidas no fim da década de 1980, sendo pastejadas desde então, os bosques de sabiá, implantados nos anos de 1987 e 1990, enquanto as áreas de mata atlântica têm aproximadamente 60 anos (Lira, 2011 – comunicação pessoal¹).

Uma subamostra do solo de cada área foi conservada em refrigerador a aproximadamente 4 °C até a inoculação das plantas do experimento para obtenção de nódulos. Outra parte das amostras foi peneirada e posteriormente

¹ Lira, Mario de Andrade - Comunicação pessoal baseada na pesquisa desenvolvida na Estação Experimental de Itambé desde o fim da década de 1960 em conversa com a equipe em julho de 2011.

realizaram-se as análises físicas e químicas das mesmas (Tabela 1) segundo metodologia descrita por Ruiz (2005) e pela Embrapa (1999), respectivamente.

Tabela 1. Médias e intervalo de confiança (95%) das características físicas e químicas do solo das áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé - PE utilizado para obtenção de nódulos na profundidade de 0-0,2 m.

| Cobertura vegetal | Características Físicas | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Areia | Silte | Argila | Classe textural | | | | | |
| ----- g kg ⁻¹ ----- | | | | | | | | | |
| Pastagem | 661 ± 42 | 26 ± 18 | 312 ± 60 | Franco argilo arenoso | | | | | |
| <i>B. decumbens</i> | | | | | | | | | |
| Bosque de Sabiá | 657 ± 85 | 55 ± 18 | 288 ± 90 | Franco argilo arenoso | | | | | |
| Mata Atlântica | 647 ± 73 | 55 ± 12 | 297 ± 84 | Franco argilo arenoso | | | | | |
| Características Químicas | | | | | | | | | |
| | pH | C | P | K | Ca | Mg | Na | Al | H+Al |
| | água | g kg ⁻¹ | mg dm ⁻³ | ----- cmol _c dm ⁻³ ----- | | | | | |
| Pastagem | 5,61 ± 0,37 | 5,26 ± 1,49 | 23,33 ± 11,0 | 0,79 ± 0,44 | 2,30 ± 0,28 | 2,35 ± 0,26 | 0,06 ± 0,04 | 0,13 ± 0,14 | 6,27 ± 1,60 |
| <i>B. decumbens</i> | | | | | | | | | |
| Bosque de Sabiá | 5,00 ± 0,38 | 5,38 ± 0,39 | 7,00 ± 0,00 | 0,34 ± 0,28 | 2,38 ± 0,92 | 2,15 ± 0,91 | 0,11 ± 0,16 | 0,53 ± 0,46 | 7,55 ± 1,30 |
| Mata Atlântica | 4,86 ± 0,39 | 6,75 ± 0,80 | 5,67 ± 0,65 | 0,18 ± 0,05 | 3,37 ± 0,45 | 2,67 ± 0,56 | 0,06 ± 0,03 | 0,38 ± 0,41 | 7,55 ± 1,30 |

X±Y, onde X = Médias e Y = Intervalo de Confiança; pH em água (1:2,5); P, K e Na = Mehlich-1; Ca, Mg, e Al = KCl 1 mol L⁻¹(H+Al) = acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ a pH 7,0

Foram obtidos 1.575 isolados de rizóbios em etapas anteriores (Capítulo 1), dos quais 544 isolados de áreas de pastagens de *Brachiaria decumbens*; 666 obtidos em bosques de sabiá e 365 de áreas de Mata Atlântica. Os isolados foram agrupados de acordo com as características morfológicas, resultando em 398 grupos com 100% de similaridade.

Foi feita a autenticação dos isolados em garrafas do tipo “long neck” contendo solução nutritiva de Hoagland sem N (Hoagland & Arnon, 1950), adotando-se o delineamento em blocos casualizados com 2 repetições em casa de vegetação da UFRPE. O experimento foi montado com apenas um isolado aleatoriamente escolhido de cada grupo. Além deste, foram montados outros dois estudos com 20% dos isolados pertencentes a dois grandes grupos formados por 362 e 145 isolados, totalizando 500 isolados para a autenticação.

Sementes de *Calopogonium mucunoides* foram escarificadas quimicamente com H₂SO₄ concentrado por 20 minutos, e lavadas com água destilada por várias vezes (Costa et al., 2008) e, posteriormente, foram imersas em álcool por 10 segundos e desinfestadas com hipoclorito de sódio a 5%, por

cinco minutos, sendo em seguida lavadas com água destilada. As plântulas foram pré-germinadas em placas de Petri com papel toalha por três dias.

Como apenas 10% dos isolados foram autenticados no experimento em garrafas do tipo “long neck”, um novo experimento foi montado para a autenticação, em delineamento em blocos casualizados com duas repetições com os mesmos isolados. Plântulas de calopogônio foram obtidas de forma similar ao ensaio anterior e transplantadas para sacos de polietileno, contendo 0,5 kg da mistura areia:vermiculita autoclavada (1:1) e base em polipropileno, recebendo diariamente solução nutritiva de Hoagland sem N (Hoagland & Arnon, 1950).

Dois dias após o transplântio foi realizada a inoculação das plantas com um mL por planta de caldo bacteriano com população estimada de 10^8 células rizobianas mL⁻¹. Além dos inoculados com os isolados, foram incluídos tratamentos sem inoculação e sem N e outro recebendo solução nutritiva de Hoagland com N, e um controle com a estirpe SEMIA 6152 (=BR1602, *Bradyrhizobium japonicum*, acesso Genbank AY904756, recomendada pela Embrapa Agrobiologia com base em teste em campo) atualmente recomendada para produção de inoculante (Secretaria de Defesa Agropecuária - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2011).

Aos 45 dias após a inoculação, as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea, raízes e nódulos. Posteriormente, foram secos em estufa de ventilação forçada de ar a 65 °C até massa constante, sendo, em seguida pesados.

Para o teste de eficiência simbiótica foi montado um experimento em blocos casualizados, com duas repetições, em sacos de polietileno contendo 1,5 kg da mistura areia:vermiculita autoclavada (1:1) e base em polipropileno. Os tratamentos foram compostos por 122 isolados selecionados na fase anterior, utilizando-se como critério a biomassa seca da parte aérea, cinco tratamentos controles (0; 50; 100; 150 e 200 kg ha⁻¹ de N, calculadas com base na massa de substrato, e em doses equivalentes a 37,5; 75,0; 112,5 e 150,0 mg vaso⁻¹ de N), além de um tratamento inoculado com a SEMIA 6152.

A adubação nitrogenada foi fornecida na forma de nitrato de amônio (NH₄NO₃), parcelada em quatro doses, sendo a primeira fornecida no momento do transplântio e as demais doses aplicadas a cada oito dias.

As plântulas de calopogônio foram obtidas conforme descrito anteriormente, sendo a unidade experimental constituída por três plantas cada. As plantas receberam diariamente solução nutritiva de Hoagland sem N (Hoagland & Arnon, 1950). A inoculação das plantas foi realizada conforme descrito para a fase de autenticação.

Verificou-se a presença de ácaro vermelho (*Tetranychus bastosi*) e tripses (*Retithrips* sp.) no decorrer do período experimental controladas por pulverizações semanais com óleo de Neem a 0,5% (Jesus et al., 2009).

A coleta do experimento ocorreu aos 45 dias após a inoculação das plantas, sendo a matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN) determinados conforme descrito para a fase de autenticação dos isolados.

A MSPA das plantas de calopogônio, após secagem e pesagem, foi passada em moinho tipo Willey com peneira de crivos de 1,0 mm, sendo, posteriormente, quantificada as concentrações de N segundo método descrito por Malavolta et al. (1989).

Foi construída uma curva de regressão com os valores de MSPA dos tratamentos que receberam as doses de N para estimar a dose de N necessária para a produção média de cada tratamento.

A eficiência relativa (ER) foi calculada com base no acúmulo de N da MSPA pela seguinte equação:

$$ER = \left(\frac{\text{Acúmulo de N da MSPA de cada tratamento}}{\text{Acúmulo de N da MSPA da dose } 100 \text{ kg ha}^{-1} \text{ de N}} \right) \times 100$$

Os dados de MSPA, MSSR e MSN, concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na parte aérea, ER e dose de N estimada pela análise de regressão (Dose N) para atingir a produção de MSPA das plantas foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Knott para comparação das médias, sendo os isolados agrupados em cada classe do Scott Knott em função da eficiência simbiótica e cobertura vegetal, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.3 (Ferreira, 2008), tendo-se, posteriormente, calculado o intervalo de confiança a 5% desses isolados de cada classe. Os coeficientes de correlação entre as variáveis estudadas foram calculados pelo Statistica 8.0 (Statsoft, 2008).

Devido à diferença na proporção de isolados eficientes nas diferentes coberturas vegetais, com base na MSPA das plantas, os isolados foram submetidos ao teste de qui-quadrado através do programa estatístico Minitab 16 (Minitab, 2009) para verificar se as diferenças de eficiência simbiótica dos isolados das diferentes coberturas vegetais são significativas.

Resultados e Discussão

O acúmulo de MSPA das plantas de calopogônio aumentou significativamente com as doses de N aplicadas (Figura 1A e B), sendo a dose que proporcionou a máxima eficiência agrônômica de 179 kg ha⁻¹ de N, resultando em acúmulo de MSPA máxima de 3,74 g vaso⁻¹.

Ao analisar a figura 1A percebe-se que houve decréscimo no acúmulo de MSPA das plantas do tratamento com a maior dose de N. Este efeito pode ter ocorrido devido ao desbalanço nutricional, uma vez que tanto a concentração, quanto o acúmulo de N, principalmente, continuaram crescentes com o aumento das doses (Figura 1B), com efeito das doses quadrático para a concentração e linear para o acúmulo de N das plantas, com elevados coeficientes de determinação.

Houve diferença significativa entre os tratamentos inoculados para todas as variáveis analisadas, com exceção da MSSR para os isolados rizobianos, pelo teste Scott Knott ($p < 0,05$) (Tabela 2), demonstrando que os isolados não exerceram influência sobre o crescimento radicular das plantas.

O acúmulo médio de MSPA das plantas inoculadas com os isolados de melhor desempenho não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) da dose de 150 kg ha⁻¹ de N, sendo 4,6 vezes maior que a média dos isolados do grupo de pior desempenho e, 5,1 e 5,4 vezes maior que a produção de MSPA do tratamento sem inoculação e sem N e do tratamento inoculado com a estirpe recomendada, respectivamente (Tabela 2).

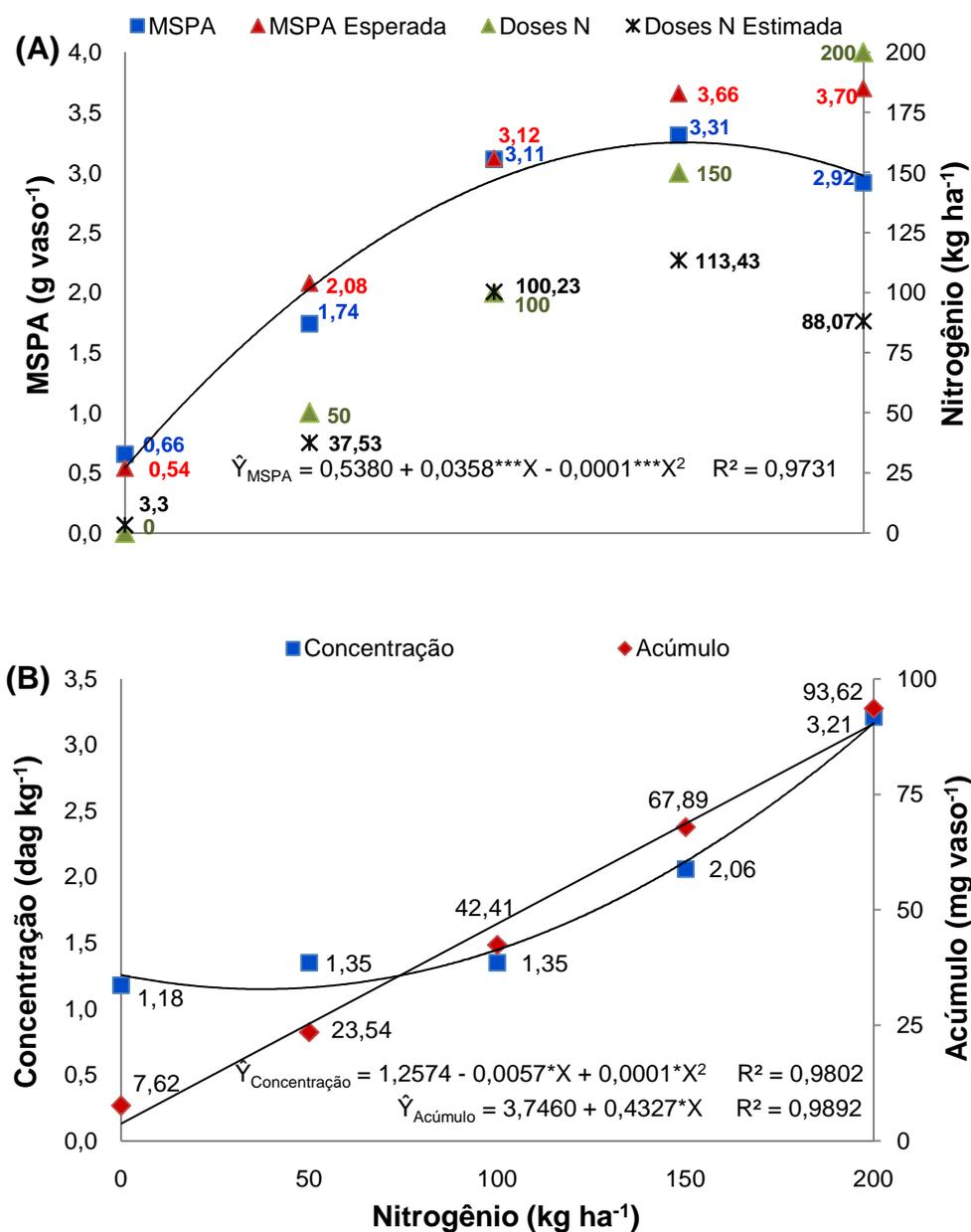


Figura 1. Acúmulo de MSPA das plantas e MSPA esperada (eixo da esquerda), doses de N e doses de N estimada pela equação (eixo da direita) (Figura A) e Concentração e acúmulo de N na parte aérea das plantas de calopogônio em função das doses de N aplicadas (Figura B).

Acúmulos de MSPA de plantas inoculadas com rizóbios nativos semelhantes à MSPA de tratamentos adubados com N também foram verificados por Vargas et al. (2007), em estudos com acácia-negra com substrato esterilizado em casa de vegetação com isolados de cinco municípios do Rio Grande do Sul, e por Belay & Assefa (2011), em pesquisas com diferentes isolados de feijão fava em casa de vegetação na Etiópia.

Tabela 2. Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de nitrogênio na parte aérea, eficiência relativa (ER) e dose de nitrogênio (Dose N) necessária para atingir a produção de MSPA de diferentes isolados rizobianos de calopogônio de áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica.

| Cobertura vegetal | Total de isolados | Classes ⁽¹⁾ Scott Knott | MSPA | MSSR | MSN | CNPA | ANPA | ER ⁽²⁾ | Dose N ⁽³⁾ |
|-------------------|-------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| | | | ----- g vaso ⁻¹ ----- | ----- | mg vaso ⁻¹ | dag kg ⁻¹ | mg vaso ⁻¹ | % | kg ha ⁻¹ |
| Sabiá | 5 | 1 | 3,37a ± 0,20 | 0,44c ± 0,09 | 359,70a ± 44,16 | 2,69a ± 0,22 | 90,88a ± 10,82 | 214,28a ± 25,52 | 125,63a ± 19,74 |
| Decumbens | 1 | | 3,32a ± 0,20 | 0,35c ± 0,05 | 289,00a ± 60,76 | 2,71a ± 0,06 | 90,01a ± 7,39 | 212,24a ± 17,44 | 114,49a ± 15,19 |
| Sabiá | 3 | 2 | 2,86b ± 0,32 | 0,36c ± 0,09 | 240,83b ± 51,31 | 2,61a ± 0,32 | 75,21b ± 14,83 | 177,33b ± 28,56 | 87,72c ± 19,70 |
| Sabiá | 7 | | 2,56c ± 0,12 | 0,35c ± 0,06 | 273,71b ± 42,42 | 2,67a ± 0,17 | 68,70b ± 6,15 | 161,99b ± 14,49 | 70,71d ± 5,69 |
| Decumbens | 1 | 3 | 2,62c ± 0,42 | 0,38c ± 0,16 | 346,00a ± 3,92 | 2,22b ± 0,02 | 58,05b ± 9,80 | 136,88b ± 23,10 | 73,32d ± 19,94 |
| Mata | 1 | | 2,36c ± 0,28 | 0,34c ± 0,31 | 226,50b ± 238,14 | 2,90a ± 0,78 | 68,82b ± 26,51 | 162,28b ± 16,30 | 61,39d ± 12,08 |
| Sabiá | 5 | 4 | 2,03d ± 0,12 | 0,37c ± 0,10 | 192,60b ± 59,00 | 2,33b ± 0,31 | 47,39c ± 7,60 | 111,75c ± 17,92 | 48,20e ± 4,75 |
| Decumbens | 1 | | 1,92d ± 0,28 | 0,28c ± 0,07 | 208,50b ± 59,78 | 2,36b ± 0,15 | 45,32c ± 9,52 | 106,87c ± 22,45 | 43,94e ± 10,52 |
| Mata | 1 | | 2,28d ± 0,38 | 0,29c ± 0,16 | 230,00b ± 186,20 | 2,54a ± 0,81 | 58,62b ± 28,10 | 138,23b ± 20,04 | 58,15d ± 15,81 |
| Sabiá | 10 | 5 | 1,46e ± 0,09 | 0,45c ± 0,08 | 94,35c ± 17,92 | 1,74c ± 0,26 | 26,01d ± 4,67 | 61,33d ± 11,00 | 28,09f ± 2,91 |
| Decumbens | 6 | | 1,49e ± 0,12 | 0,31c ± 0,09 | 142,17c ± 41,58 | 2,28b ± 0,47 | 34,63c ± 8,27 | 81,66c ± 19,49 | 29,11f ± 4,02 |
| Mata | 3 | | 1,55e ± 0,17 | 0,37c ± 0,11 | 123,17c ± 57,05 | 2,00b ± 0,62 | 32,03c ± 12,19 | 75,53c ± 28,75 | 30,92f ± 5,70 |
| Sabiá | 8 | 6 | 1,23f ± 0,11 | 0,49c ± 0,11 | 46,06d ± 25,64 | 1,50c ± 0,28 | 18,74d ± 4,49 | 44,18d ± 10,60 | 20,74g ± 3,35 |
| Decumbens | 6 | | 1,07f ± 0,12 | 0,37c ± 0,08 | 36,67d ± 16,58 | 1,43c ± 0,25 | 15,38d ± 3,40 | 36,25e ± 8,01 | 15,53g ± 3,78 |
| Mata | 1 | | 1,07f ± 0,29 | 0,52c ± 0,42 | 10,50d ± 4,90 | 1,17c ± 0,08 | 12,50d ± 2,56 | 29,49e ± 6,03 | 15,60g ± 9,00 |
| Sabiá | 30 | 7 | 0,74g ± 0,05 | 0,34c ± 0,02 | 30,90d ± 6,95 | 1,41c ± 0,09 | 10,61d ± 1,13 | 25,01e ± 2,68 | 6,03h ± 1,27 |
| Decumbens | 23 | | 0,72g ± 0,06 | 0,32c ± 0,03 | 31,96d ± 12,85 | 1,40c ± 0,12 | 10,18d ± 1,44 | 24,01e ± 3,40 | 5,77h ± 1,57 |
| Mata | 10 | | 0,71g ± 0,09 | 0,35c ± 0,05 | 18,65d ± 6,70 | 1,42c ± 0,17 | 9,86d ± 1,68 | 23,26e ± 3,95 | 5,53h ± 2,25 |
| Semia 6152 | - | - | 0,62g ± 0,14 | 0,34c ± 0,23 | 0,60d ± 0,78 | 1,44c ± 0,01 | 8,90e ± 1,88 | 21,00e ± 4,44 | 2,32h ± 3,88 |
| N zero | - | - | 0,66g ± 0,09 | 0,35c ± 0,08 | - | 1,18c ± 0,59 | 7,62e ± 2,81 | 17,97e ± 6,62 | - |
| N 50 | - | - | 1,74e ± 0,16 | 0,63b ± 0,09 | - | 1,35c ± 0,10 | 23,54d ± 3,81 | 55,50d ± 8,97 | - |
| N100 | - | - | 3,11b ± 0,33 | 0,96a ± 0,24 | - | 1,35c ± 0,47 | 42,41c ± 19,19 | 100,00c ± 36,02 | - |
| N 150 | - | - | 3,31a ± 0,12 | 0,79b ± 0,10 | - | 2,06b ± 0,72 | 67,89b ± 21,40 | 150,07b ± 31,96 | - |
| N 200 | - | - | 2,92b ± 0,05 | 0,49c ± 0,42 | - | 3,21a ± 0,30 | 93,62a ± 7,17 | 220,72a ± 16,91 | - |

Na coluna, médias (duas repetições) seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste Skott Knott. ⁽¹⁾Classes formadas com base na MSPA das plantas das diferentes coberturas. ⁽²⁾Eficiência Relativa = ANPA de cada tratamento/ANPA do tratamento que recebeu a dose de 100 kg ha⁻¹ de N x (100). ⁽³⁾Estimada pela análise de regressão da MSPA das plantas.

Resultados de MSPA de isolados significativamente superiores ao tratamento nitrogenado adubado com $145 \text{ mg planta}^{-1}$ de N foram obtidos por Xavier & Franco (1995), em estudos com isolados de calopogônio provenientes de área de pastagem de capim-gordura em vasos de Leonard em casa de vegetação. Os autores parcelaram a adubação durante o período experimental, sendo a primeira (5 mg planta^{-1} de N) aplicada sete dias após o transplante e as demais ($20 \text{ mg planta}^{-1}$ de N) aplicadas semanalmente até a coleta das plantas. Esta adubação é equivalente a aproximadamente 360 kg ha^{-1} de N, considerando o volume do vaso de Leonard, conforme descrito por Vincent (1970), portanto dose bem superior a de nossos estudos.

Foram formadas sete classes para a eficiência simbiótica dos isolados com base na MSPA das plantas de calopogônio, sendo as quatro primeiras classes consideradas como eficientes por apresentarem valores de MSPA superiores ao obtido pelo tratamento que recebeu adubação de 50 kg ha^{-1} de N. Estas classes foram formadas por vinte representantes de bosques de sabiá, três de pastagem de *B. decumbens* e dois isolados de Mata Atlântica, sendo a classe com melhor desempenho formada por apenas seis isolados, com cinco representantes de bosques de sabiá (UFRPE Cm153; 326; 362; 363, e 556) e um de pastagem de *B. decumbens* (UFRPE Cm799).

A estirpe recomendada (SEMIA 6152) não se mostrou eficiente na FBN, permanecendo no grupo de pior desempenho quanto à produção de MSPA, não diferindo do tratamento sem adubação com N. Este baixo desempenho também foi verificado para a maioria dos isolados avaliados em nossos estudos, o que reforça a necessidade de pesquisas mais detalhadas com rizóbios nativos, mais adaptados às condições edafoclimáticas da região onde se pretenda cultivar a leguminosa (Hungria et al., 2006; Zhang et al., 2007; Suzuki et al., 2008; Chagas Junior et al., 2010; Teixeira et al., 2010; Sarr et al., 2011).

Houve grande variação nos valores de MSN (Tabela 2). O valor médio de MSN obtido pelos isolados de melhor desempenho foi 32 vezes superior à MSN do isolado de menor desempenho para a nodulação ($p < 0,05$) e cerca de 550 vezes superior à estirpe recomendada ($p < 0,05$). Não houve nodulação nos tratamentos não inoculados com ou sem N, demonstrando não ter havido contaminação externa.

Diferenças significativas na MSN também foram verificadas por Fernandes et al. (2003) em estudos de seleção de rizóbios nativos de feijão guandu, feijão caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe, em casa de vegetação, por Vargas et al. (2007) com isolados de cinco municípios do Rio Grande do Sul em acácia-negra e por Antunes et al. (2011) em pesquisas com isolados de feijão-fava em casa de vegetação do IPA.

A maior proporção de isolados eficientes foi obtida com aqueles provenientes de bosques de sabiá (Tabela 3), provavelmente devido à elevada demanda por N desse sistema (Guerra & Teixeira, 1997; Marques et al., 2006; Carvalho & Pires, 2008), mostrando que a diferença na eficiência simbiótica desses isolados pode ser explicada pela cobertura vegetal. Diferentemente das áreas de sabiá, as áreas sob Mata atlântica geralmente possuem uma baixa demanda de N, resultando em menor dependência de simbiose com rizóbios (Martins, 2009), apesar de não ter sido verificada diferença significativa no teor de matéria orgânica entre as diferentes coberturas vegetais estudadas.

Tabela 3. Teste de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para proporção de isolados eficientes de áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica.

| Cobertura vegetal | Eficientes | Não eficientes | Total | Proporção (%) |
|------------------------------|----------------------|----------------|-------|---------------|
| | Observada (Esperada) | | | |
| Pastagem <i>B. decumbens</i> | 3 (7,79) | 35 (30,21) | 38 | 7,89b |
| Bosque de Sabiá | 20 (13,93) | 48 (54,07) | 68 | 29,41a |
| Mata Atlântica | 2 (3,28) | 14 (12,72) | 16 | 12,50ab |
| Total | 25 | 97 | 122 | 20,49 |

Significativo pelo teste t a 5% de probabilidade

Nascimento et al. (2010) também encontraram diferenças no potencial de FBN em função da cobertura vegetal em estudos com isolados nativos de feijão-caupi em diferentes coberturas vegetais. Os isolados mais eficientes foram provenientes de solo de Caatinga e de pastagens, onde 86% dos isolados, em cada cobertura, foram eficientes e a menor proporção de isolados eficientes (36%) foi obtida em área de roçado de mandioca. Resultados semelhantes foram relatados por Santos et al. (2005) em estudos com a cultura do amendoim, onde a cobertura vegetal sob caatinga proporcionou maior acúmulo de N, MSPA e maior taxa de eficácia das plantas, quando comparado com as áreas sob cultivo de leucena, sabiá e amendoim.

Os resultados obtidos por Nascimento et al. (2010) foram bem divergentes dos resultados obtidos no presente estudo, já que a menor proporção de isolados eficientes foi encontrada em pastagens. Vale salientar que esta pesquisa foi realizada com isolados de solos diferentes, provenientes de outras regiões e com outra cultura, sendo estes, fatores determinantes para a obtenção de isolados com comportamento distinto ao da presente pesquisa, quanto à FBN.

A baixa eficiência simbiótica dos isolados provenientes do solo sob pastagem, comparativamente às áreas de bosques de sabiá (Tabela 3), pode estar relacionada com os níveis de matéria orgânica do solo, que podem estar suprindo a demanda de N do calopogônio que tem ocorrência natural nesse ambiente. No entanto as características físicas e químicas do solo sob as diferentes coberturas não variaram muito, exceto os valores de P que foram bem superiores nas áreas de pastagens de *B. decumbens*.

Com relação à CNPA, 18 isolados se destacaram situando-se entre os que proporcionaram maior concentração desse nutriente e foram semelhantes ao tratamento adubado com a dose de 200 kg ha⁻¹ de N (Tabela 2). A concentração média de N proporcionada por esses isolados foi de aproximadamente 84% da concentração obtida pelo tratamento adubado com a maior dose de N.

Para o ANPA, apenas os isolados mais eficientes no acúmulo de MSPA proporcionaram os melhores resultados, diferindo dos demais isolados ($p < 0,05$) (Tabela 2). Esses isolados foram altamente eficientes e proporcionaram um acúmulo médio de N para as plantas de aproximadamente 97% do N acumulado pelo tratamento que recebeu adubação de 200 kg ha⁻¹ de N.

Santos et al. (2005) em estudos com diferentes isolados de amendoim em Serra Talhada, Pernambuco, também obtiveram isolados altamente eficientes no acúmulo de N, com valores superiores ao obtido pelo tratamento com adubação de 100 mg de N por kg solo, adubação equivalente a dose máxima do presente estudo.

Acúmulos de N proporcionado por rizóbios semelhantes ao obtido por tratamentos adubados com N mineral também foram verificados por Fontoura et al. (2011), em estudos com *Lotus glaber* em vasos de Leonard em casa de vegetação no Rio Grande do Sul. Entretanto a dose adotada pelos autores foi de

100 kg ha⁻¹ de N, metade da dose máxima utilizada no presente estudo, o que demonstra a elevada eficiência de nossos isolados.

O acúmulo de MSPA proporcionado pelos isolados mais eficientes simbioticamente correspondeu à dose de N equivalente a 126 e 114 kg ha⁻¹ para os isolados de bosques de sabiá e pastagens de *B. decumbens*, respectivamente (Tabela 2). Estes valores correspondem à adubação nitrogenada máxima recomendada para o estado de Pernambuco (Ipa, 2008), que recomenda adubações de 80 kg ha⁻¹ de N em pastagens de regiões com precipitações pluviométricas de 800 a 1200 mm ano⁻¹ e de 120 kg ha⁻¹ de N em regiões com precipitações superiores a 1200 mm ano⁻¹. Portanto, essas doses de N proporcionadas por esses isolados são superiores à adubação recomendada para a região de Itambé, que tem precipitação média anual de 1200 mm ano⁻¹.

Ao analisar a dose estimada através da análise de regressão para o tratamento adubado com 150 kg ha⁻¹ de N, o qual foi semelhante aos isolados de melhor desempenho ($p > 0,05$), verifica-se que a produção obtida por este tratamento correspondeu a apenas 113 kg ha⁻¹ de N, ou seja, o aproveitamento deste tratamento foi de apenas 76% do N aplicado via adubação. Verificou-se ainda que esta eficiência de aproveitamento do N aplicado via adubação foi de 100% para a dose de 100 kg ha⁻¹ de N e de apenas 44% para a dose de 200 kg ha⁻¹ de N.

A redução na eficiência de aproveitamento do N mineral aplicado deveu-se à queda de rendimento das plantas com as doses mais elevadas de N. Este comportamento ocorreu provavelmente devido a desbalanço nutricional das plantas, uma vez que tanto a CNPA, quanto o ANPA aumentaram significativamente com as doses de N (Figura 1B).

Quedas na eficiência de uso do N também foram obtidas por Sant'Ana et al. (2011), em estudos com doses de N na cultura do feijão em um Latossolo Vermelho distrófico em campo, no Município de Santo Antônio de Goiás. Os autores verificaram que as maiores eficiências agrônômica e fisiológica foram obtidas com a dose de 30 kg ha⁻¹ de N, com queda mais acentuada para eficiência fisiológica com o aumento das doses e obtiveram aproveitamento de aproximadamente 60% da adubação na floração e inferior a 20% na colheita para a dose mais elevada (240 kg ha⁻¹ de N).

Atualmente o quilograma do N está custando em média 2,79 reais (CONAB, 2012). Ao considerarmos as doses de N obtidas pelos isolados de melhor desempenho (126 e 114 kg ha⁻¹ de N) (Tabela 2), a inoculação com esses isolados representaria uma economia com adubação nitrogenada de aproximadamente 352,00 e 318,00 reais, respectivamente, além da substancial contribuição que a FBN proporciona aos ecossistemas agrícolas pela não utilização de fertilizantes nitrogenados que podem ser uma fonte de contaminação para esses ambientes.

A MSPA das plantas se correlacionou positivamente com todas as variáveis analisadas (Tabela 4). No entanto as correlações não foram significativas entre a MSSR e as demais variáveis, sendo significativas com elevados coeficientes de correlação para todas as outras variáveis. A baixa correlação obtida para a MSSR, provavelmente foi devida à pequena variação nos valores de MSSR dos diferentes isolados (Tabela 2).

Tabela 4. Coeficientes de correlação da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de nitrogênio na parte aérea, eficiência relativa (ER) e dose de nitrogênio (Dose N) necessária para atingir a produção de MSPA de diferentes isolados rizobianos de calopogônio de áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica.

| | MSSR | MSN | CNPA | ANPA | ER | Dose N |
|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| MSPA | 0,551 ^{ns} | 0,891* | 0,818* | 0,979* | 0,967* | 0,995* |
| MSSR | - | 0,169 ^{ns} | 0,044 ^{ns} | 0,402 ^{ns} | 0,432 ^{ns} | 0,598 ^{ns} |
| MSN | - | - | 0,911* | 0,934* | 0,879* | 0,857* |
| CNPA | - | - | - | 0,915* | 0,858* | 0,782* |
| ANPA | - | - | - | - | 0,969* | 0,961* |
| ER | - | - | - | - | - | 0,951* |

^{ns} e *: Não significativo e Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

Antunes et al. (2011) também verificaram baixa correlação entre a MSSR e MSPA, MSN, ANPA e ER, em pesquisas com a cultura do feijão-fava. Entretanto, também obtiveram correlações significativas e positivas entre MSPA e MSN, ANPA e ER; MSN e ANPA e ER; e do ANPA com ER. Vale ressaltar que as variáveis, CNPA, ANPA, ER e Dose N são derivadas da MSPA, portanto a correlação entre elas é mais ou menos previsível. Correlações positivas e significativas entre MSPA e MSN também foram obtidas por Fernandes et al. (2003), em estudos com rizóbios nativos nas culturas feijão guandu, feijão caupi e feijão-de-porco em casa de vegetação.

Em pesquisas em casa de vegetação trabalhando com substrato estéril em Pernambuco, com isolados nativos de feijão-caupi provenientes de três municípios do Estado da Paraíba sob Caatinga, pastagem, cultivo de feijão e cultivo de mandioca, Nascimento et al. (2010) também verificaram elevadas correlações entre a MSPA e MSN e entre a ER e o ANPA. Os autores relatam a importância do potencial de FBN dos isolados tanto para a produção de biomassa, quanto para o acúmulo de N pelas plantas.

Alguns isolados se mostraram bem promissores quanto à nodulação e FBN em calopogônio no presente estudo, podendo representar uma excelente alternativa à substituição da adubação nitrogenada em pastagens consorciadas com esta espécie. Portanto estes isolados são de grande interesse para estudos posteriores de inoculação em *C. mucunoides* em solo, objetivando avaliar não só a capacidade simbiótica, como também a competitividade com as estirpes nativas do solo, inclusive em condições de campo, para que esses isolados possam ser recomendados como inoculante.

Conclusões

Há grande variação no potencial simbiótico entre os isolados para as diferentes coberturas vegetais, indicando forte efeito da cobertura vegetal sobre a população rizobiana;

A utilização dos isolados mais eficientes neste estudo como inoculante para a cultura do calopogônio em pastagens, pode contribuir grandemente para o fornecimento de N para a gramínea, além de reduzir os custos com adubação nitrogenada.

Referências

ANTUNES, J. E. L.; GOMES, E. 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, p. 751-757, 2011.

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

BENETT, C. G. S.; YAMASHITA, O. M.; KOGA, P. S.; SILVA, K. S. Resposta da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu a diferentes tipos de adubação. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 6, p. 13-20, 2008.

BODDEY, R. M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R. M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O. C.; REZENDE, C. P.; CANTARUTTI, R. B.; PEREIRA, J. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: The key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 103, p. 389-403, 2004.

CALEMAN, S. M. Q. & CUNHA, C. F. Estrutura e conduta da agroindústria exportadora de carne bovina no Brasil. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 13, p. 93-108, 2011.

CARVALHO, G. G. P. & PIRES, A. J. V. Leguminosas tropicais herbáceas em associação com pastagens. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, p. 103-113, 2008.

CHAGAS JUNIOR, 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, p. 161-169, 2010.

CHANG, Y. L.; WANG, E. T.; SUI, X. H.; ZHANG, X. X.; CHEN, W. X. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Lablab purpureus* (Linn.) grown in Southern China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 276-284, 2011.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Insumos Agropecuários**. Disponível em: <http://consultaweb.conab.gov.br/consultas/consultainsumo>. Acesso em: 25 de Outubro de 2012.

COSTA, N. L.; BENDAHAN, A. B.; GIANLUPPI, V.; RIBEIRO, P. S. M.; BRAGA, R. M. Formação e manejo de bancos-de-proteína em Roraima. **Comunicado Técnico - Embrapa**, 2008, 5 p.

DEPRET, G.; HOUOT, S.; ALLARD, M. R.; BREUIL, M. C.; NOUAÏM, R.; LAGUERRE, G. Long-term effects of crop management on *Rhizobium*

leguminosarum biovar viciae populations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 87-97, 2004.

ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I.; UDUPA, S. M. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium melilot* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 1-13, 2010.

ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I.; ZAÏD, E.; UDUPA, S. M. Genotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sllae* by rep-PCR, RAPD and ARDRA analyses. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 975-985, 2009.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, Embrapa Solos/Embrapa Informática Agropecuária/Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2006, 306 p.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 835-842, 2003.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FONTOURA, R. A.; FRIZZO, M. L. S.; SÁ, E. L. S.; OSÓRIO FILHO, B. D.; TONON, B. C.; BINZ, A.; SILVA, M. C.; CAMARGO, F. A. O.; SELBACH, P. A. Rizóbios nativos do Rio Grande do Sul simbioticamente eficientes em *Lotus glaber*. **Ciência Rural**, v. 41, p. 440-446, 2011.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. O.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. 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, p. 1856-1861, 2011.

GUERRA, J. G. M. & TEIXEIRA, M. G. Avaliação inicial de algumas leguminosas herbáceas perenes para utilização como cobertura viva permanente de solo. **Comunicado Técnico - Embrapa**, p. 1-7, 1997.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.

HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley, California Agricultural Experiment Station, 1950, 32 p.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MEGÍAS, M.; LAMRABET, Y.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, v. 288, p. 343-356, 2006.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agrpecuário**. 2006, 141 p.

IPA - Instituto Agrônômico de Pernambuco. **Banco de dados agrometereológicos**, 1994, 100 p.

IPA - Instituto Agrônômico de Pernambuco. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2ª aproximação**. Recife, 2008, 212 p.

JACOMINE, P. K. T.; CAVALCANTI, A. C.; BURGOS, N.; PESSOA, S. C. P.; SILVEIRA, C. O. **Levantamento exploratório - reconhecimento de solos do Estado de Pernambuco**. Boletim Técnico 26 Série Pedologia, 14: Recife, SUDENE, 1973, 359 p.

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

JESUS, F. G.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; JANINI, J. C.; SILVA, A. G.; CARBONEL, S. A. M.; CHIORATO, A. F. Interação de variedades, óleo de nim e inseticida no controle de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotipo B (Hemiptera:Aleyrodidae) e

Caliothrips phaseoli (Hood) (Thysanoptera:Thripidae) na cultura do feijoeiro. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v. 35, p. 491-500, 2009.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. D. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, p. 127-145, 2009.

LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; LIRA JUNIOR, M. A.; MELLO, A. C. L. Sistemas de produção de forragem: alternativas para sustentabilidade da pecuária. **Anais de Simpósios da 43ª Reunião Anual da SBZ** - João Pessoa - PB, p. 405-423, 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989, 201 p.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Recuperação de áreas degradadas**. programa ABC, 2011.

MARQUES, V. B.; PAIVA, H. N.; GOMES, J. M.; NEVES, J. C. L. Efeitos de fontes e doses de nitrogênio no crescimento de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). **Scientia Forestalis**, p. 77-85, 2006.

MARTINS, A. F.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SAMPAIO, J. A. T.; ARAÚJO, J. H. B.; TURCATEL, A. T.; DIEMER, G. D.; SÁ, E. L. S. Diversidade genética, tolerância aos fatores de acidez e eficiência simbiótica de rizóbios para cornichão de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1855-1864, 2011.

MARTINS, M. V. **leguminosas arbustivas e arbóreas de fragmentos florestais remanescentes no noroeste paulista**. Brasil, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu - SP, 2009, 161 p.

MCINNES, A.; THIES, J. E.; ABBOTT, L. K.; HOWIESON, J. G. Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities - A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1295-1308, 2004.

MINITAB. Minitab for windows release 16, State College. **Minitab Inc**, 2009.

NASCIMENTO, L. R. S.; SOUSA, C. A.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SAMPAIO, E. V. S. B. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, p. 36-42, 2010.

NUNES, U. R.; ANDRADE JUNIOR, V. C.; SILVA, E. D. B.; SANTOS, N. F.; COSTA, H. A. O.; FERREIRA, C. A. Produção de palhada de plantas de cobertura e rendimento do feijão em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 943-948, 2006.

RAHMANI, H. A.; RÄSÄNEN, L. A.; AFSHARI, 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.

RUIZ, H. A. Incremento da exatidão da análise granulométrica do solo por meio da coleta da suspensão (silte + argila). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 297-300, 2005.

SANT'ANA, E. V. P.; SANTOS, A. B.; SILVEIRA, P. M. Eficiência de uso de nitrogênio em cobertura pelo feijoeiro irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 458-462, 2011.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SOUTO, S. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 27, p. 301-307, 2005.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SARR, P. S.; YAMAKAWA, T.; SAEKI, Y.; GUISSSE, A. Phylogenetic diversity of indigenous cowpea bradyrhizobia from soils in Japan based on sequence

analysis of the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) region. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 285-292, 2011.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº13, de 24 de março de 2011**. Diário Oficial da União - Seção 1, Brasília, Imprensa Nacional, p. 3-7, 2011.

STATSOFT. Statistica: data analysis software systems. **Tulsa: StatSoft**, 2008.

SUZUKI, K.; OGURO, H.; YAMAKAWA, T.; YAMAMOTO, A.; AKAO, S.; SAEKI, Y. Diversity and distribution of indigenous soybean-nodulating rhizobia in the Okinawa islands, Japan. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, p. 237-246, 2008.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 201-208, 2010.

TEODORO, R. B.; OLIVEIRA, F. L.; SILVA, D. M. N.; FÁVERO, C.; QUARESMA, M. A. L. Leguminosas herbáceas perenes para utilização como coberturas permanentes de solo na Caatinga Mineira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 292-300, 2011.

VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J. R. P.; JUNG, G. C.; GRANADA, C. E.; NEVES, A. G.; BRAGA, M. M.; NEGREIROS, T. Diversidade genética e eficiência simbiótica de rizóbios noduladores de acácia-negra de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 647-654, 2007.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford, Blackwell, 1970, 164 p.

XAVIER, D. P. & FRANCO, A. A. Eficiência de estirpes nativas de rizóbios em *Calopogonium mucunoides*. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 24, p. 214-221, 1995.

ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M.; FERREIRA, D. J. Possíveis causas da degradação de pastagens. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 6, p. 1-23, 2005.

ZHANG, W. T.; YANG, J. K.; YUAN, T. Y.; ZHOU, J. C. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 201-210, 2007.

ZIMMER, A. H. & BARBOSA, R. A. Manejo de pastagens para produção sustentável, **Anais do ZOOTEC'2005**, Campo Grande - MS, 2005, 33 p.

CAPÍTULO 3

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E COMPETITIVIDADE DE RIZÓBIOS DE CALOPOGÔNIO DE TRÊS COBERTURAS VEGETAIS EM UM ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO DA ZONA DA MATA SECA DE PERNAMBUCO

Eficiência simbiótica e competitividade de rizóbios de calopogônio de três coberturas vegetais em um Argissolo Vermelho-Amarelo da Zona da Mata Seca de Pernambuco

Resumo

A fixação biológica do nitrogênio pela simbiose leguminosa-rizóbio é um dos mais importantes mecanismos de disponibilização de N para as plantas, sendo a seleção de estirpes altamente eficientes e adaptadas ao ambiente muito importante para o sucesso da inoculação. Diante disto, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes coberturas vegetais na eficiência simbiótica de isolados rizobianos de calopogônio em um Argissolo Vermelho-Amarelo. As amostras de solo foram coletadas na camada de 0 - 0,2 m de profundidade em áreas de pastagens de capim *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*), e em áreas de Mata Atlântica, com três áreas diferentes sob cada cobertura, todas em um mesmo solo. Dos 1.575 isolados foram selecionados 25 isolados considerados eficientes em fases anteriores. Foi conduzido um experimento em blocos casualizados, com quatro repetições, em sacos de polietileno contendo 2,5 kg de solo com base em polipropileno. Os tratamentos foram compostos pelos 25 isolados selecionados, cinco tratamentos controles (0; 30; 60; 90 e 120 kg ha⁻¹ de N), além de um tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 6152. A inoculação das plantas foi feita com um mL por planta de caldo bacteriano com população estimada de 10⁸ células rizobianas mL⁻¹. O primeiro corte foi realizado 45 dias após a inoculação das plantas, sendo o segundo e o terceiro cortes realizados 45 dias após cada corte das plantas. A matéria seca da parte aérea das plantas, após secagem, foi moída, e os teores de N foram quantificados apenas para o primeiro corte. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Knott para comparação das médias e teste de correlação. A matéria seca da parte aérea foi influenciada pelas doses de N aplicadas ao solo em todos os cortes. No segundo corte, verificou-se aumento no acúmulo de matéria seca da parte aérea dos isolados, comparativamente ao primeiro corte. Não foi verificado efeito da cobertura vegetal em nenhuma das variáveis estudadas em todos os cortes. No segundo corte foram obtidas maiores respostas dos isolados, comparativamente ao primeiro corte e alguns isolados se destacaram proporcionando incrementos na dose de N superior aos tratamentos adubados. O menor desempenho das plantas no terceiro corte deveu-se ao florescimento precoce das plantas logo após o segundo corte. Houve correlação positiva e significativa para as maiorias das variáveis estudadas em todos os cortes.

Palavras-Chave: *Calopogonium mucunoides*, eficiência simbiótica; fixação biológica; leguminosas.

Introdução

O calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) é uma leguminosa forrageira pertencente à subfamília Papilionoidea, nativa da América do Sul, com potencial para uso em condições tropicais úmidas, e sendo encontrada de

forma nativa ou naturalizada na zona da mata de Pernambuco (Souza et al., 2007; Teixeira, 2008).

A utilização de leguminosas forrageiras em sistema de consórcio com gramíneas permite a substituição total ou parcial da adubação nitrogenada, por poder suprir a cultura com o N necessário e reduzir os gastos com fertilizantes nitrogenados. Estes geralmente possuem custo elevado, e quando em falta, são um dos principais responsáveis pela baixa produtividade das pastagens (Lira et al., 2006; Carvalho & Pires, 2008).

Além disto, leguminosas em consórcio nas pastagens proporcionam melhorias na oferta de forragem ao longo do ano, na qualidade nutricional das pastagens, aumentos na produtividade animal, contribuição para a diminuição da degradação dos solos sob pastagens, entre outras (Carvalho & Pires, 2008).

Segundo Herridge et al. (2008), estima-se que as leguminosas forrageiras em pastagens fixem de 110 a 227 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N. Ainda segundo os autores multiplicando-se esses valores pela área global com leguminosas forrageiras, estimada em 110 Mha, o total de N fixado anualmente varia de 12 a 25 milhões de toneladas.

Maiores acúmulos de matéria seca, e conseqüentemente de N pelas leguminosas, podem ser obtidos através da seleção de estirpes de rizóbios mais eficientes na fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Antunes et al., 2011; Belay & Assefa, 2011; Rahmani et al., 2011)

Para a seleção de estirpes de rizóbios eficientes na FBN é preciso a realização de várias etapas, como a coleta de solo na área a ser estudada e/ou de nódulos de plantas da espécie crescendo em seu habitat natural; o isolamento, purificação e caracterização das bactérias; a verificação da capacidade de nodulação da espécie; a avaliação da eficiência simbiótica em vasos com substratos esterilizados e em solo não esterilizado em condições controladas; e por fim, a avaliação das estirpes selecionadas em condições de campo (Jesus et al., 2005; Santos et al., 2007; Lima et al., 2009; Chagas Junior et al., 2010a; Rufini et al., 2011).

Chagas Junior et al. (2010a) em estudos com diferentes isolados de feijão-caupi em um solo coletado no Ramal do Brasileirinho, Manaus, Estado do Amazonas, verificaram que todos os isolados aumentaram o acúmulo de matéria seca da parte aérea das plantas de forma significativa, comparativamente à testemunha sem N. Os autores verificaram ainda que a

maioria dos isolados proporcionou acúmulo de matéria seca semelhante ao tratamento adubado e às estirpes referência e apresentaram os maiores acúmulos de N, não diferindo apenas do tratamento com N mineral.

Em estudos com calopogônio em um Latossolo Vermelho-Amarelo com diferentes isolados em casa de vegetação, Xavier & Franco (1995) também verificaram diferenças no acúmulo de matéria seca das plantas, onde alguns isolados proporcionaram produção superior aos tratamentos controles com e sem N, no entanto não diferiram da estirpe padrão utilizada no estudo.

Em áreas onde os isolados nativos são pouco eficientes na FBN, a seleção de isolados altamente eficientes e adaptados ao ambiente, para posteriormente serem utilizados como inoculantes, é de suma importância (Chagas Junior et al., 2010a; Chagas Junior et al., 2010b). Segundo Souza et al. (2008), em solos com baixos teores de N e na ausência de fertilizantes nitrogenados, a avaliação da matéria seca da parte aérea representa um forte indicativo do estado nutricional das plantas em relação a este nutriente.

Santos et al. (2005) em estudos com diferentes isolados de amendoim em um Cambissolo Háplico Tb Eutrófico, do município de Serra Talhada, Pernambuco, obtiveram grande variação no acúmulo de MSPA das plantas e verificaram que houveram comportamentos diferentes dos isolados com relação às cultivares e às coberturas estudadas.

Os autores também verificaram que a MSPA do tratamento sem adubação e sem inoculação foi muito inferior aos demais tratamentos e atribuíram esse comportamento ao baixo teor de N do solo utilizado. Segundo os autores, esta característica do solo pode ter favorecido a atuação dos rizóbios e da adubação mineral, proporcionando consideráveis aumentos no acúmulo de matéria seca das plantas de amendoim.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a eficiência simbiótica e competitividade de isolados rizobianos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.) provenientes de solos com pastagens de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*) e áreas de Mata Atlântica, em um Argissolo Vermelho-Amarelo de Pernambuco.

Material e métodos

A coleta de solo foi realizada em Março de 2010, na Estação Experimental de Itambé do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) na Zona

da Mata Seca de Pernambuco. A estação é localizada aos 07°25' S, 35°06' W, e 190 m acima do nível do mar, tem precipitação média anual de 1200 mm, temperatura média anual de 24 °C e a umidade relativa média do ar de 80% e tipo climático é AS', segundo a classificação de Köppen (IPA, 1994). Os solos de referência da região de Itambé são classificados como Argissolos Vermelho-amarelo distrófico, com horizonte A proeminente de textura média/argilosa, fase floresta tropical subcaducifólia e relevo suave ondulado (Jacomine et al., 1973) atualizado de acordo com Embrapa (2006).

As amostras de solo foram coletadas na camada de 0 - 0,2 m de profundidade em áreas de pastagens de capim *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*), e em áreas de Mata Atlântica, com três áreas diferentes sob cada cobertura.

As pastagens de capim *Brachiaria decumbens* foram estabelecidas no fim da década de 1980, sendo pastejadas desde então, enquanto os bosques de sabiá foram implantados nos anos de 1987 e 1990 e as áreas de Mata Atlântica têm aproximadamente 60 anos (Lira, 2011 – comunicação pessoal¹).

Uma subamostra do solo de cada área foi conservada em refrigerador a aproximadamente 4 °C até a inoculação das plantas do experimento para obtenção de nódulos. Outra parte das amostras foi peneirada e posteriormente realizaram-se as análises físicas e químicas das mesmas (Tabela 1) segundo metodologia descrita por Ruiz (2005) e pela Embrapa (1999), respectivamente.

Após a autenticação e estudo de eficiência simbiótica dos isolados, foram selecionados 25 isolados considerados eficientes, que apresentaram biomassa seca da parte aérea superiores à dose de 50 kg ha⁻¹ de N pelo teste Scott Knott ($p < 0,05$). Para o estudo de eficiência em solo dos isolados foi conduzido um experimento em blocos casualizados, com quatro repetições, em sacos de polietileno contendo 2,5 kg de solo tendo como base polipropileno.

Foi utilizado um Argissolo Vermelho-Amarelo da estação experimental de Itambé, cujas características físicas e químicas encontram-se na tabela 1. Os tratamentos foram compostos pelos 25 isolados selecionados anteriormente, cinco tratamentos não inoculados com 0; 30; 60; 90 e 120 kg ha⁻¹ de N, além de um tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 6152 (=BR1602,

¹ Lira, Mario de Andrade - Comunicação pessoal baseada na pesquisa desenvolvida na Estação Experimental de Itambé desde o fim da década de 1960 em conversa com a equipe em julho de 2011.

Bradyrhizobium japonicum, acesso Genbank AY904756, recomendada pela Embrapa Agrobiologia com base em teste em campo) atualmente recomendada para produção de inoculante (Secretaria de Defesa Agropecuária - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2011).

Tabela 1. Médias e intervalo de confiança (95%) das características físicas e químicas do solo das áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica do Município de Itambé utilizado para obtenção de nódulos na profundidade de 0-0,2 m e do solo utilizado no experimento.

| Cobertura vegetal | Características Físicas | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Areia | Silte | Argila | Classe textural | | | | | |
| | ----- g kg ⁻¹ ----- | | | | | | | | |
| Pastagem | 661 ± 42 | 26 ± 18 | 312 ± 60 | Franco argilo arenoso | | | | | |
| <i>B. decumbens</i> | | | | | | | | | |
| Bosque de Sabiá | 657 ± 85 | 55 ± 18 | 288 ± 90 | Franco argilo arenoso | | | | | |
| Mata Atlântica | 647 ± 73 | 55 ± 12 | 297 ± 84 | Franco argilo arenoso | | | | | |
| Solo utilizado no Estudo | 645 | 25 | 330 | Franco argilo arenoso | | | | | |
| | Características Químicas | | | | | | | | |
| | pH | C | P | K | Ca | Mg | Na | Al | H+Al |
| | água | g kg ⁻¹ | mg dm ⁻³ | ----- cmol _c dm ⁻³ ----- | | | | | |
| Pastagem | 5,61 ± | 5,26 ± | 23,33 ± | 0,79 ± | 2,30 ± | 2,35 ± | 0,06 ± | 0,13 ± | 6,27 ± |
| <i>B. decumbens</i> | 0,37 | 1,49 | 11,0 | 0,44 | 0,28 | 0,26 | 0,04 | 0,14 | 1,60 |
| Bosque de Sabiá | 5,00 ± | 5,38 ± | 7,00 ± | 0,34 ± | 2,38 ± | 2,15 ± | 0,11 ± | 0,53 ± | 7,55 ± |
| Mata Atlântica | 0,38 | 0,39 | 0,00 | 0,28 | 0,92 | 0,91 | 0,16 | 0,46 | 1,30 |
| Solo utilizado no Estudo | 4,86 ± | 6,75 ± | 5,67 ± | 0,18 ± | 3,37 ± | 2,67 ± | 0,06 ± | 0,38 ± | 7,55 ± |
| | 0,39 | 0,80 | 0,65 | 0,05 | 0,45 | 0,56 | 0,03 | 0,41 | 1,30 |
| | 4,50 | 16,49 | 3,07 | 0,25 | 1,50 | 1,00 | 0,05 | 0,85 | 6,41 |

X±Y, onde X = Médias e Y = Intervalo de Confiança; pH em água (1:2,5); P, K e Na = Mehlich-1; Ca, Mg, e Al = KCl 1 mol L⁻¹(H+Al) = acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ a pH 7,0

A adubação nitrogenada foi fornecida na forma de nitrato de amônio (NH₄NO₃), aplicando-se 1/3 da dose 15 dias após o transplante e as demais doses sendo aplicadas a cada corte. As doses foram calculadas com base na massa do solo do saco (2,5 kg de solo) obtendo-se as quantidades de N para cada dose, as quais corresponderam a 37,5; 75,0; 112,5 e 150,0 mg vaso⁻¹ de N para as doses 30; 60; 90 e 120 kg ha⁻¹ de N, respectivamente, tendo-se aplicado 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0 mg vaso⁻¹ de N em cada ciclo de cultivo.

A correção do solo foi feita pela saturação por bases, corrigindo-se para 70%. Foi aplicado 4,56 g vaso⁻¹ de CaCO₃, correspondendo à calagem de 3,65 t ha⁻¹, vinte dias antes do plantio. Realizou-se ainda, adubação fosfatada e potássica, aplicando-se 125 e 100 mg vaso⁻¹ de P₂O₅ e K₂O no plantio e 75 e 62,5 mg vaso⁻¹ de P₂O₅ e K₂O a cada corte para fósforo e potássio,

respectivamente segundo IPA (2008). Os demais nutrientes foram fornecidos através de uma aplicação de solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), tendo-se aplicado 28,8; 40,3; 3,0; 0,3; 0,3; 0,03; 0,01; 0,01; mg vaso⁻¹ de Mg, S, Fe, Mn, B, Zn, Cu e Mo, respectivamente, fornecidos apenas no início do experimento.

Sementes de *Calopogonium mucunoides* foram escarificadas quimicamente com H₂SO₄ concentrado por 20 minutos, e lavadas com água destilada por várias vezes (Costa et al., 2008) e posteriormente desinfestadas com hipoclorito de sódio, por cinco minutos, e lavadas com água destilada. As plântulas foram pré-germinadas em placas de Petri com papel toalha por três dias. Posteriormente foram transplantadas para sacos de polietileno, colocando-se três plântulas por saco. Dois dias após o transplante foi realizada a inoculação das plantas com um mL por planta de caldo bacteriano com população estimada de 10⁸ células rizobianas mL⁻¹. A umidade do solo foi mantida próxima a capacidade de campo, com a reposição de água da torneira sendo realizada sempre que necessário.

Verificou-se a presença de ácaro vermelho (*Tetranychus bastosi*) e tripses (*Retithrips* sp.) no decorrer do período experimental sendo realizadas pulverizações semanais com óleo de Neem a 0,5% (Jesus et al., 2009).

O primeiro corte foi realizado 45 dias após a inoculação, sendo o segundo e terceiro cortes realizados 45 dias após o primeiro e segundo cortes, respectivamente. A massa seca da parte aérea das plantas (MSPA) foi seca em estufa de ventilação forçada de ar a 65 °C até massa constante, sendo, em seguida pesada em balança de precisão. A MSPA de cada planta foi moída em moinho tipo Willey com peneira de crivos de 1,0 mm, sendo, posteriormente, quantificado os teores de N segundo métodos descritos por Malavolta et al. (1989).

Foi construída uma curva de regressão com os valores de MSPA e outra para a concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na parte aérea das plantas dos tratamentos que receberam as doses de N para estimar, com base na MSPA das plantas, a dose de N necessária para a produção média da MSPA de cada tratamento e as doses que proporcionaram a maior CNPA e o maior ANPA.

A eficiência relativa (ER) foi calculada com base no acúmulo de N da MSPA pela seguinte equação:

$$ER = \left(\frac{\text{Acúmulo de N da MSPA de cada tratamento}}{\text{Acúmulo de N da MSPA da dose } 100 \text{ kg ha}^{-1} \text{ de N}} \right) \times 100$$

Os dados de MSPA, matéria seca do sistema radicular (MSSR), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N da parte aérea, ER e as doses estimadas pela análise de regressão (Dose N) foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Knott para comparação das médias, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.3 (Ferreira, 2008). Os coeficientes de correlação entre as variáveis estudadas foram calculados pelo programa estatístico Statistica 8.0 (Statsoft, 2008).

Resultados e discussão

A MSPA das plantas foi influenciada pelas doses de N aplicadas ao solo nos três cortes. A dose que proporcionou o máximo acúmulo de MSPA foi 137,5; 82,0 e 98,0 kg ha⁻¹ de N no primeiro, segundo e terceiro cortes, respectivamente, sendo o acúmulo máximo de 1,68 g planta⁻¹ no primeiro, 1,78 g planta⁻¹ no segundo e 1,92 g planta⁻¹ no terceiro corte (Figura 1).

Verificou-se aumento no acúmulo de MSPA para a maioria dos tratamentos no segundo corte. No entanto esse comportamento foi menos expressivo no terceiro corte (Tabela 2). Este aumento na MSPA no segundo corte, provavelmente seja devido à decomposição da matéria orgânica do solo (Buso & Kliemann, 2003), uma vez que também houve aumento no tratamento sem adubação nitrogenada. Entretanto esse aumento foi desprezível nas doses mais elevadas de N, o que indica que o N fornecido via adubação supriu a demanda das plantas, não havendo efeito da decomposição da matéria orgânica sobre esses tratamentos.

Observa-se que o teor de carbono orgânico do solo foi relativamente alto (16,49 g kg⁻¹), o que representa aproximadamente 28,5 g kg⁻¹ de matéria orgânica. Este teor de matéria orgânica do solo em estudo é bem próximo ao teor considerado como elevado (> 30 g kg⁻¹), para os solos do Estado de Pernambuco (Luz et al., 2002). Verifica-se ainda, que esse valor de carbono orgânico foi bem superior ao observado para o mesmo solo no período da

coleta para isolamento das bactérias e que o mesmo apresentou pH e teor de P inferior ao que foi obtido anteriormente (Tabela 1).

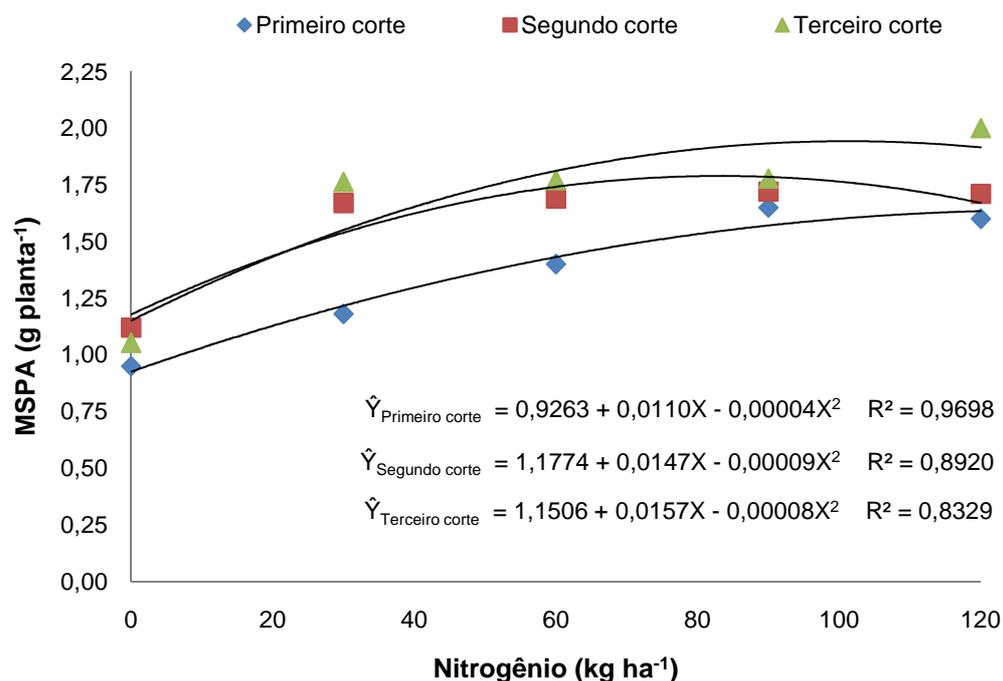


Figura 1. Acúmulo de matéria seca na parte aérea das plantas de calopogônio em função das doses de N aplicadas ao solo.

Houve diferença significativa entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas pelo teste Scott Knott ($p < 0,05$) no primeiro corte (Tabela 3) e apenas o isolado UFRPE Cm243 se destacou, proporcionando maior MSPA das plantas, não diferindo ($p > 0,05$) dos tratamentos adubados com 60; 90 e 120 kg ha⁻¹ de N e foi 1,22 e 1,38 vezes superior na produção de MSPA em relação à estirpe recomendada e ao tratamento sem N e sem inoculação, respectivamente.

Martins et al. (2011) avaliando a eficiência simbiótica de isolados rizobianos de cornichão em um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico típico, também obtiveram acúmulo de MSPA superior ao obtido pelas estirpes recomendadas para a cultura.

Tabela 2. Valores médios de matéria seca da parte aérea (g planta⁻¹) de diferentes isolados rizobianos de calopogônio nos primeiro, segundo e terceiro cortes.

| Tratamentos | Cortes | | |
|--------------|--------|--------|--------|
| | 1º | 2º | 3º |
| UFRPE Cm72 | 0,99Bb | 1,49Aa | 1,74Aa |
| UFRPE Cm81 | 1,19Bb | 1,11Bb | 1,43Aa |
| UFRPE Cm88 | 1,09Ba | 1,10Ba | 0,78Bb |
| UFRPE Cm90 | 1,26Ba | 1,07Bb | 0,90Bb |
| UFRPE Cm153 | 0,94Ba | 0,86Ba | 0,95Ba |
| UFRPE Cm155 | 1,10Bb | 1,88Aa | 0,99Bb |
| UFRPE Cm163 | 1,09Bb | 1,45Aa | 1,68Aa |
| UFRPE Cm243 | 1,31Ab | 1,65Aa | 1,27Bb |
| UFRPE Cm244 | 1,01Bb | 2,11Aa | 1,18Bb |
| UFRPE Cm253 | 0,95Ba | 0,97Ba | 1,17Ba |
| UFRPE Cm308 | 1,12Bb | 1,60Aa | 1,29Bb |
| UFRPE Cm309 | 0,98Bb | 1,64Aa | 1,15Bb |
| UFRPE Cm321 | 1,08Bb | 1,10Bb | 1,48Aa |
| UFRPE Cm323 | 1,21Bb | 1,28Bb | 1,76Aa |
| UFRPE Cm326 | 1,06Bb | 1,61Aa | 1,04Bb |
| UFRPE Cm362 | 1,22Bb | 1,78Aa | 1,28Bb |
| UFRPE Cm363 | 1,05Bb | 1,52Aa | 1,34Ba |
| UFRPE Cm504 | 1,08Bb | 1,79Aa | 1,16Bb |
| UFRPE Cm556 | 0,89Bc | 1,24Bb | 1,55Aa |
| UFRPE Cm603 | 1,00Bb | 0,71Bc | 1,37Ba |
| UFRPE Cm677 | 1,11Bb | 1,37Ab | 1,96Aa |
| UFRPE Cm683 | 0,99Ba | 0,85Ba | 1,09Ba |
| UFRPE Cm799 | 1,02Bc | 1,68Aa | 1,32Bb |
| UFRPE Cm1302 | 1,06Bc | 1,80Aa | 1,47Ab |
| UFRPE Cm1535 | 0,95Bb | 1,51Aa | 0,89Bb |
| SEMIA 6152 | 1,07Ba | 1,41Aa | 1,26Ba |
| N Zero | 0,95Ba | 1,12Ba | 1,05Ba |
| N 30 kg | 1,18Bb | 1,67Aa | 1,76Aa |
| N 60 kg | 1,46Ab | 1,69Aa | 1,77Aa |
| N 90 kg | 1,65Aa | 1,72Aa | 1,78Aa |
| N 120 kg | 1,60Ab | 1,71Ab | 2,00Aa |
| CV (%) | 17,14 | 14,92 | 13,33 |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste Skott Knott

Pela análise da tabela 3 pode-se verificar que o isolado que proporcionou maior acúmulo de MSPA não foi o que resultou em maior CNPA, provavelmente devido ao efeito de diluição desse nutriente no tecido das plantas. Este efeito, provavelmente ocorreu devido ao acúmulo de MSPA ter sido superior à taxa de absorção do nutriente pelo sistema radicular (Rosa et al., 2009).

Tabela 3. Valores médios de matéria seca da parte aérea (MSPA), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na MSPA, eficiência relativa (ER) e dose de N estimada pela análise de regressão (Dose N) de diferentes isolados rizobianos de calopogônio no primeiro corte.

| Tratamentos | MSPA | CNPA | ANPA | ER ⁽¹⁾ | Dose N ⁽²⁾ |
|--------------|------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|
| | g planta ⁻¹ | dag kg ⁻¹ | mg planta ⁻¹ | % | kg ha ⁻¹ |
| UFRPE Cm72 | 0,99b | 2,62b | 25,78c | 58,47c | 5,53c |
| UFRPE Cm81 | 1,19b | 2,53b | 29,49b | 66,86b | 27,48b |
| UFRPE Cm88 | 1,09b | 2,64b | 28,22b | 63,99b | 16,38c |
| UFRPE Cm90 | 1,26b | 2,30b | 28,79b | 65,30b | 35,42b |
| UFRPE Cm153 | 0,94b | 2,73a | 26,02c | 58,99c | 1,82c |
| UFRPE Cm155 | 1,10b | 2,36b | 26,27c | 59,56c | 18,14c |
| UFRPE Cm163 | 1,09b | 2,54b | 28,11b | 63,75b | 16,59c |
| UFRPE Cm243 | 1,31a | 2,58b | 33,89b | 76,85b | 41,28b |
| UFRPE Cm244 | 1,01b | 3,00a | 30,18b | 68,43b | 7,43c |
| UFRPE Cm253 | 0,95b | 2,76a | 25,58c | 58,01c | 2,42c |
| UFRPE Cm308 | 1,12b | 2,52b | 28,07b | 63,64b | 19,16c |
| UFRPE Cm309 | 0,98b | 2,54b | 25,03c | 56,76c | 4,89c |
| UFRPE Cm321 | 1,08b | 2,60b | 28,81b | 65,32b | 16,03c |
| UFRPE Cm323 | 1,21b | 2,58b | 30,53b | 69,22b | 29,95b |
| UFRPE Cm326 | 1,06b | 2,27b | 24,83c | 56,29c | 13,46c |
| UFRPE Cm362 | 1,22b | 2,39b | 29,43b | 66,75b | 31,63b |
| UFRPE Cm363 | 1,05b | 2,35b | 24,84c | 56,32c | 12,93c |
| UFRPE Cm504 | 1,08b | 2,40b | 26,37c | 59,80c | 16,48c |
| UFRPE Cm556 | 0,89b | 2,55b | 23,14c | 52,47c | - |
| UFRPE Cm603 | 1,00b | 2,49b | 24,58c | 55,69c | 7,04c |
| UFRPE Cm677 | 1,11b | 2,75a | 30,71b | 69,63b | 18,60c |
| UFRPE Cm683 | 0,99b | 2,48b | 24,88c | 56,42c | 6,75c |
| UFRPE Cm799 | 1,02b | 2,34b | 23,23c | 52,67c | 9,66c |
| UFRPE Cm1302 | 1,06b | 2,16b | 22,89c | 51,91c | 12,32c |
| UFRPE Cm1535 | 0,95b | 2,56b | 24,36c | 55,25c | 2,02c |
| SEMIA 6152 | 1,07b | 2,61b | 27,74b | 62,90b | 14,60c |
| N Zero | 0,95b | 2,46b | 23,89c | 54,17c | 2,49c |
| N 30 kg | 1,18b | 2,81a | 33,62b | 76,25b | 26,58b |
| N 60 kg | 1,46a | 3,08a | 44,10a | 100,00a | 68,53b |
| N 90 kg | 1,65a | 3,02a | 47,96a | 108,76a | 114,59a |
| N 120 kg | 1,60a | 3,12a | 50,28a | 114,02a | 93,04a |
| CV (%) | 17,14 | 12,62 | 16,21 | 16,21 | - |

Na coluna, médias (quatro repetições) seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste Skott Knott.

⁽¹⁾ER = ANPA de cada tratamento/ANPA do tratamento que recebeu a dose de 100 kg ha⁻¹ de N x (100). ⁽²⁾Estimada pela análise de regressão da MSPA das plantas.

Os isolados UFRPE Cm244; 253; 677 e 153 proporcionaram maior CNPA, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) dos tratamentos adubados com as doses de N (Tabela 3). Entretanto, a CNPA de todos os tratamentos ficaram na faixa considerada adequada para a maioria das culturas, as quais variam de 2,0 a 5,0 dag kg⁻¹ (Malavolta et al., 1989).

Guerra & Teixeira (1997) em estudos com calopogônio, cudzu, siratro, estilozantes e amendoim forrageiro em um Argissolo Vermelho-Amarelo em condições de campo em Seropédica, Rio de Janeiro, obtiveram CNPA das plantas variando de 2,24 a 2,65 dag kg⁻¹, inferiores ao valor verificado para os isolados que se destacaram no presente estudo.

Apesar de estarem entre os isolados que proporcionaram maiores CNPA, os isolados UFRPE Cm153 e 253 não estão entre os isolados que apresentaram maiores ANPA, devido ao baixo acúmulo de MSPA das plantas inoculadas com esses isolados. Os isolados UFRPE Cm243; 677; 323; 244; 81; 362; 321; 90; 88; 163 e 308 proporcionaram os maiores ANPA, não diferindo ($p > 0,05$) da SEMIA 6152 e da dose de 30 kg ha⁻¹ de N e foram inferiores aos tratamentos adubados com 60; 90 e 120 kg ha⁻¹ de N e superiores ao tratamento sem N e sem inoculação (Tabela 3).

Com relação à ER, apenas o isolado UFRPE Cm243 apresentou ER superior a 70%. No entanto, foi semelhante a outros dez isolados, à estirpe recomendada e ao tratamento com 30 kg ha⁻¹ de N. Entre os isolados estudados, apenas os isolados UFRPE Cm81; 90; 243; 323 e 362 se destacaram em proporcionar as maiores doses de N no primeiro corte (Tabela 3), não diferindo das doses de 30 e 60 kg ha⁻¹ de N, no entanto foram inferiores às doses mais elevadas.

Ao avaliar a MSPA no segundo corte pode-se verificar que houve um acréscimo de 32% no acúmulo médio de MSPA comparativamente ao primeiro corte proporcionado pelos isolados rizobianos (Tabela 4). Esse acréscimo na MSPA ocorreu com maior destaque para a maioria dos isolados, pois 15 isolados proporcionaram elevado incremento na MSPA, não diferindo dos tratamentos com doses de N e com a estirpe SEMIA 6152.

O maior incremento de MSPA no segundo corte pode ter sido devido às plantas já estarem com seu sistema radicular estabelecido, proporcionando maior absorção de água e de nutrientes para as mesmas, como também à maior contribuição dos isolados inoculados no início do estudo (Brose, 1994).

Em estudos de eficiência de inoculantes de *Sinorhizobium meliloti* no desenvolvimento de cultivares de alfafa em um Latossolo Vermelho-Escuro distrófico em casa de vegetação em Juiz de Fora, Minas Gerais, Xavier et al. (2005) verificaram que MSSR foi influenciada pelos inoculantes, não diferindo do tratamento adubado com N. No entanto, diferentemente dos resultados do

presente estudo, os autores não verificaram aumentos na MSPA das plantas no segundo corte, os quais foram significativamente inferiores aos valores obtidos no primeiro corte para todos os tratamentos avaliados.

Tabela 4. Valores médios de matéria seca da parte aérea (MSPA), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na MSPA, eficiência relativa (ER) e dose de N estimada pela análise de regressão (Dose N) de diferentes isolados rizobianos de calopogônio no segundo corte.

| Tratamentos | MSPA | CNPA | ANPA | ER ⁽¹⁾ | Dose N ⁽²⁾ |
|--------------|------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|
| | g planta ⁻¹ | dag kg ⁻¹ | mg planta ⁻¹ | % | kg ha ⁻¹ |
| UFRPE Cm72 | 1,49a | 2,80a | 41,80a | 84,42a | 25,50c |
| UFRPE Cm81 | 1,11b | 2,86a | 32,19b | 65,01b | - |
| UFRPE Cm88 | 1,10b | 3,04a | 32,22b | 65,07b | - |
| UFRPE Cm90 | 1,07b | 3,21a | 34,02b | 68,71b | - |
| UFRPE Cm153 | 0,86b | 3,14a | 26,72b | 53,97b | - |
| UFRPE Cm155 | 1,88a | 2,95a | 54,90a | 110,88a | 72,53a |
| UFRPE Cm163 | 1,45a | 2,85a | 41,37a | 83,55a | 21,33c |
| UFRPE Cm243 | 1,65a | 2,46a | 40,61a | 82,00a | 46,02b |
| UFRPE Cm244 | 2,11a | 3,06a | 65,11a | 131,49a | 81,67a |
| UFRPE Cm253 | 0,97b | 2,89a | 26,75b | 54,03b | - |
| UFRPE Cm308 | 1,60a | 3,19a | 50,57a | 102,12a | 44,04b |
| UFRPE Cm309 | 1,64a | 2,91a | 47,45a | 95,83a | 42,96b |
| UFRPE Cm321 | 1,10b | 3,09a | 34,11b | 68,88b | - |
| UFRPE Cm323 | 1,28b | 2,99a | 38,18b | 77,09b | 11,16c |
| UFRPE Cm326 | 1,61a | 2,99a | 48,37a | 97,68a | 39,10b |
| UFRPE Cm362 | 1,78a | 3,02a | 53,83a | 108,71a | 71,44a |
| UFRPE Cm363 | 1,52a | 2,78a | 41,85a | 84,51a | 31,41b |
| UFRPE Cm504 | 1,79a | 2,89a | 51,39a | 103,78a | 73,74a |
| UFRPE Cm556 | 1,24b | 2,98a | 37,41b | 75,55b | 6,44c |
| UFRPE Cm603 | 0,71b | 3,17a | 22,84b | 46,12b | - |
| UFRPE Cm677 | 1,37a | 3,16a | 43,58a | 88,01a | 16,34c |
| UFRPE Cm683 | 0,85b | 3,32a | 28,07b | 56,70b | - |
| UFRPE Cm799 | 1,68a | 2,80a | 46,49a | 93,88a | 49,97b |
| UFRPE Cm1302 | 1,80a | 2,60a | 46,37a | 93,65a | 60,20a |
| UFRPE Cm1535 | 1,51a | 2,85a | 42,41a | 85,65a | 30,20b |
| SEMIA 6152 | 1,41a | 2,49a | 34,48b | 69,63b | 17,66c |
| N Zero | 1,12b | 3,00a | 34,45b | 69,57b | - |
| N 30 kg | 1,67a | 3,00a | 49,45a | 99,86a | 48,59b |
| N 60 kg | 1,69a | 2,93a | 49,52a | 100,00a | 50,46b |
| N 90 kg | 1,72a | 2,97a | 50,57a | 102,12a | 57,30b |
| N 120 kg | 1,71a | 3,18a | 54,43a | 109,93a | 54,25b |
| CV (%) | 14,92 | 9,99 | 16,79 | 16,79 | - |

Na coluna, médias (quatro repetições) seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste Skott Knott.

⁽¹⁾ER = ANPA de cada tratamento/ANPA do tratamento que recebeu a dose de 100 kg ha⁻¹ de N x (100). ⁽²⁾Estimada pela análise de regressão da MSPA das plantas.

Os isolados que proporcionaram maior acúmulo de MSPA no segundo corte foram UFRPE Cm244; 155; 1302; 504; 362; 799; 243; 309; 326; 308; 363; 1535; 72; 163 e 677 (Tabela 4). O acúmulo médio de MSPA das plantas inoculadas com esses isolados foi de 1,66 g planta⁻¹, resultado 1,48 vezes superior a MSPA do tratamento sem N e sem inoculação, tendo o isolado que proporcionou maior acúmulo de MSPA (UFRPE Cm244) apresentado incremento 1,88 vezes superior ao tratamento sem N e sem inoculação.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos avaliados na CNPA no segundo corte (Tabela 4). Apesar disto, houve efeito significativo ($p<0,05$) no ANPA, com destaque para os isolados UFRPE Cm72; 155; 163; 243; 244; 308; 309; 326; 362; 363; 504; 677; 799; 1302 e 1535, que proporcionaram os maiores ANPA, não diferindo dos tratamentos adubados com as doses de N. Vale ressaltar que o maior ANPA das plantas inoculadas com estes isolados deve-se ao maior acúmulo de MSPA proporcionado pelos mesmos.

Esses mesmos isolados apresentaram elevada ER, variando de 82% a 131,49% e foram semelhantes aos tratamentos adubados com N e superiores à estirpe SEMIA 6152 e ao tratamento sem N e sem inoculação. Apenas o isolado UFRPE Cm603 apresentou ER abaixo de 50%.

Brose (1994) em estudos com diferentes estirpes de rizóbio em trevo-branco em um Latossolo Bruno distrófico em casa de vegetação, não verificaram efeitos significativos entre as estirpes no primeiro corte tanto para MSPA quanto para o acúmulo de N, as quais também não diferiram dos tratamentos com e sem adubação nitrogenada. No entanto, no segundo e terceiro cortes foram obtidos efeitos significativos em todos os tratamentos, com incrementos na MSPA e no acúmulo de N das plantas para a maioria dos tratamentos avaliados. Os autores atribuíram a ausência de resposta inicial à elevada mineralização da matéria orgânica do solo, geralmente comum em estudos em vasos, e à baixa exigência inicial das plantas em N.

Soares et al. (2006) em pesquisas com diferentes estirpes de rizóbio em um Argissolo Vermelho distrófico típico em Perdões, Minas Gerais, verificaram que apenas uma estirpe apresentou acúmulo de N semelhante à dose de 70 kg ha⁻¹ de N na cultura do feijoeiro, com as demais estirpes, inclusive a estirpe padrão, não diferindo do tratamento sem adubação nitrogenada.

Com relação à dose de N estimada pela análise de regressão, apenas os isolados UFRPE Cm155; 244; 362; 504 e 1302 se destacaram em proporcionar as maiores doses e foram significativamente ($p < 0,05$) superiores aos demais tratamentos. A média de N proporcionada por esses isolados ($71,92 \text{ kg ha}^{-1}$ de N) foi 1,26 vezes superior ao tratamento adubado com a dose de 90 kg ha^{-1} de N e 1,33 vezes superior ao tratamento com a dose de 120 kg ha^{-1} de N.

No terceiro corte, foi verificado um decréscimo de 6,0% no acúmulo de MSPA comparativamente ao segundo corte. Essa redução na MSPA no terceiro corte pode ter sido devido ao florescimento das plantas que ocorreu poucos dias após o início da rebrota das mesmas, promovendo a destinação de fotossintatos para a frutificação. Apenas os isolados UFRPE Cm72; 81; 163; 321; 323; 556; 677 e 1302 se destacaram em proporcionar os maiores acúmulos de MSPA, não diferindo ($p > 0,05$) dos tratamentos adubados com as doses de N (Tabela 5).

Com relação à MSSR, apenas o tratamento adubado com a maior dose de N foi significativamente ($p < 0,05$) superior aos demais tratamentos, não havendo efeito significativo para os demais tratamentos (Tabela 5). Chagas Junior et al. (2010c) verificaram efeitos significativos na MSSR de diferentes estirpes de rizóbio em estudos com feijão-caupi em três experimentos de campo no Município de Gurupi, Tocantins. Os autores verificaram que a estirpe BR 3262 proporcionou MSSR significativamente superior ao tratamento adubado com 50 kg ha^{-1} de N, porém não diferiu de outras três estirpes em um dos experimentos.

Devido à grande variabilidade dos dados não houve efeito significativo entre os tratamentos avaliados na MSN (Tabela 5). Verificou-se ainda que as doses de N não inibiram a nodulação mesmo nas doses mais elevadas. Este efeito confirma a elevada promiscuidade desta espécie uma vez que o solo utilizado não foi esterilizado. Vale ressaltar que mesmo com a população do solo bem estabelecida, foram obtidos efeitos positivos com a inoculação com os melhores isolados do presente estudo, podendo inferir que estes isolados são mais competitivos que as estirpes nativas do solo, uma vez que não foi verificado efeito significativo na massa de nódulos.

Tabela 5. Valores médios de matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na MSPA, eficiência relativa (ER) e dose de N estimada pela análise de regressão (Dose N) de diferentes isolados rizobianos de calopogônio no terceiro corte.

| Tratamentos | MSPA | MSSR | MSN | CNPA | ANPA | ER ⁽¹⁾ | Dose N ⁽²⁾ |
|--------------|----------------------------|-------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|
| | --- g planta ⁻¹ | --- | mg planta ⁻¹ | dag kg ⁻¹ | mg planta ⁻¹ | % | kg ha ⁻¹ |
| UFRPE Cm72 | 1,74a | 0,98b | 97,00a | 2,92a | 50,92a | 104,03a | 51,82b |
| UFRPE Cm81 | 1,43a | 0,89b | 80,50a | 2,64a | 38,04b | 77,88b | 24,01c |
| UFRPE Cm88 | 0,78b | 0,51b | 34,33a | 2,54a | 19,80b | 40,53b | - |
| UFRPE Cm90 | 0,90b | 0,44b | 36,00a | 2,84a | 25,39b | 51,98b | - |
| UFRPE Cm153 | 0,95b | 0,41b | 56,67a | 2,27a | 21,55b | 44,11b | - |
| UFRPE Cm155 | 0,99b | 0,79b | 35,56a | 2,96a | 29,36b | 60,09b | - |
| UFRPE Cm163 | 1,68a | 0,73b | 105,50a | 2,74a | 45,90a | 93,97a | 42,69b |
| UFRPE Cm243 | 1,27b | 0,83b | 79,50a | 2,74a | 35,27b | 72,20b | 8,38c |
| UFRPE Cm244 | 1,18b | 0,70b | 59,50a | 2,86a | 33,52b | 68,61b | 1,90c |
| UFRPE Cm253 | 1,17b | 0,57b | 72,34a | 2,67a | 31,56b | 64,60b | 2,89c |
| UFRPE Cm308 | 1,29b | 0,69b | 69,50a | 2,73a | 35,24b | 72,14b | 9,86c |
| UFRPE Cm309 | 1,15b | 0,65b | 62,25a | 2,99a | 34,26b | 70,12b | 0,58c |
| UFRPE Cm321 | 1,48a | 0,62b | 92,00a | 2,74a | 40,03b | 81,95b | 23,84c |
| UFRPE Cm323 | 1,76a | 0,77b | 85,00a | 2,77a | 48,65a | 99,59a | 52,59b |
| UFRPE Cm326 | 1,04b | 0,64b | 54,50a | 2,83a | 29,23b | 59,84b | - |
| UFRPE Cm362 | 1,28b | 0,83b | 63,50a | 2,83a | 36,27b | 74,25b | 9,09c |
| UFRPE Cm363 | 1,34b | 0,65b | 101,00a | 2,75a | 36,79b | 75,32b | 13,91c |
| UFRPE Cm504 | 1,16b | 0,70b | 47,67a | 2,60a | 29,22b | 59,82b | 2,46c |
| UFRPE Cm556 | 1,55a | 0,67b | 92,00a | 2,45a | 38,27b | 78,34b | 31,24c |
| UFRPE Cm603 | 1,37b | 0,44b | 89,00a | 2,79a | 38,14b | 78,08b | 16,06c |
| UFRPE Cm677 | 1,96a | 0,91b | 133,25a | 2,98a | 58,68a | 120,12a | 91,09a |
| UFRPE Cm683 | 1,09b | 0,52b | 80,00a | 2,71a | 29,57b | 60,52b | - |
| UFRPE Cm799 | 1,32b | 0,77b | 95,17a | 2,36a | 30,92b | 63,28b | 12,42c |
| UFRPE Cm1302 | 1,47a | 0,91b | 82,78a | 2,60a | 37,47b | 76,71b | 24,19c |
| UFRPE Cm1535 | 0,89b | 0,53b | 45,83a | 2,70a | 24,37b | 49,88b | - |
| SEMIA 6152 | 1,26b | 0,97b | 45,00a | 2,54a | 32,26b | 66,03b | 8,12c |
| N Zero | 1,05b | 0,58b | 50,89a | 2,51a | 26,47b | 54,19b | - |
| N 30 kg | 1,76a | 1,24b | 64,39a | 2,65a | 47,28a | 96,78a | 53,51b |
| N 60 kg | 1,77a | 1,24b | 50,00a | 2,76a | 48,85a | 100,00a | 54,70b |
| N 90 kg | 1,78a | 1,24b | 38,25a | 2,76a | 48,93a | 100,16a | 55,91b |
| N 120 kg | 2,00a | 2,00a | 96,00a | 2,56a | 51,25a | 104,90a | 98,13a |
| CV (%) | 13,33 | 30,05 | 54,31 | 11,71 | 14,84 | 14,84 | - |

Na coluna, médias (quatro repetições) seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste Skott Knott.

⁽¹⁾ER = ANPA de cada tratamento/ANPA do tratamento que recebeu a dose de 100 kg ha⁻¹ de N x (100). ⁽²⁾Estimada pela análise de regressão da MSPA das plantas.

A exemplo do que foi observado no segundo corte para a CNPA, também não houve efeito significativo para esta variável no terceiro corte (Tabela 5). Entretanto houve efeito significativo ($p < 0,05$) no ANPA e os isolados UFRPE Cm72; 163; 323 e 677 foram os que proporcionaram os maiores ANPA e foram altamente eficientes na FBN com ER superior a 90%, não diferindo ($p > 0,05$) dos tratamentos adubados com as doses de N. Além desses isolados citados anteriormente, outros seis isolados (UFRPE Cm81; 253; 321; 556; 603 e 683) proporcionaram ANPA crescente com o corte.

Apenas os isolados UFRPE Cm88 e 1535 apresentaram ER abaixo de 50% (Tabela 5).

Em estudos com calopogônio, cunhã, estilósante e kudzu tropical em cultivos solteiro e consorciado com duas gramíneas em um Argissolo Vermelho-Amarelo em casa de vegetação do IPA, Oliveira et al. (1996) verificaram acréscimo no ANPA em todos os tratamentos avaliados até o terceiro corte das plantas, havendo um declínio em oito dos treze tratamentos avaliados no quarto corte.

Para a dose de N estimada pela análise de regressão apenas o isolado UFRPE Cm677 se destacou em proporcionar a maior dose ($91,09 \text{ kg ha}^{-1}$ de N), não diferindo estatisticamente ($p>0,05$) do tratamento com a dose mais elevada de N (Tabela 5). Os isolados UFRPE Cm72; 163 e 323 tiveram desempenho intermediário quanto à dose de N e foram semelhantes aos tratamentos adubados com as demais doses de N e superiores à estirpe recomendada, a qual situou-se entre os tratamentos de pior desempenho, e ao tratamento sem N e sem inoculação, que apresentou resultado negativo para esta variável (Tabela 5).

Ao avaliar o N acumulado durante os três cortes, pode-se observar que os isolados UFRPE Cm244 e 677 foram bem eficientes e proporcionaram um acúmulo médio de N para as plantas de 82,6% e 85,3% do N acumulado pelo tratamento que recebeu adubação de 120 kg ha^{-1} de N.

Fontoura et al. (2011) também obtiveram acúmulos de N proporcionado por rizóbios próximos ao tratamento adubado com 100 kg ha^{-1} de N, em estudos com *Lotus glaber* em vasos de Leonard em casa de vegetação no Rio Grande do Sul.

A dose de N estimada pela análise de regressão acumulada durante os três cortes pelos isolados mais eficientes na FBN (UFRPE Cm362 e 677) correspondeu a adubações nitrogenadas de $112,16$ e $126,03 \text{ kg ha}^{-1}$ de N, respectivamente (Tabelas 3, 4 e 5). Portanto esses valores correspondem a aproximadamente a dose máxima recomendada para o estado de Pernambuco (IPA, 2008), que é de 80 kg ha^{-1} de N em pastagens de regiões com precipitações pluviométricas de 800 a 1200 mm ano^{-1} e de 120 kg ha^{-1} de N em regiões com precipitações superiores a 1200 mm ano^{-1} . Doses estas superiores à adubação recomendada para a região de Itambé, que tem precipitação média anual de 1200 mm ano^{-1} .

Ao considerarmos as doses de N obtidas pelos isolados de melhor desempenho (112,16 e 126,03 kg ha⁻¹ de N) e levando em conta o custo do quilograma do N em média de 2,79 reais (CONAB, 2012), a inoculação com esses isolados representaria uma economia com adubação nitrogenada de aproximadamente 313,00 e 352,00 reais, respectivamente, além da substancial contribuição que a FBN proporciona aos ecossistemas agrícolas pela não utilização de fertilizantes nitrogenados que podem ser uma fonte de contaminação para esses ambientes.

Na figura 2 é apresentada a concentração e o acúmulo de N dos três cortes para os tratamentos adubados com esse nutriente. Observa-se que as doses de N aplicadas promoveram efeito quadrático com equações com elevados coeficientes de determinação com aumentos significativos ($p < 0,05$) tanto para a concentração, quanto para o acúmulo desse nutriente na parte aérea das plantas.

Vale salientar que o tratamento adubado com a dose de 120 kg ha⁻¹ de N proporcionou acréscimos 1,27 e 2,10 vezes superiores ao tratamento sem adubação na CNPA e no ANPA, respectivamente, apesar de ter havido um pequeno decréscimo na MSPA das plantas com essa dose de N, sendo a CNPA máxima obtida com 65,00 kg ha⁻¹ de N e o ANPA máximo com 125,85 kg ha⁻¹ de N no primeiro corte.

No segundo e terceiro cortes a CNPA não variou muito com as doses de N aplicadas ao solo. Com relação ao ANPA o tratamento adubado com 120 kg ha⁻¹ de N foi 1,58 e 1,94 vezes superior ao tratamento sem adubação e sem inoculação, no segundo e terceiro cortes, respectivamente. A CNPA máxima foi obtida com 50,00 kg ha⁻¹ de N no segundo e 68,00 kg ha⁻¹ de N no terceiro corte. As doses de máximo ANPA decresceram com os cortes das plantas, sendo a dose de máximo ANPA de 100,00 kg ha⁻¹ de N no segundo e 87,00 kg ha⁻¹ de N no terceiro corte, provavelmente devido à simbiose com os rizóbios nativos do solo, já que o N mineral não inibiu a infecção e nodulação do calopogônio.

Ao analisar a correlação entre as variáveis estudadas, verifica-se que foram obtidas correlações positivas e significativas para a maioria das variáveis nos três cortes (Tabela 6).

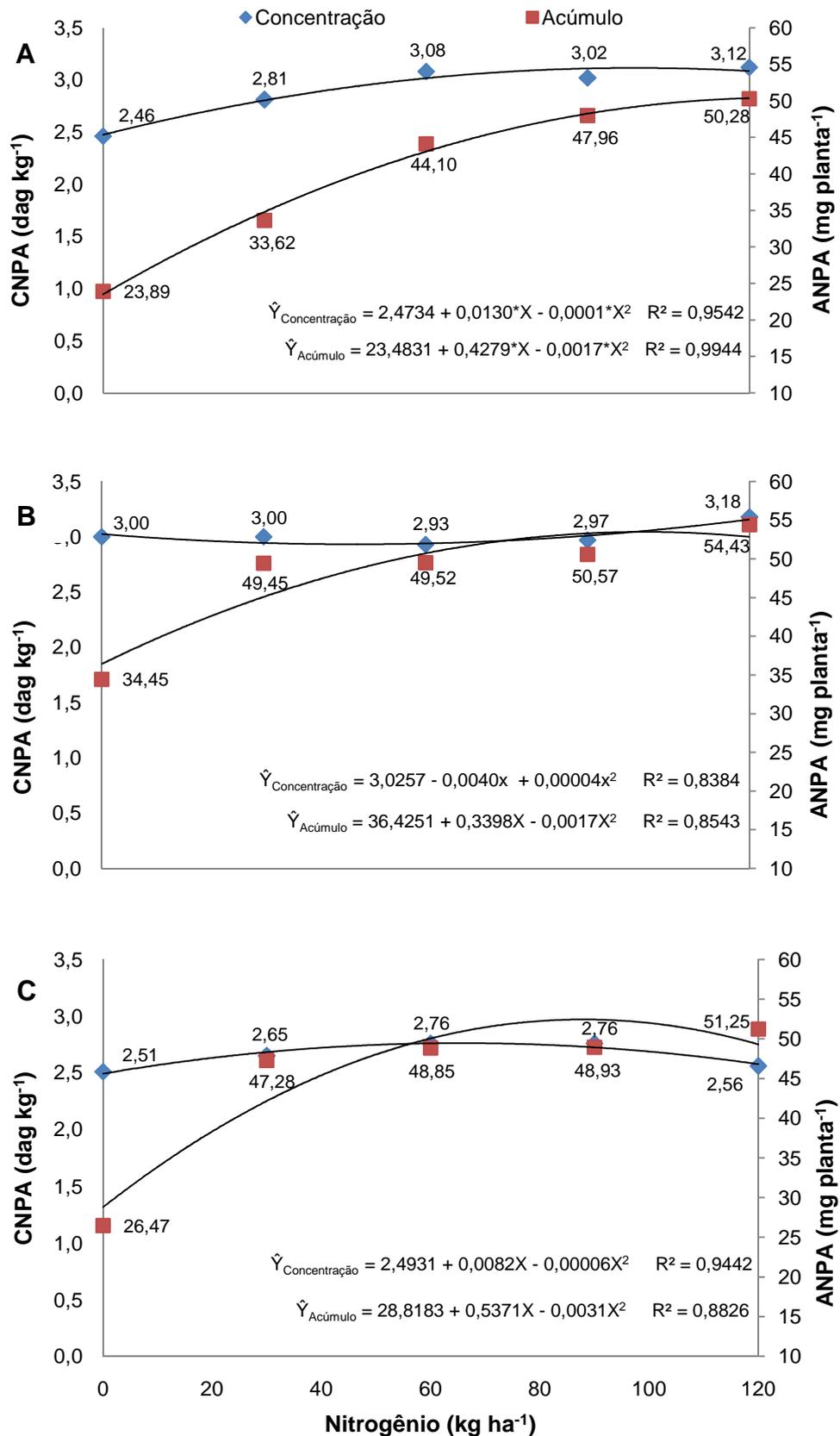


Figura 2. Concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na parte aérea das plantas de calopogônio no primeiro (A), segundo (B) e terceiro (C) cortes em função das doses de N aplicadas ao solo no início do estudo.

Tabela 6. Coeficientes de correlação da MSPA, concentração (CNPA) e acúmulo (ANPA) de N na parte aérea, eficiência relativa (ER) e dose de N (Dose N) necessária para atingir a produção de MSPA para o primeiro, segundo e terceiro cortes, e MSSR e MSN para o terceiro corte, de diferentes isolados rizobianos de calopogônio de áreas de *Brachiaria decumbens*, bosques de sabiá e Mata Atlântica.

| | ----- Primeiro Corte ----- | | | | ----- Segundo Corte ----- | | | | ----- Terceiro Corte ----- | | | | | |
|--------|----------------------------|-------|-------|--------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------|----------------------------|-------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | CNPA | ANPA | ER | Dose N | CNPA | ANPA | ER | Dose N | CNPA | ANPA | ER | Dose N | MSSR | MSN |
| MSPA | 0,18* | 0,80* | 0,80* | 0,93* | -0,32* | 0,93* | 0,93* | 0,95* | 0,08 ^{ns} | 0,92* | 0,92* | 0,97* | 0,60* | 0,65* |
| CNPA | - | 0,72* | 0,72* | 0,24* | - | 0,04 ^{ns} | 0,04 ^{ns} | -0,31* | - | 0,45* | 0,45* | 0,10 ^{ns} | 0,05 ^{ns} | 0,03 ^{ns} |
| ANPA | - | - | 1,00* | 0,80* | - | - | 1,00* | 0,87* | - | - | 1,00* | 0,91* | 0,54* | 0,59* |
| ER | - | - | - | 0,80* | - | - | - | 0,87* | - | - | - | 0,91* | 0,54* | 0,59* |
| Dose N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,67* | 0,61* |
| MSSR | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,26* |

^{ns} e * = Não significativo e significativo a 5% de probabilidade pelo teste t, respectivamente.

Os maiores coeficientes de correlação foram obtidos para a MSPA e ANPA, ER e dose de N; ANPA e ER e dose de N; e para a ER e dose de N, para nos três cortes. Logo, para essas variáveis, à medida que uma aumentou as demais também tiveram seus valores aumentados para a maioria do isolados. No segundo corte foi verificada correlação negativa da MSPA com CNPA e da CNPA com a dose de N. A MSSR e MSN foram quantificadas apenas no terceiro corte e essas variáveis não se correlacionaram apenas com a CNPA.

Correlações significativas e positivas entre MSPA e acúmulo de N também foram obtidas por Antunes et al. (2011), em estudos com isolados de feijão-fava em casa de vegetação do IPA e por Nascimento et al. (2010), em pesquisas em casa de vegetação trabalhando com substrato estéril em Pernambuco, com isolados nativos de feijão-caupi provenientes de três municípios do Estado da Paraíba sob diferentes coberturas vegetais. Os autores relatam a importância do potencial da FBN dos isolados tanto para a produção de biomassa, quanto para o acúmulo de N pelas plantas.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem bastante otimismo quanto à seleção de isolados mais eficientes na FBN. Os isolados UFRPE Cm72; 163; 243; 244; 308; 323; 362; 677 e 1302 se mostraram bem promissores quanto a FBN, sendo de grande interesse para estudos posteriores em experimentação de campo, objetivando selecionar futuramente os isolados mais eficientes e competitivos para a produção de inoculante.

Conclusões

Os isolados UFRPE Cm72; 163; 243; 244; 308; 323; 362; 677 e 1302 se mostraram bem eficientes na FBN, proporcionando acúmulos de N superiores ao obtido pelo tratamento sem inoculação e sem adubação, com grandes possibilidades de indicação futura para a produção de inoculante;

O acúmulo médio de MSPA foi maior no segundo corte, provavelmente devido ao estabelecimento do sistema radicular das plantas, como também da maior eficiência da simbiose com os rizóbios;

O menor rendimento obtido no terceiro corte deveu-se ao florescimento precoce das plantas;

A inoculação do calopogônio com os isolados mais eficientes deste estudo pode suprir todo o N requerido pelas gramíneas nas pastagens.

Referências

ANTUNES, J. E. L.; GOMES, E. 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, p. 751-757, 2011.

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

BROSE, E. Seleção de rizóbio para trevo-branco em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 281-285, 1994.

BUSO, W. H. D. & Kliemann, H. J. Relações de carbono orgânico e de nitrogênio total e potencialmente mineralizável com o nitrogênio absorvido pelo milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 33, p. 97-105, 2003.

CARVALHO, G. G. P. & PIRES, A. J. V. Leguminosas tropicais herbáceas em associação com pastagens. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, p. 103-113, 2008.

CHAGAS JUNIOR, 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, p. 161-169, 2010a.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, p. 359-366, 2010b.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, G. R.; CHAGAS, L. F. B. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, p. 709-714, 2010c.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Insumos Agropecuários**. Disponível em: <http://consultaweb.conab.gov.br/consultas/consultainsumo>. Acesso em: 25 de Outubro de 2012.

COSTA, N. L.; BENDAHAN, A. B.; GIANLUPPI, V.; RIBEIRO, P. S. M.; BRAGA, R. M. Formação e manejo de bancos-de-proteína em Roraima. **Comunicado Técnico - Embrapa**, 2008, 5 p.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, Embrapa Solos/Embrapa Informática Agropecuária/Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2006, 306 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FONTOURA, R. A.; FRIZZO, M. L. S.; SÁ, E. L. S.; OSÓRIO FILHO, B. D.; TONON, B. C.; BINZ, A.; SILVA, M. C.; CAMARGO, F. A. O.; SELBACH, P. A. Rizóbios nativos do Rio Grande do Sul simbioticamente eficientes em *Lotus glaber*. **Ciência Rural**, v. 41, p. 440-446, 2011.

GUERRA, J. G. M. & TEIXEIRA, M. G. Avaliação inicial de algumas leguminosas herbáceas perenes para utilização como cobertura viva permanente de solo. **Comunicado Técnico - Embrapa**, p. 1-7, 1997.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.

HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley, California Agricultural Experiment Station, 1950, 32 p.

IPA - Instituto Agrônomo de Pernambuco. **Banco de dados agrometeorológicos**, 1994, 100 p.

IPA - Instituto Agrônomo de Pernambuco. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2ª aproximação**. Recife, 2008, 212 p.

JACOMINE, P. K. T.; CAVALCANTI, A. C.; BURGOS, N.; PESSOA, S. C. P.; SILVEIRA, C. O. **Levantamento exploratório - reconhecimento de solos do Estado de Pernambuco**. Boletim Técnico 26 Série Pedologia, 14: Recife, SUDENE, 1973, 359 p.

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

JESUS, F. G.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; JANINI, J. C.; SILVA, A. G.; CARBONEL, S. A. M.; CHIORATO, A. F. Interação de variedades, óleo de nim e inseticida no controle de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotipo B (Hemiptera:Aleyrodidae) e *Caliothrips phaseoli* (Hood) (Thysanoptera:Thripidae) na cultura do feijoeiro. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v. 35, p. 491-500, 2009.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. D. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, p. 127-145, 2009.

LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; LIRA JUNIOR, M. A.; MELLO, A. C. L. Sistemas de produção de forragem: alternativas para sustentabilidade da pecuária. **Anais de Simpósios da 43ª Reunião Anual da SBZ** - João Pessoa - PB, p. 405-423, 2006.

LUZ, M. J. S.; FERREIRA, G. B.; BEZERRA, J. R. C. Adubação e correção do solo: procedimentos a serem adotados em função dos resultados da análise do solo. **Circular Técnico, Embrapa**, 2002, 32 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1989, 201 p.

MARTINS, A. F.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SAMPAIO, J. A. T.; ARAÚJO, J. H. B.; TURCATEL, A. T.; DIEMER, G. D.; SÁ, E. L. S. Diversidade genética, tolerância aos fatores de acidez e eficiência simbiótica de rizóbios para

cornichão de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1855-1864, 2011.

NASCIMENTO, L. R. S.; SOUSA, C. A.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SAMPAIO, E. V. S. B. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, p. 36-42, 2010.

OLIVEIRA, J. P.; BURITY, H. A.; LYRA, M. C. C. P.; LIRA JUNIOR, M. A.; Avaliação da fixação e transferência de nitrogênio na associação gramíneas - leguminosas forrageiras tropicais, através da diluição isotópica do ¹⁵N. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 25, p. 210-222, 1996.

RAHMANI, H. A.; RÄSÄNEN, L. A.; AFSHARI, 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.

ROSA, C. M.; CASTILHOS, R. M. V.; VAHL, L. C.; CASTILHOS, D. D.; PINTO, L. F. S.; OLIVEIRA, E. S.; LEAL, O. A. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 959-967, 2009.

RUFINI, M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; OLIVEIRA, D. P.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 81-88, 2011.

RUIZ, H. A. Incremento da exatidão da análise granulométrica do solo por meio da coleta da suspensão (silte + argila). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 297-300, 2005.

SANT'ANA, E. V. P.; SANTOS, A. B.; SILVEIRA, P. M. Eficiência de uso de nitrogênio em cobertura pelo feijoeiro irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 458-462, 2011.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SOUTO, S. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efetividade de rizóbios

isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 27, p. 301-307, 2005.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº13, de 24 de março de 2011**. Diário Oficial da União - Seção 1, Brasília, Imprensa Nacional, p. 3-7, 2011.

SOARES, A. L. L.; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, J. P. A. R.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II - Feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 803-811, 2006.

SOUZA, L. A. G.; BEZERRA NETO, E.; SANTOS, C. E. D. R. S.; STAMFORD, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 207-217, 2007.

SOUZA, R. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; MACIEL, C. D.; CAMPO, R. J.; ZAIA, D. A. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 83-91, 2008.

STATSOFT. Statistica: data analysis software systems. **Tulsa: StatSoft**, 2008.

TEIXEIRA, V. I. **Aspectos agrônômicos e bromatológicos de leguminosas forrageiras na Zona da Mata Seca de Pernambuco**. Recife 2008. 53 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

XAVIER, D. F.; GOMES, F. T.; LÉDO, F. J. S.; PEREIRA, A. V. Eficiência de inoculantes de rizóbio na nodulação de alfafa em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 781-785, 2005.

XAVIER, D. P. & FRANCO, A. A. Eficiência de estirpes nativas de rizóbios em *Calopogonium mucunoides*. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 24, p. 214-221, 1995.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi obtida uma grande diversidade risobiana nas diferentes coberturas vegetais com destaque para as áreas de bosques de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*), onde foi obtida maior diversidade e maior percentual de isolados eficientes na FBN, provavelmente devido à elevada promiscuidade dessa espécie;

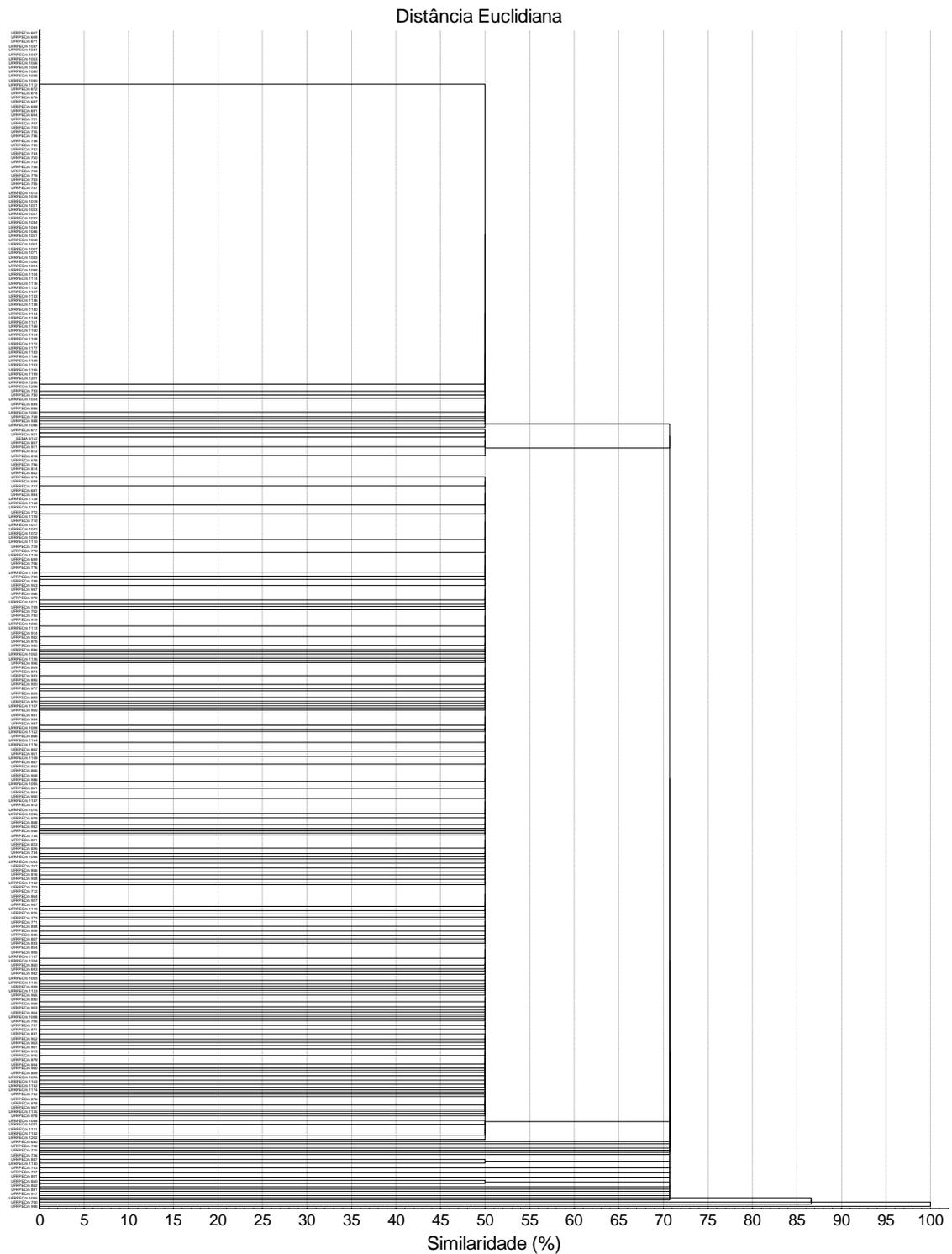
O isolamento de rizóbios provenientes de diferentes ambientes e/ou coberturas vegetais pode possibilitar a obtenção de maior diversidade de isolados, possibilitando selecionar isolados mais competitivos e eficientes na FBN que posteriormente possam ser recomendados para a produção de inoculantes;

A obtenção de estirpes de rizóbios mais competitivas e eficientes simbioticamente pode representar uma grande economia para o produtor pela não utilização de fertilizantes nitrogenados, além de evitar a contaminação dos sistemas agrícolas pelo uso indiscriminado desses fertilizantes;

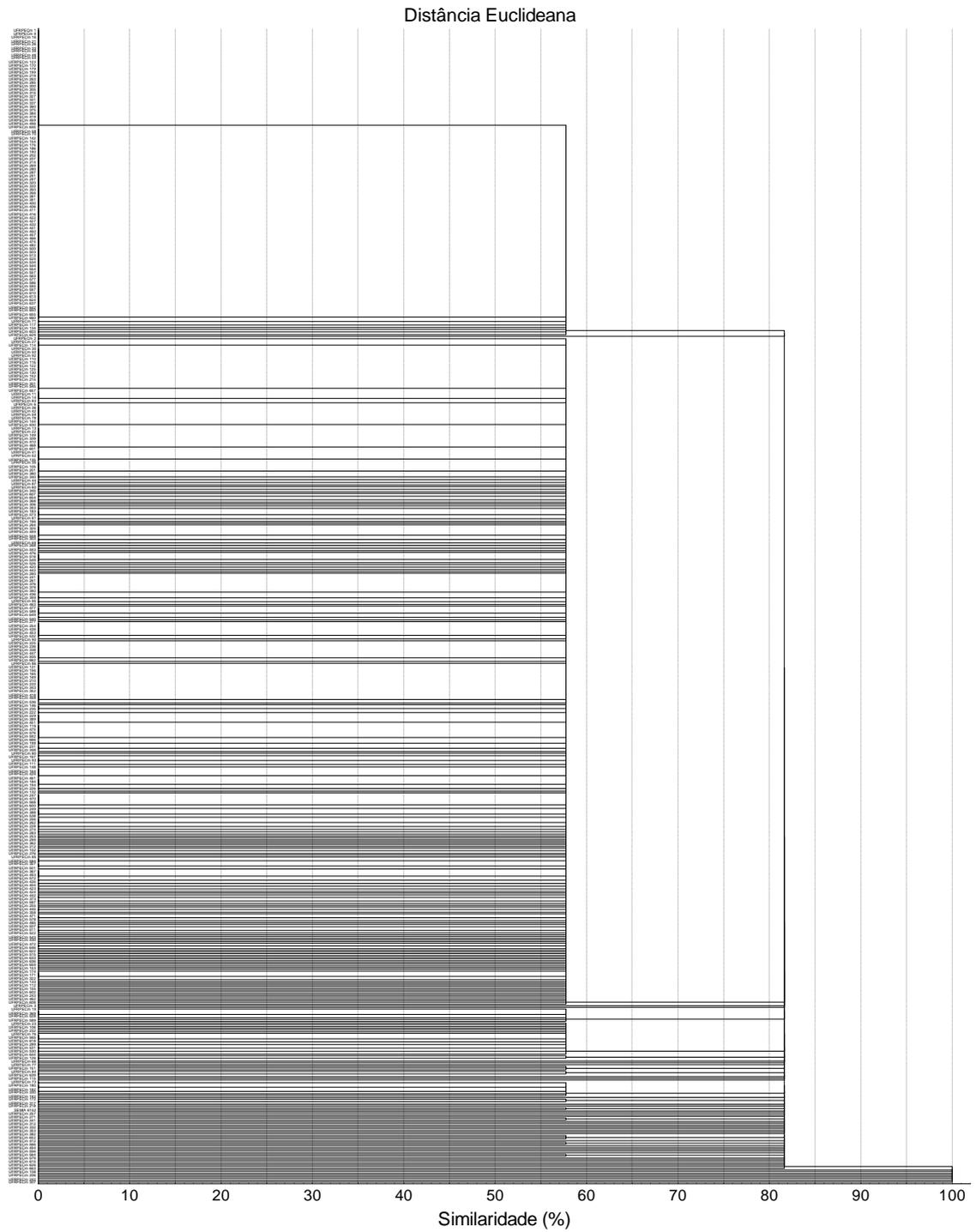
O estudo terá continuidade em nível de campo em diferentes Municípios do Estado de Pernambuco para que se possa avaliar o comportamento desses isolados quanto à adaptabilidade às condições edafoclimáticas, competitividade e eficiência simbiótica, para que os isolados mais eficientes na FBN possam ser recomendados para a produção de inoculante para o calopogônio.

Apêndice

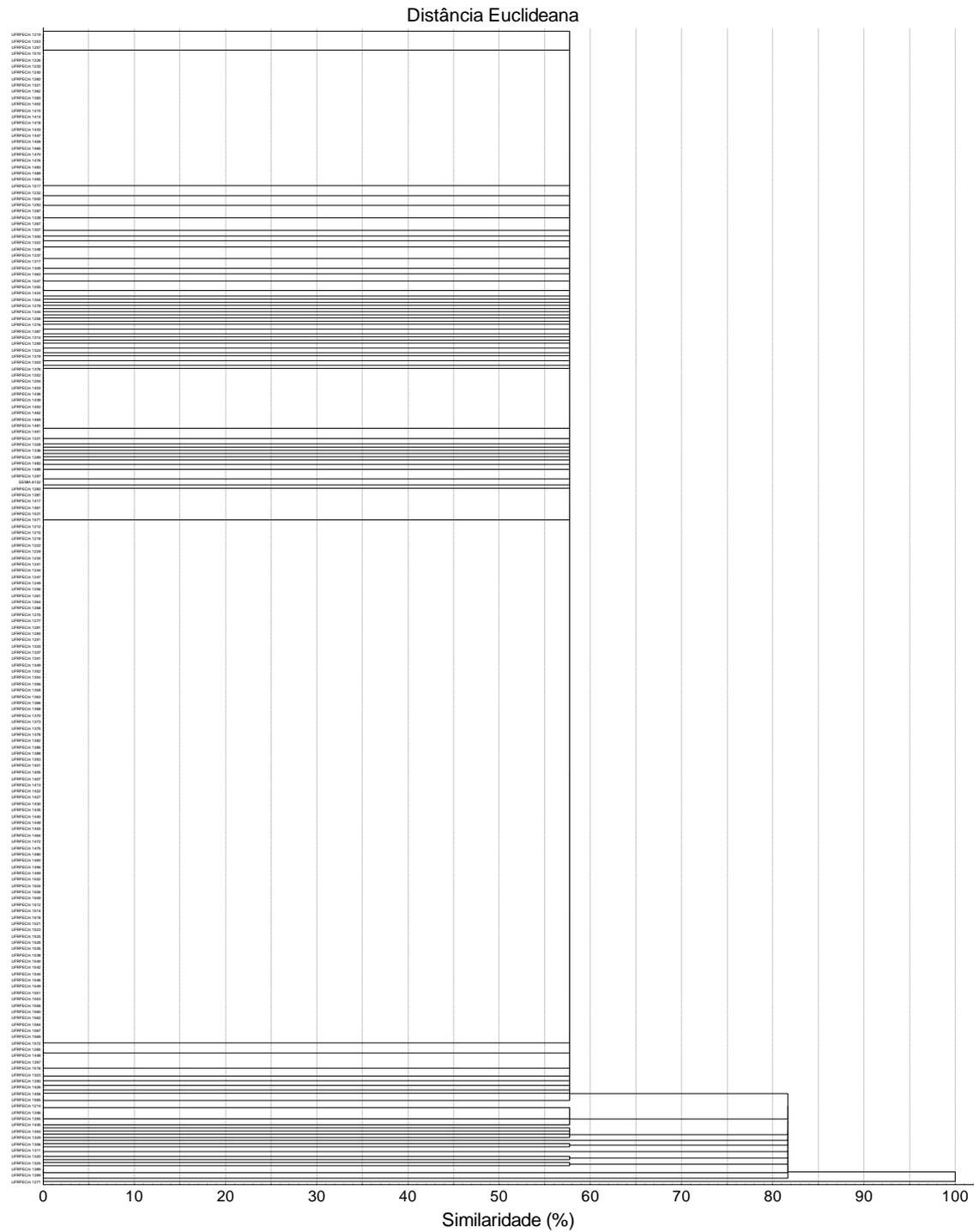
Apêndice 1: Dendrograma das características morfológicas dos isolados de rizóbio de pastagem de *Brachiaria decumbens*, através do método UPGA (unweighted pair group average) usando o índice de distância euclidiana como coeficiente de similaridade.



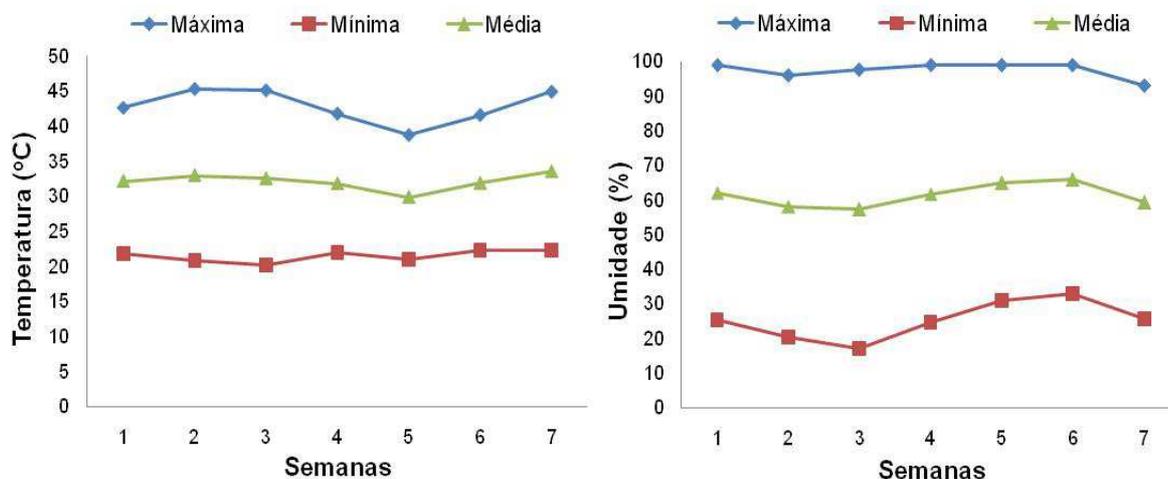
Apêndice 2: Dendrograma das características morfológicas dos isolados de rizóbio de bosque de sabiá, através do método UPGA (unweighted pair group average) usando o índice de distância euclidiana como coeficiente de similaridade.



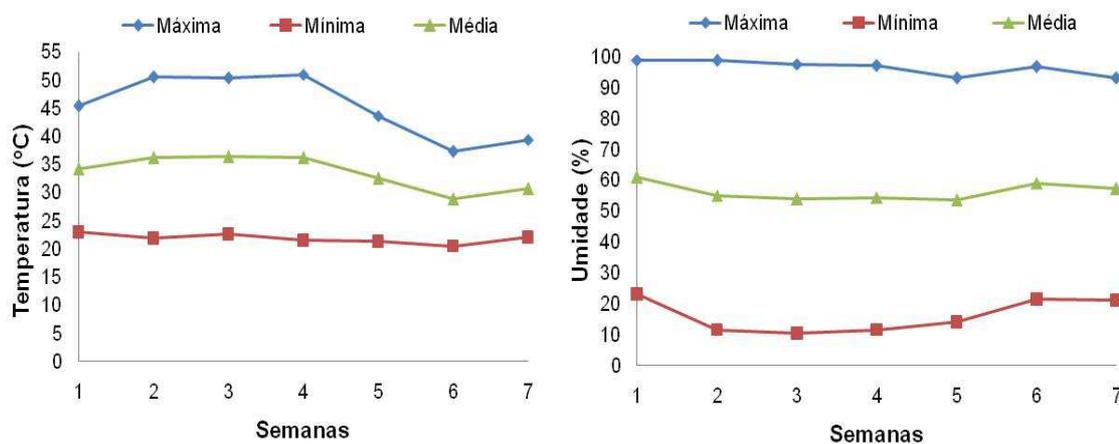
Apêndice 3: Dendrograma das características morfológicas dos isolados de rizóbio de solo de Mata Atlântica, através do método UPGA (unweighted pair group average) usando o índice de distância euclidiana como coeficiente de similaridade.



Apêndice 4: Temperatura (°C) e Umidade relativa do ar (%) máxima, mínima e média semanal durante o período de condução do experimento de eficiência simbiótica em areia:vermiculita em ambiente protegido.



Apêndice 5: Temperatura (°C) e Umidade relativa do ar (%) máxima, mínima e média semanal durante o período de condução do experimento de eficiência simbiótica em solo em ambiente protegido, no primeiro ciclo.



Apêndice 6: Temperatura (°C) e Umidade relativa do ar (%) máxima, mínima e média semanal durante o período de condução do experimento de eficiência simbiótica em solo em ambiente protegido, no segundo ciclo.

