



UNIVERSIDADE JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E PROTECÇÃO VEGETAL

**TRABALHO DE FIM DE CURSO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
LICENCIATURA EM ENGENHARIA AGRONÓMICA**

**EFEITO DE DIFERENTES ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM* NO CRESCIMENTO
E DESENVOLVIMENTO DO FEIJÃO MACUNDE (*Vigna unguiculata* L.) NAS
CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DA FAZENDA EXPERIMENTAL DA FCA**

Autor: JOSÉ GOMES DE ALMEIDA TOMÁS NGANDU

Nº de Registo: 0365/2015

Huambo, Dezembro 2016

UNIVERSIDADE JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E PROTECÇÃO VEGETAL

TRABALHO DE FIM DE CURSO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
LICENCIATURA EM ENGENHARIA AGRONÓMICA

EFEITO DE DIFERENTES ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM* NO CRESCIMENTO
E DESENVOLVIMENTO DO FEIJÃO MACUNDE (*Vigna unguiculata* L.) NAS
CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DA FAZENDA EXPERIMENTAL DA FCA

Autor: JOSÉ GOMES DE ALMEIDA TOMÁS NGANDU

Orientador: Doutor Ginhas Alexandre Manuel, Professor Associado da Faculdade de
Ciências Agrárias da Universidade José Eduardo dos Santos

Co-orientador: Eng^a. Orlis Bárbara Alfonso L. de Mola, Assistente da Faculdade de
Ciências Agrárias da Universidade José Eduardo dos Santos

Nº de Registo: 0365/2015

Huambo, Dezembro 2016

APOIO



FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS



Este trabalho foi realizado no âmbito do Projecto SASSCAL.

Dedicatória

A DEUS, à minha Família e Amigos!

Agradecimentos

A **Deus**, por tudo, a minha amada **Família**, aos meus queridos **Tutores**, Professor Doutor Ginhas Alexandre Manuel e Professora Orlis Bárbara Alfonso Loret de Mola. A todos os meus **Amigos** e **Colegas**, ao meu Camarada Francisco Joaquim da Costa. A todo o pessoal Docente e Discente da FCA. Ao Professor André Ndjamba por ter disponibilizado o seu tempo e saber contribuindo no na análise estatística dos dados. A todos que de forma directa ou indirecta contribuíram para a efectivação deste trabalho, o meu mais profundo sentimento de gratidão! Muito obrigado!

RESUMO

O presente trabalho teve como objectivo avaliar o efeito de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*, no crescimento e desenvolvimento do feijão macunde (*Vigna unguiculata* L.) nas condições edafoclimáticas da fazenda experimental da FCA. Foi montado um ensaio em condições de campo, em blocos casualizados com três repetições, usando cinco tratamentos (T1-Feijão macunde + N₂ + P₂O₅ + K₂O; T2-Feijão macunde + P₂O₅ + K₂O; T3-Feijão macunde + R55 + P₂O₅ + K₂O; T4-Feijão macunde + R63 + P₂O₅ + K₂O; T5-Feijão macunde + USDA3384 + P₂O₅ + K₂O). Foram avaliados a altura das plantas, o diâmetro do caule, o número de nódulos, a massa fresca e seca dos nódulos, a coloração dos nódulos, a massa fresca e seca da parte aérea e o número de folhas. Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância e correlação, empregando-se o programa de análise estatística INFOSTAT e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p < 0,05). Interessa ressaltar que de modo geral a estirpe *Bradyrhizobium* R63 apresentou melhores resultados em todas as variáveis analisadas, quando comparada com as estirpes *Bradyrhizobium* USDA3384 e *Bradyrhizobium* R55. Estes resultados permitiram concluir que a estirpe *Bradyrhizobium* R63 apresentou maior efectividade relativa na nodulação e consequentemente melhor efeito no crescimento e desenvolvimento do feijão macunde nas condições edafoclimáticas da fazenda experimental da FCA, em Ngongoinga.

Palavras-chave: Feijão macunde, FBN, *Bradyrhizobium*, Nodulação.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of different strains of *Bradyrhizobium* on the growth and development of bean macunde (*Vigna unguiculata* L.) leaf under the edaphoclimatic conditions of the experimental farm of the FCA. An essay in field conditions was mounted in randomized blocks with three replications, using five treatments (T1-bean-macunde + N + P_2O_5 + K_2O ; T2-bean-macunde + P_2O_5 + K_2O ; T3-bean-macunde + R55 + P_2O_5 + K_2O ; T4-bean-macunde + R63 + P_2O_5 + K_2O ; T5-bean-macunde USDA3384 + P_2O_5 + K_2O). Plant height were evaluated, stem diameter, number of nodes, fresh and dry weight of nodules, discoloration of nodules, fresh weight and shoot dry and number of leaves. The experimental data were subjected to analysis of variance and correlation, using the statistical analysis program INFOSTAT and means were compared by Tukey test ($p < 0,05$). Interests to emphasize that generally the *Bradyrhizobium* R63 strain showed better results in all variables compared with *Bradyrhizobium* USDA3384 and *Bradyrhizobium* R55 strains. These results showed that the *Bradyrhizobium* R63 strain showed greater effectiveness on the nodulation and consequently better effect on growth and development of bean macunde in edaphoclimatic conditions of the Experimental Farm FCA, in Ngongoinga.

Key-words: Bean macunde, FBN, *Bradyrhizobium*, nodulation.

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO.....	1
Problema científico.....	2
Objectivo geral.....	2
Objectivos específicos.....	2
Hipótese.....	3
1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	4
1.1. A cultura do feijão macunde (<i>V. unguiculata</i> L.)	4
1.1.1. Origem e importância sócio-económica	4
1.1.2. Taxonomia e características botânicas.....	4
1.1.3. Estádios fenológicos	5
1.1.4. Exigências edafoclimáticas.....	6
a) Solo.....	6
b) Temperatura.....	6
c) Luz.....	6
d) Humidade.....	6
1.1.5. Exigências nutricionais	7
1.1.6. A cultura do feijão macunde em Angola	7
1.2. O nitrogénio no sistema solo-planta	8
1.2.1. Formas do nitrogénio no solo	9
1.2.2. Perdas de nitrogénio no sistema solo-planta.....	10
1.2.3. Ganhos de nitrogénio no sistema solo-planta	11
1.3. Rizóbios.....	12
1.3.1. Taxonomia dos rizóbios.....	12
1.3.2. Ecologia dos rizobios.....	13

1.3.3. Condições para o desenvolvimento dos rizóbios	14
1.4. Fixação Biológica do Nitrogénio (FBN)	14
1.4.1. O processo de nodulação	15
1.4.2. Eficiência da fixação biológica do nitrogénio	16
1.4.3. Importância da FBN para a agricultura.....	17
1.5. Inoculação.....	18
1.5.1. Tipos de inoculantes	18
1.5.2. Técnicas de inoculação	18
1.5.3. Vantagens da inoculação.....	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1. Caracterização da área de estudo.....	20
2.1.1. Características edafoclimáticas	20
2.1.2. Aspectos sócioeconómicos	21
2.2. Descrição Metodológica	21
2.2.1. Características climáticas durante o ensaio.....	22
2.2.2. Delineamento Experimental.....	23
2.2.3. Tratamentos avaliados	24
2.2.4. Cultivar utilizada.....	23
2.2.5. Instalação dos ensaios	24
2.2.6. Inoculação das sementes	24
2.2.7. Operações culturais.....	26
2.2.8. Variáveis avaliadas	26
2.2.9. Análise estatística.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1. Altura das plantas (AP).....	30
3.2. Diâmetro do caule (DC)	31

3.3. Número de nódulos (NN)	32
3.4. Coloração dos nódulos (CN)	33
3.5. Massa fresca dos nódulos (MFN)	33
3.6. Massa seca dos nódulos (MSN).....	34
3.6.1. Avaliação da massa seca dos nódulos nos dias de amostragem	35
3.7. Massa fresca da parte aérea (MFPA).....	37
3.8. Massa seca da parte aérea (MSPA)	38
3.9. Número de folhas (NF).....	39
3.10. Efectividade relativa das estirpes (Efr).....	40
CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	42
CONCLUSÕES	42
RECOMENDAÇÕES.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	

Índice de Figuras	Pag.
Figura 1. Vista aérea (Google Earth) da área de estudo.....	20
Figura 2. Comportamento da temperatura durante os meses de ensaio no ano de 2015.....	22
Figura 3. Comportamento da Temperatura durante os meses de ensaio no de 2016	22
Figura 4. Comportamento da humidade relativa (HR) durante os meses de ensaio no ano de 2015.....	23
Figura 5. Comportamento da humidade relativa (HR) durante os meses de ensaio no ano de 2016.....	23
Figura 6. Comportamento da pluviosidade (P) durante os meses de ensaio no ano de 2015.....	23
Figura 7. Comportamento da pluviosidade (P) durante os meses de ensaio no ano 2016.....	23
Figura 8. Inoculantes (turfosos) de <i>Bradyrhizobium</i> R55, R63 e USDA3384 respectivamente.....	25
Figura 9. Preparação do material aderente	26
Figura 10. Colocação do inoculante turfoso no recipiente com sementes.....	26
Figura 11. Sementeira do feijão macunde.....	26
Figura 12. Raiz do feijão macunde com nódulos.....	27
Figura 13. Determinação da MSN em uma balança digital analítica.....	28
Figura 14. Valor médio da altura das plantas (AP) nos diferentes tratamentos entre os anos 2015 e 2016.....	30
Figura 15. Valor médio do diâmetro do caule (DC) nos diferentes tratamentos entre os anos 2015 e 2016.....	31
Figura 16. Valor médio do Número de nódulos para os diferentes tratamentos	32
Figura 17. Valor médio da massa fresca dos nódulos (MFN) para os diferentes tratamentos.....	34
Figura 18. Valor médio da massa seca dos nódulos para os diferentes tratamentos.....	35
Figura 19. Valores médios da massa seca dos nódulos nos diferentes dias de amostragem, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 dias após a emergência (DAE)	36

Figura 20. Valor médio da massa fresca da parte aérea (MFPA) para os diferentes tratamentos.....	38
Figura 21. Valor médio da massa seca da parte aérea (MSPA) para os diferentes tratamentos.....	38
Figura 22. Valor médio do número de folhas para os diferentes tratamentos.....	39
Figura 23. Percentagem de MSPA para as estirpes estudadas em relação ao tratamento T1 (adubado).....	40

Índice de Quadros

Quadro 1. Estádios fenológicos do feijão macunde.....	5
Quadro 2. Recomendação de adubação química (kg ha ⁻¹) para a cultura do feijão macunde com base nos resultados da análise química do solo	7
Quadro 3. Característica química e física do solo da área de estudo.....	21
Quadro 4. Tratamentos estudados e sua respectiva descrição.....	24
Quadro 5. Resultado da análise da variância para a coloração dos nódulos (CN) nos diferentes tratamentos.....	33
Quadro 6. Resultado da análise da variância para MSN nos diferentes dias de amostragem (DAE).....	37

INTRODUÇÃO

O feijão macunde ou feijão-frade (*V. unguiculata* L.) é cultivado em todo o mundo não só como legume de grãos frescos e secos, mas também como vegetal, cultura de cobertura e forragem. Tem vários nomes locais, incluindo feijão-frade (Portugal), feijão-caupi (Brasil), feijão nhemba (Moçambique) e feijão macunde (Angola). Internacionalmente é também conhecido como feijão de corda, feijão boca preta, feijão de olho preto, feijão ervilha de vaca, feijão de boi ou feijão da China, entre outros (Dumet *et al.*, 2008).

Esta cultura é de extrema importância por ser uma excelente fonte de proteínas (23-25% em média), carboidratos (62%, em média), vitaminas e minerais, além de possuir uma grande quantidade de fibras dietéticas e baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2%, em média) (Frota *et al.*, 2008).

Apesar da importância económica e social para a população rural na região ocidental de África, na qual Angola se encontra, o feijão macunde apresenta baixa produtividade média, e uma das causas é a baixa disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente o nitrogénio (N). A adopção de técnicas como o uso de inoculantes de rizóbios eficientes, poderia suprir as necessidades de N da planta (Silva *et al.*, 2006; Boddey *et al.*, 2013).

Entre os sistemas biológicos envolvendo planta e microrganismos, a simbiose leguminosa e bactérias diazotróficas simbiotes, denominadas de rizóbios, é a de maior expressão económica, resultando uma excelente alternativa à fertilização química, já que os rizóbios têm a capacidade de formar estruturas altamente específicas na raiz e caules da planta hospedeira, conhecidas como nódulos, onde ocorre a conversão de N atmosférico à amónia, conhecida como “Fixação Biológica do Nitrogénio” (FBN) (Liu *et al.*, 2005; Zilli *et al.*, 2006; Oliveira, 2009).

O feijão macunde é nodulado por bactérias do género *Bradyrhizobium*, capazes de reduzir o nitrogénio atmosférico (N₂) e transferi-lo para a planta na forma de amónia através da FBN, constituindo uma das formas de incrementar a sua produtividade, reduzindo ou eliminando os custos com adubos nitrogenados solúveis. A FBN tem sido bastante explorada através da adopção de práticas de inoculação das sementes com estirpes eficientes de bactérias do grupo rizóbio, com o intuito de elevar a produtividade desta cultura, baixar os custos de produção e elevar a renda do produtor (Zilli *et al.*, 2009).

Um dos exemplos mais bem sucedidos de FBN é o caso da soja no Brasil, onde a utilização de inoculantes com *Bradyrhizobium* tem proporcionado uma economia em 80% a 95% da necessidade da cultura (Rumjanek, 2005; Hungria *et al.*, 2006).

Estudos comprovam que o rendimento do feijão macunde pode ser aumentado com a inoculação de estirpes seleccionadas através da avaliação de populações nativas, assim, a identificação de combinações simbióticas mais eficientes com a planta hospedeira permite a produção de inoculantes comerciais de qualidade, na substituição de fertilizantes nitrogenados (Rahmeier, 2009).

A simbiose rizóbio-leguminosa tem sido estudada em Angola em trabalhos de fim do curso de licenciatura em engenharia agrónómica na Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) no Huambo, usando como inoculante estirpes provenientes do Brasil e testadas em culturas como a soja e feijão comum. Entre estes estudos constata-se que os resultados de um modo geral não têm sido satisfatórios, sendo umas das principais causas a fraca adaptabilidade das estirpes em condições de clima e solo do Huambo.

Deste modo, no presente trabalho objectivou-se avaliar o efeito das estirpes de *Bradyrhizobium* R55, *Bradyrhizobium* R63 (nativas de Angola) e *Bradyrhizobium* USDA3384, esta última proveniente do Brasil, no crescimento e desenvolvimento do feijão macunde nas condições edafoclimáticas da fazenda experimental da FCA.

Problema científico

Qual será o efeito das estirpes de *Bradyrhizobium* no crescimento e desenvolvimento do feijão macunde nas condições edafoclimáticas da fazenda experimental da FCA?

Objectivo geral

Avaliar o efeito das diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* no crescimento e desenvolvimento do feijão macunde nas condições edafoclimáticas da fazenda experimental da FCA.

Objectivos específicos

- Avaliar o crescimento e desenvolvimento do feijão macunde nos tratamentos propostos.
- Identificar a estirpe de *Bradyrhizobium* mais eficiente em simbiose com o feijão macunde nas condições edafoclimáticas da fazenda experimental da FCA.

Hipótese

Se, inocular-se as sementes de feijão macunde com *Bradyrhizobium* R55, *Bradyrhizobium* R63 e *Bradyrhizobium* USDA3384 e avaliar-se o seu crescimento e desenvolvimento nos tratamentos propostos, poder-se-á determinar qual das estirpes proporciona maior eficiência simbiótica com a cultura em causa, podendo recomendá-la para os solos da província do Huambo.

1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

1.1. A cultura do macunde (*V. unguiculata* L.)

1.1.1. Origem e importância sócio-econômica

O feijão macunde é nativo de África, sendo bastante cultivado nas regiões tropicais dos continentes africano, asiático e americano. Esta cultura é uma das leguminosas mais extensamente adaptada, versátil e nutritiva, vem se tornando produto de importância agrícola pelas suas características nutricionais, representando uma fonte alternativa de proteína, sendo um dos principais produtos de subsistência para a população de baixa renda (Freire Filho *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006).

Entre os maiores produtores mundiais de feijão macunde, destacam-se a Nigéria, com uma produção anual aproximada de 1,2 milhões de toneladas, o Níger, com pouco mais de um milhão de toneladas, e o Brasil, com cerca de 820 mil toneladas (FAO, 2012).

No mundo estima-se que esta cultura ocupe uma área de 12,5 milhões de hectares, sendo produzidos cerca de 3 milhões de toneladas por ano. Aproximadamente 64% da área ocupada a nível mundial (8 milhões de hectares) está localizada na parte oeste e central da África. O restante é representado pela América do Sul, América Central e Ásia, com pequenas áreas espalhadas pelo sudoeste da Europa, sudoeste dos Estados Unidos e Oceania (Freire Filho, 2011).

1.1.2. Taxonomia e características botânicas

O feijão macunde (também denominado de feijão-frade) é uma dicotiledônea pertencente ao reino *Plantae*, divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboidea*, tribo *Fhaseoleae*, subtribo *Fhaseolinae*, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) (Onofre, 2008).

É uma cultura anual, apresentando germinação epígea, com seus cotilédones inseridos no primeiro nó do ramo principal. O seu sistema radicular é axial, com raízes superficiais, porém, podem atingir 2,0 m de profundidade, característica que confere à espécie tolerância a períodos extensos sem irrigação. Nas suas raízes é comum encontrar nódulos que auxiliam na absorção de nitrogênio através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada por micro-organismos genericamente conhecidos como rizóbios (Chagas Júnior *et al.*, 2009).

Quanto ao porte, as plantas de feijão macunde são divididas em porte erecto, semierecto, semiprostrado e prostrado (Freire Filho *et al.*, 2005).

1.1.3. Estádios fenológicos

Apesar de a espécie *V. unguiculata* ser relativamente bem estudada, há poucas informações quanto às suas fases de desenvolvimento. O conceito de tempo termal, em substituição ao do tempo cronológico, tem sido utilizado com frequência, com a vantagem de não depender do local e época de sementeira. Segundo estudos realizados por Moura *et al.* (2012) descreve as diferentes fases fenológicas, relacionando a quantidade de graus-dia com as mesmas, verificando que o número de estádios vegetativos é indefinido.

Campos *et al.* (2000), descrevem para o feijão macunde, os seguintes estágios fenológicos:

Quadro 1. **Estádios fenológicos do feijão macunde.**

Estádio	Descrição	DAE Cum.
VE	Emergência dos cotilédones.	4
VC	Primeiro nó com folhas unifolioladas (cotiledonares) abertas,	9
V3	Segundo nó do ramo principal com folíolos completamente abertos.	10
V6	Terceiro nó do ramo principal com folíolos completamente abertos.	20
Vn	N número de nós do ramo principal com folíolos completamente abertos.	...
R1	Surgimento dos primórdios florais - pré-floração.	30
R2	Surgimento da primeira flor aberta – floração.	40
R3	Surgimento da primeira vagem - pré-frutificação.	50
R4	Início do enchimento dos grãos – frutificação.	60
R5	Vagens com grãos desenvolvidos.	70
R6	Maturidade de aproximadamente 50% das vagens da planta (R6).	80

Fonte: Campos *et al.* (2000).

1.1.4. Exigências edafoclimáticas

Solo

Pode ser cultivado em qualquer tipo de solo, obtendo bons resultados em solos que apresentam regular teor de matéria orgânica. Solos com baixo índice de fertilidade podem ser cultivados, desde que as necessidades nutricionais forem subsidiadas por fertilizantes (Embrapa, 2004).

O feijão macunde cresce melhor em solos franco-arenosos com pH neutro, boa drenagem, em terrenos planos ou com pouca inclinação. Também tolera solos ácidos e alcalinos (Dumet *et al.*, 2008).

Temperatura

A cultura do feijão macunde desenvolve-se bem em temperaturas entre 18 e 30°C. Temperaturas superiores a 35°C acarretam prejuízos à cultura, como aborto espontâneo das flores, retenção das vagens na planta, diminuição significativa do número de sementes por vagem e, conseqüentemente, redução da produtividade (Embrapa, 2004; Campos *et al.*, 2010).

Luz

Em relação à actividade fotossintética, o feijão macunde é classificado como uma planta do tipo C3, ou seja, possui apenas o mecanismo de carboxilação chamado de processo redutivo da pentose-fosfato (ciclo de Calvin ou ciclo de Benso-Calvin). Por meio desse mecanismo a planta de feijão macunde fixa o CO₂ atmosférico metabolizando-o em compostos orgânicos que vão compor a estrutura da planta, formada em mais de 90% por compostos de carbono e em menos de 10% por elementos minerais. Sendo uma planta C3, o feijão macunde satura-se fotossinteticamente a intensidades de luz relativamente baixas, isto é, entre 10.000 e 40.000 lux (Cardoso *et al.*, 2000).

Humidade

A exigência hídrica do feijão macunde para a obtenção de altas produtividades é de 300 a 400 mm durante todo o seu ciclo (Doorenbos e Kassam, 2000). O requerimento de água, entretanto, não é constante em todos os estádios de desenvolvimento, aumenta de um valor mínimo na germinação até um valor máximo na floração e na formação das vagens, que decresce a partir do início da maturação (Nóbrega *et al.*, 2001).

Entre as plantas classificadas como moderadamente tolerantes ao déficit hídrico, destaca-se o feijão macunde uma espécie de ampla distribuição mundial, sobretudo em regiões tropicais, por apresentarem condições edafoclimáticas semelhantes às do seu provável berço de origem, no continente africano (Freire Filho *et al.*, 2005).

1.1.5. Exigências nutricionais

A cultura do feijão macunde é bastante exigente em relação ao suprimento de nitrogénio, isso porque a maior parte deste nutriente, índices que atingem 50% do total absorvido pela planta, é exportado para os grãos (Santos e Silva, 2002).

Segundo Dumet *et al.* (2008), sendo uma leguminosa, o feijão macunde fixa o seu próprio nitrogénio atmosférico e por isso não necessita deste fertilizante. Aplicar fertilizante fosfatado: super fosfato simples (SSP) a 60 kg/ha ou super fosfato triplo (TSP) a 25 kg ha⁻¹. Conforme o resultado da análise química do solo, pode-se recomendar a adubação para esta cultura conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2. Recomendação de adubação química (kg ha⁻¹) para a cultura do feijão macunde com base nos resultados da análise química do solo.

Época	N	P ₂ O ₅			K ₂ O		
		P no solo mg dm ⁻³			K no solo mg dm ⁻³		
		0 - 5	6 - 10	> 10	0 - 25	26 - 50	> 50
Sementeira	--	60	40	20	40	30	20
Cobertura	20	--			--		

(Andrade Júnior *et al.*, 2002).

1.1.6. A cultura do feijão macunde em Angola

O feijão macunde, em nível de exploração camponesa, em Angola é tipicamente uma cultura regional de consumo directo do agregado familiar, que lhe dedica áreas de cultivo de acordo com as suas necessidades. A distribuição do cultivo é muito dispersa e encontra-se

frequentemente associado a outras culturas sobretudo ao milho nas áreas de incidência deste cereal e a mandioca na parte setentrional do território angolano. Porém, o interesse desta cultura transcende o âmbito da lavoura do camponês, dado o seu interesse, também como planta melhoradora do solo (Diniz, 1991).

Em Angola, as zonas com temperatura média anual acima de 21 °C, mais apropriadamente entre 21 °C e 25 °C e fraca oscilação térmica diária; valores moderados de precipitação anual mais frequentemente compreendidos entre 800 mm e 1200 mm, com um ciclo biológico coincidente com o período de máximas chuvas entre Fevereiro a Maio, são as que ecologicamente se mostram mais favoráveis à cultura (Diniz, 1991).

Em trabalho realizado por Pedro (2007), sobre uso, manejo e caracterização de agricultores e de variedades locais (angolanas) de feijão macunde, relata que o cultivo é feito regularmente de Outubro a Dezembro em consociação com outras culturas. A consociação de variedades do tipo de crescimento arbustiva ofereceu maior facilidade de serem consorciadas com o milho, ao contrário das variedades do tipo prostrados que devidos às suas características, dificilmente foram consorciadas com outros cultivos. A maior parte dos produtores utiliza sistemas de consorciação baseada em linhas separadas. Mas, outros produtores, como na região do Quipungo na Huíla e Namibe, colocam na mesma cova sementes de milho e macunde. Este último sistema foi também encontrado na região do Dande na província do Bengo. Ainda o mesmo autor relata que, entre os agricultores entrevistados, alguns preferem cultivar a variedade precoce *Ohesse* ou *Titai* como é conhecida localmente em Benguela, *ohesse*, no Huambo, *thyndai* ou *kanjagala*, na Huíla e *mukassa* na localidade do Ambriz, no Bengo. Isso ocorre porque os agricultores consideram mais fácil consociar o feijão com o milho, o que lhes permite realizar dois cultivos por ano (Março a Junho e Outubro a Janeiro) e a colheita ocorrer em época sem chuvas, evitando a sua perda no campo. Enquanto as variedades tardias, também conhecidas localmente por *akunde*, *tandavale*, em Benguela, *akunde*, *onhâle*, no Huambo e Huíla, *akunde* e *kapradanda*, no Bié e *macoma*, ou *sondama*, no Namibe, é consociada com a massambala (sorgo) por possibilitar a sua colheita na mesma época.

Ainda segundo o mesmo autor, as sementes de feijão macunde são armazenadas principalmente na forma de grãos (81%), com maior destaque para as províncias da Huíla (100%), Bengo (94%), Namibe (90%) e Bié (89%). O armazenamento é feito principalmente dentro de casa (72% dos casos). Os lugares de armazenamento são em cima (4%), penduradas em árvores (7%) e guardadas em outros lugares que incluem celeiros ou utensílios suportados

por paus (17%). Na província do Bengo, 100% das sementes são guardadas dentro de casa, seguida das Províncias do Huambo e Huíla com 91% e 73%, respectivamente (Pedro, 2007).

1.2. O nitrogénio no sistema solo-planta

O N que pode ser disponibilizado às plantas e que define o potencial produtivo das culturas provém do ar atmosférico, no caso da maioria das leguminosas, da matéria orgânica do solo, da reciclagem dos resíduos de culturas anteriores e dos fertilizantes nitrogenados de origem mineral ou orgânica (Kluthcouski *et al.*, 2005).

1.2.1. Formas do nitrogénio no solo

Segundo Santos (2012), o N encontra-se no solo em formas minerais (inorgânicas) e orgânicas. As formas minerais têm uma representação muito reduzida, na ordem de 2% a 5%, incluem diversas combinações químicas constituídas por moléculas e iões. Nas moléculas, o N mineral encontra-se sobretudo na forma de gases, nomeadamente o N livre (N_2), pequenas quantidades de amoníaco (NH_3), não protolizado, e óxido de N, tais como o dióxido de N (NO_2), o óxido nítrico ou monóxido de N (NO), e o óxido nitroso ou monóxido de di-N (N_2O). Na forma de ião, o N encontra-se sobre tudo nas formas de amoníaco (NH_4^+), Nitratião (NO_3^-), e Nitritião (NO_2^-). O NH_4^+ e o NO_3^- constituem (como já se disse) as principais formas sob as quais o N é absorvido pela planta através das raízes. O NO_2^- tem no solo, em condições normais, uma reduzida permanência. Aliás, quando tal não acontecer, as culturas podem sofrer intoxicação uma vez que, a partir de certas concentrações (variáveis com a planta e com outros constituintes do solo), o NO_2^- é fitotóxico (recorda-se que NH_4^+/NH_3 , quando se acumula em grande quantidade na rizosfera – o que acontecerá se forem aplicadas elevadas quantidades de N em condições que favorecem mais a sua transformação em NH_4^+/NH_3 , do que em NO_3^- – também é fitotóxico). De notar que normalmente a representação de NH_4^+ é muito inferior à do NO_3^- , uma vez que é imobilizado em maior extensão na fase de imobilização e também porque, em condições normais, tende a ser nitrificado.

As formas orgânicas estão em largo predomínio, representando, em geral, 95% a 98% do N total do solo. Trata-se de macromoléculas relativamente complexas, em que predominam aminoácidos e proteínas associadas a lenhinas, açúcar e partículas de argila. Estas formas não são, praticamente, absorvidas pela planta. Este facto, associado à sua reduzida solubilidade em água (o que faz que o arrastamento não ocorra por infiltração mas apenas por erosão), leva

a atribuir ao N orgânico uma função de reserva, servindo de substrato para a formação de N mineral (Santos, 2012).

Formas orgânicas de nitrogênio são abundantes nos solos, entretanto indisponíveis às plantas, uma vez que as reservas minerais desse elemento são relativamente raras (Newton, 2000).

Na maioria dos solos agrícolas existe uma conversão contínua de nitrogênio orgânico a nitrato, durante a decomposição da matéria orgânica. Como as plantas podem incorporar o nitrogênio a partir da absorção de nitratos, os fertilizantes nitrogenados viabilizam a nutrição vegetal, disponibilizando este nutriente no solo (Rahmeier, 2009).

1.2.2. Perdas de nitrogênio no sistema solo-planta

Autores relatam as principais formas de perdas de nitrogênio no solo, dentre elas a volatilização, lixiviação e as perdas através das folhas da planta:

Volatilização

Quando aplicado na forma de ureia ou sulfato de amônio, essas substâncias são voláteis, o nutriente se perde para a atmosfera na forma gasosa (Duarte *et al.*, 2007).

Lixiviação

O anião nitrato (NO_3^-) tem baixa interação química com os minerais do solo, a predominância de cargas negativas no solo, ou pelo menos nas camadas superficiais dos solos tropicais, e a baixa interação química do NO_3^- com os minerais do solo fazem com que o NO_3^- esteja sujeito a lixiviação para as camadas mais profundas, podendo atingir as águas superficiais ou o lençol freático. A lixiviação do NO_3^- tem uma estreita dependência da quantidade de água que percola no perfil do solo, a estrutura do solo também afecta a lixiviação, que é maior em solos arenosos por apresentarem menor microporosidade (Novais *et al.*, 2007).

Perdas de nitrogênio através das folhas

As emissões de NH_3 por plantas cultivadas são geralmente baixas, alguma atenção tem que ser dada a possibilidade de perdas de nitrogênio a partir das folhas, por volatilização do amônio em período de grande absorção de nitrogênio pela planta, seja por lixiviação pela chuva de compostos solúveis presentes nos tecidos vegetais, as evidências dessas perdas são indirectas, pois são baseadas na diminuição do conteúdo de nitrogênio na planta no final do

ciclo, que indicam a ocorrência de perdas pela parte aérea ou translocação do nitrogénio para o solo por meio do sistema radicular (Novais *et al.*, 2007).

Para além destas formas de perda, o nitrogénio também pode se perder junto com o solo através do fenómeno da drenagem externa (erosão).

1.2.3. Ganhos de nitrogénio no sistema solo-planta

Os ganhos de nitrogénio no solo, exceptuando a prática da fertilização efetuada pelo homem (adubação), podem ser através da fixação biológica (simbiótica e assimbiótica), restos de vegetais e animais e das chuvas, como relatam alguns autores:

Fixação simbiótica

É assim designado um fenómeno, através do qual as plantas da família das leguminosas essencialmente conseguem a maior parte do N directamente da atmosfera, devido a associação com bactérias do grupo rizóbio. Isso ocorre devido a uma relação simbiótica onde a planta oferece ao micro-organismo metabolitos, enquanto a bactéria se instala na raiz formando nódulos, realizando a conversão do nitrogénio atmosférico para a forma de amónia. (Figueiredo *et al.*, 2008).

Fixação não simbiótica

Diversos micro-organismos podem também fixar o N₂ sem ser através de associações simbióticas. É o caso de bactérias heterotróficas dos géneros *Clostridium*, *Azotobacter* e *Beijerinckia*, de bactérias fotossintéticas do género *Rhodospirillum*, e de algas verde-azuladas. As bactérias heterotróficas são, em geral, muito menos eficientes na fixação do N₂ do que o *Rhizobium*, fixando muito menos N por unidade de carbono consumido (cerca de 2%, enquanto no *Rhizobium* excede 5%) (Santos, 2012).

Restos vegetais e animais

Na decomposição de restos vegetais e animais, o azoto neles presente transforma-se principalmente em amónia (NH₄OH) por acção das bactérias amonificantes, a amónia formada pode ser atacada pelas bactérias nitrificantes, para produzir nitrito, este, sob a acção das nitrobacter, passa a nitrato (Conceição *et al.*, 2009).

Chuva

Ainda segundo Santos (2012), a partir da atmosfera, os solos podem receber N por intermédio das chuvas (e outras formas de precipitação). Na atmosfera, para além do N elementar, podem existir diversos compostos nitrogenados provenientes de devoluções de instalações industriais e do solo, de resíduos orgânicos finamente divididos arrastados da superfície terrestre pelo vento, de formas de N mais solúveis originadas nas descargas elétricas, etc. O contributo das chuvas para o N do solo será, naturalmente, muito variável, admitindo-se que se situe entre 1 kg por hectare e 50 kg por hectare por ano. As quantidades terão tendência a ser mais elevadas em zonas em que o ar se encontre mais poluído com compostos nitrogenados e quando ocorram trovoadas.

Parte do nitrogénio do solo é oriundo da fixação do N₂ atmosférico, quer seja por processos biológicos, industriais ou eletroquímicos. O balanço de entrada (fixação) e saída (colheita, erosão e desnitrificação) desse nutriente no solo, que constitui o ciclo biogeoquímico do nitrogénio, deve manter-se equilibrado para não afetar a sobrevivência dos demais organismos vivos existentes (Aduan *et al.*, 2004).

1.3. Rizóbios

Os rizóbios são micro-organismos presentes no solo, capazes de realizar simbiose com leguminosas com o objectivo de fixar o nitrogénio em suas raízes por meio da nodulação (Fernandes *et al.*, 2003).

1.3.1. Taxonomia dos rizóbios

Com base na taxonomia actual, os rizóbios encontram-se classificados como pertencentes a: Domínio: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Classe: *Alfaproteobacteria*; Ordem: *Rhizobiales*; e distribuído nas Famílias *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Methylobacteriaceae* (Garrity e Holt, 2001).

A taxonomia reforçou as diferenças entre os grupos de rizóbios de crescimento rápido e lento e levou à consolidação de algumas espécies dentro de cada grupo. Em 1985, dois géneros foram descritos, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Três espécies foram nomeadas para o género *Rhizobium*: *R. loti*, *R. meliloti*, *R. leguminosarum* com três biovars, *viceae*, *phaseoli* e *trifolii*. O género *Bradyrhizobium* (bradus, grego, significando lento) compreendeu todas as estirpes de crescimento lento e somente uma espécie foi nomeada: *B. japonicum*, o microsimbionte

de soja. Todas as outras estirpes de crescimento lento foram descritas como *Bradyrhizobium spp.*, ou seja, o chamado grupo caupi (macunde) ou bradirizóbios tropicais. Dentro do grupo que foi classificado como *Rhizobium*, três gêneros são reconhecidos: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Chen *et al.*, 1988).

O estudo das características culturais e morfológicas revelam uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizóbios e costuma estar relacionado com estudos a nível de DNA. Estes dados são importantes, uma vez que o conhecimento das comunidades nativas por meio destas ou de outras técnicas revelam-se fundamentais para se conhecer a diversidade das espécies, principal recurso para o trabalho da área da biotecnologia (Martins *et al.*, 1997).

1.3.2. Ecologia dos rizóbios

Segundo Silva (2011), os rizóbios têm como nichos ecológicos: o solo, a rizosfera de diversas plantas e nódulos em raízes de plantas leguminosas; existindo no solo e na rizosfera como bactérias saprofíticas e nas plantas leguminosas como endofíticas simbiônticas.

Rizóbios em solos compreendem uma parcela relativamente pequena da comunidade bacteriana, de aproximadamente 109 bactérias por grama de solo (Hirsch, 1996). A distribuição, densidade e diversidade de espécies de rizóbios nos solos variam com as condições ambientais, características físicas e químicas do solo e principalmente com a presença de leguminosas hospedeiras.

Na fase saprofítica, os rizóbios vivem em vida livre no solo e na rizosfera de diversas plantas, estes são heterotróficos obrigatórios, aeróbicos e podem assimilar uma ampla faixa de compostos de carbono e de nitrogênio. Como membros da microbiota do solo estão sujeitos a competir com outros micro-organismos por recursos limitados e com antagonistas, como fungos, bactérias e bacteriófagos, além de protozoários predadores de nódulos (Teixeira *et al.*, 1996; Kahindi *et al.*, 1997).

Na fase endofítica simbiôntica, o principal nicho dos rizóbios são os nódulos localizados no córtex das raízes. Entretanto, em algumas espécies de rizóbios, principalmente da tribo *Aeschynomeneae*, estes nódulos ocorrem também nos caules, considerado um nicho inespecífico. A nodulação no caule ocorre como estratégia de adaptação de leguminosas a ambientes inundados. Algumas espécies do gênero *Aeschynomene* apresentam nódulos nos caules e nas raízes com a presença de *Bradyrhizobium* fotossintéticos e esses, quando nodulando no caule produzem bacterioclorofila e carotenóides (Van Berkum *et al.*, 1995),

tornando a simbiose mais eficiente devido a pouca demanda de carboidratos originados da planta (Giraud *et al.*, 2000; Molouba *et al.*, 1999). Esses rizóbios fazem parte de um grupo de *Bradyrhizobium* que diverge dos grupos de *B. japonicum* e *B. elkanni*, denominados de *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomeneae*) (Fleischman e Kramer, 1998; Molouba *et al.*, 1999).

1.3.3. Condições para o desenvolvimento dos rizóbios

Temperatura: o desenvolvimento das colônias nodulíferas é desfavorável em temperaturas abaixo de 10°C e acima de 37°C. Temperaturas abaixo deste mínimo interferem na reprodução das bactérias, enquanto temperaturas muito altas desnaturam as proteínas formadoras do DNA, comprometendo a reprodução dos rizóbios (Xavier *et al.*, 2007).

Acidez do solo: rizóbios são sensíveis à acidez e toxicidade por alumínio (Al) e manganês (Mn). Neste caso há a necessidade de se realizar um levantamento de estirpes adaptadas a estas condições (Frigo, 2013).

Em ambientes tropicais e subtropicais é comum encontrar solos com problemas de acidez e toxicidade de alumínio e manganês que são fatores que podem afetar negativamente a simbiose rizóbio-leguminosa (Hungria e Vargas, 2000).

Os rizóbios são mais vulneráveis ao estresse quando em vida livre que em simbiose, isso porque em simbiose com a leguminosa, a planta produz um nicho específico (nódulo), no qual a bactéria fica protegida das condições ambientais. Nesse contexto, fica evidente a necessidade do melhoramento de plantas para adaptação às condições adversas do ambiente e a exploração de populações rizobianas nativas, adaptadas às condições ambientais e com capacidade de formar simbiose com essas plantas adaptadas. No momento em que se identifica a existência de genótipos de plantas e de bactérias que variam de sensíveis a tolerantes é possível encontrar diferentes combinações rizóbio-leguminosa, de modo a selecionar as simbioses mais eficientes (Chalk *et al.*, 2010).

1.4. Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é o processo realizado por microrganismos, denominados diazotróficos, que captam o nitrogênio atmosférico e o converte em amônia, forma disponível para as plantas. Esse processo é o principal meio de incorporação do nitrogênio atmosférico ao solo, sendo responsável por cerca de 65% do nitrogênio anualmente fixado na Terra (Moreira e Siqueira, 2006).

A FBN é um processo natural no qual, bactérias conhecidas como rizóbios, além de outros micro-organismos procariotos, são capazes de captar nitrogênio do ar, transformando-o em amônia, uma forma prontamente assimilável, quando associados a plantas da família Leguminosa, e capaz de contribuir para o desenvolvimento de espécies cultivadas desta família (Rumjanek, 2005).



Um exemplo comum é a simbiose mutualística realizada com bactérias do gênero *Rizhobium* que nodulam raízes de leguminosas e fixam nitrogênio a partir de reações na presença de enzimas específicas. O processo depende de factores fisiológicos da planta, que fornece ao micro-organismo subsídios de sobrevivência e nutrição como os flavonoides (Chagas Júnior *et al.*, 2009).

1.4.1. O processo de nodulação

O processo de nodulação inicia-se quando acontece um reconhecimento da combinação adequada, por parte da planta e bactéria, dando-se de seguida a adesão das bactérias aos pelos radiculares e a invasão destes. Após a invasão do pelo radicular, vai ocorrer o deslocamento da bactéria para a raiz principal através do canal de infecção (hilo). Ao chegar ao canal principal dá-se a diferenciação das bactérias num novo tipo de células bacterioides, iniciando-se a fixação de azoto, o processo de divisão das células bacterianas e vegetais é contínuo e resulta na formação de um nódulo maduro. A reacção de fixação do N caracteriza-se pela redução de N_2 (N gasoso) em formas mais absorvíveis e assimiláveis pelas plantas como o NH_3 e NO_3 que depois entram no processo de fotossíntese da planta para a produção de cadeia de proteínas necessárias, quer para a planta, quer para o rizobio. Portanto para que a reacção ocorra, é necessário que haja um transporte de electrões, mediado por moléculas aptas a realiza-lo. A enzima nitrogenase presente no rizobio é formada por duas unidades proteicas, a Ferroproteína (Fe-proteína) e a Molibdenio-Ferro-proteína (MoFe proteína), ambas capazes de transportar electrões. Durante a redução do N_2 a nitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de electrões, a ferridoxina (Fernandes e Rodrigues, 2014).

Entretanto, leguminosas tropicais normalmente são capazes de nodular com uma ampla faixa de rizóbios, o que dificulta a introdução de inoculantes contendo rizóbios eficientes, uma vez que as bactérias indígenas ou nativas são mais adaptadas e competitivas, deslocando rapidamente as estirpes dos inoculantes dos sítios de infecção (Santos *et al.*, 2006).

1.4.2. Eficiência da fixação biológica do nitrogênio

Além dos factores intrínsecos da associação simbiótica, o processo da FBN é influenciado pelas características edafoclimáticas, refletindo nas diferentes respostas em relação à sobrevivência, competitividade, faixa hospedeira, especificidade e eficiência simbiótica das estirpes usadas nos programas de inoculação de sementes (Moreira e Siqueira, 2002).

Em ambientes tropicais e subtropicais é comum encontrar solos com problemas de acidez e toxicidade de alumínio e manganês que são fatores que podem afetar negativamente a simbiose rizóbio-leguminosa (Hungria e Vargas, 2000).

A deficiência hídrica e salinidade do solo ocasionam redução da produção de biomassa, fotossíntese, nodulação, atividade da nitrogenase e conteúdos de N na parte aérea (Manchanda e Garg, 2008).

O estresse salino reduz a nodulação em leguminosas pela inibição dos eventos simbióticos iniciais, em condições de estresse ambiental, a associação simbiótica com rizóbios é uma desvantagem para as leguminosas quando comparadas as demais, uma vez que a simbiose representa um direcionamento de fotoassimilados para o rizóbio, que poderiam ser utilizados para o desenvolvimento da planta. Dessa maneira, fica evidente que a simbiose rizóbio-leguminosa é válida apenas em ambientes com deficiência de nitrogênio no solo. Sendo assim, a vantagem competitiva da leguminosa em simbiose com rizóbios pode aumentar ou diminuir dependendo das interações entre as mudanças de condições ambientes, a demanda de nitrogênio pela planta e a quantidade de nitrogênio suprida pela simbiose (Hartwig, 1998).

Em ambientes de alto teor de matéria orgânica, espécies leguminosas apresentam um menor número ou até ausência de nódulos nas plantas, ocorrendo em função do incremento do teor de nitrogênio mineral pela mineralização da matéria orgânica (Moreira e Siqueira, 2006).

De sublinhar que, quando se estabelece o par correcto bactéria/leguminosa, ou seja, se dá a inoculação com a espécie ou estirpe correcta, os nódulos formados adquirem, geralmente, uma coloração rosada ao corte (sinal da eficiência da fixação de N), devido à presença da leghemoglobina, uma forma de hemoglobina necessária para fixar o N, dando-se a verdadeira simbiose. Quando assim não acontece, e houve nodulação por espécies não indicadas, os nódulos são brancos e na verdade as bactérias estão a absorver nutrientes da planta sem fixar azoto, estabelecendo-se, na verdade uma indesejável situação de parasitismo (Fernandes e Rodrigues, 2014).

A observação de características relativas à especificidade é importante na seleção de estirpes que visem obtenção de um inoculante com maior afinidade com a planta hospedeira e que seja capaz de colonizar as raízes mais eficientemente do que as estirpes nativas (Rumjanek, 2005).

Determinadas estirpes de rizóbio e algumas espécies de leguminosas podem variar de extremamente específicas a altamente promíscua. A ausência ou o baixo número de estirpes específicas de determinado hospedeiro no solo ou a presença de populações eficazes que podem competir pelos sítios de nodulação com estirpes eficientes, tornam necessária a inoculação com estirpes selecionadas quanto à eficiência, competitividade e adaptação às condições edafoclimáticas locais. Quando a espécie nodulífera é promíscua, como o feijão caupi, torna-se mais difícil a introdução, estabelecimento e desenvolvimento da simbiose com populações eficientes. Portanto, este tem sido um dos principais entraves à maximização da FBN nesta cultura (Moreira e Siqueira, 2002).

1.4.3. Importância da FBN para a agricultura

No contexto ambiental, além de reduzir o uso de fertilizantes fabricados à base da queima de combustíveis fósseis, a FBN ao permitir o crescimento e desenvolvimento de leguminosas em diversidade de ambientes, contribui para a capacidade dessas espécies sequestrar carbono (C), visto como um meio de compensar os incrementos nos níveis de CO₂ na atmosfera, decorrentes de atividades antrópicas (Graham e Vance, 2003).

Esse processo é importante para os solos tropicais que naturalmente são deficientes em nitrogênio, e pode representar uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos nitrogenados, com as vantagens de ser economicamente viável e não causar poluição ao meio ambiente (Figueiredo *et al.*, 2008).

O feijão macunde é uma leguminosa capaz de nodular e estabelecer simbiose com diversas espécies de bactérias do grupo rizóbio, incluindo *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, entre outros (Zilli *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Moreira, 2008).

A cultura do feijão macunde pode obter quantidades significativas de N através da FBN, quando em associação simbiótica com rizóbios. O feijão macunde é geralmente nodulado eficientemente por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Zilli *et al.*, 2004).

A produtividade de grãos aumenta em mais de 30% devido à aplicação de inoculantes na cultura do feijão macunde, sendo essas inoculações capazes de substituir a adubação nitrogenada de 50-80 kg ha⁻¹ (Zilli *et al.*, 2009).

A utilização de inoculantes é uma forma ambientalmente correta de fornecimento de nitrogénio para leguminosas e outras culturas que se associam com micro-organismos diazotróficos. É também a forma mais económica de suprimento deste nutriente, a qual pode ser desenvolvida tanto por pequenos agricultores que cultivam para sua subsistência, como por grandes produtores (Frigo, 2013).

1.5. Inoculação

O processo de inoculação consiste em agregar a semente o produto inoculante contendo as bactérias fixadoras de nitrogénio (comumente chamadas de rizóbios), pois o nitrogénio é o nutriente requerido em maior quantidade pelas culturas leguminosas (Gonzaga, 2002).

1.5.1. Tipos de inoculantes

Inoculantes são definidos como sendo todo material que contém microrganismos atuando favoravelmente no desenvolvimento das plantas, sendo composto por bactérias específicas para cada espécie de leguminosa. Por este motivo, o produto preparado para uma leguminosa não pode ser utilizado em outras espécies. Sendo assim, a utilização destes produtos atua de maneira a aumentar a produtividade da cultura (Embrapa, 2007).

Segundo Chueiri *et al.* (2007), a oferta de inoculantes nos mercados internacionais é bem variada, podendo ser encontrados inoculantes turfosos, líquidos, géis, granulados e liofilizados.

1.5.2. Técnicas de inoculação

Segundo Gillis *et al.* (2008), o inoculante granulado é fornecido sobre a base de turfa aglomerada em pequenos grânulos. Permite aplicar o inoculante dentro do sulco, junto com as sementes. As doses por superfícies são maiores e se consegue inoculações massivas. Segundo o volume utilizado, este inoculante deve ser aplicado com equipamentos especiais e para o inoculante turfoso procede-se o seguinte: humedecer as sementes com solução açucarada ou outra substância adesiva, misturando bem. A distribuição da mistura açucarada-adesiva mais

inoculante nas sementes, deve ser feita, preferencialmente, em máquinas próprias, tambor giratório ou betoneira.

Os inoculantes líquidos apresentam a mais nova e avançada tecnologia de inoculantes, podem ser directamente misturados com o resultado prático de aderência muito superior à de qualquer inoculante sólido. Também podem ser facilmente aplicados dentro do sulco da semente com resultados igualmente satisfatórios (Pitard, 2000).

Um método de inoculação que tem sido utilizado para substituir os tradicionais é a aplicação do inoculante por distribuição no sulco de sementeira. O inoculante é aplicado na forma de pulverização no sulco, durante a operação de sementeira. Com esta prática as bactérias (rizóbios) ficam livres do contacto com fungicidas e micronutrientes que podem causar danos a elas (Machado *et al.*, 2006).

1.5.3. Vantagens da inoculação

Nesse contexto, fica evidenciada a importância da inoculação como prática de manejo sustentável para a cultura do feijão macunde, por meio da utilização de inoculantes com quantidades adequadas de rizóbios competitivos e eficientes para o processo de FBN, o que poderá contribuir para aumento de produtividade e redução dos custos com fertilizantes nitrogenados (Silva *et al.*, 2012).

Essa interacção via utilização de inoculantes, também pode permitir acréscimo de rendimento da cultura para a substituição, total ou parcial, dos adubos nitrogenados, desde que supra a cultura com N necessário para o seu crescimento e desenvolvimento, além de diminuir os custos de produção e economizar combustíveis fósseis utilizados para a fabricação de fertilizantes nitrogenados (Soares *et al.*, 2006).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Departamento de Produção e Protecção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias, Unidade Orgânica da Universidade José Eduardo dos Santos, no período compreendido entre Agosto de 2015 à Junho de 2016. O mesmo foi realizado no âmbito do Projecto SASSCAL Task 147 “*SISTEMA DE MANEJO DA FERTILIDADE DO SOLO, INTEGRANDO O USO RACIONAL DOS FERTILIZANTES E BIOFERTILIZANTES.*” Sublinha 3: «Obtenção, caracterização e utilização de biofertilizante (*Rhizobium*, fungos micorrízicos, compostagem, adubos verdes e outras tecnologias de manejo) para recomendar o seu uso nos solos do Planalto Central de Angola».

2.1. Caracterização da área de estudo

O estudo foi realizado na Fazenda Experimental da Faculdade de Ciência Agrárias (FCA), que encontra-se na localidade de Ngongoinga, comuna da Calima. O ponto central da área do ensaio está situado a aproximadamente 12° 51' 36,01'' de latitude Sul e longitude 15° 43' 45,23'' Este, a uma elevação de 1.679 m acima do nível do mar (ponto em branco no centro da linha amarela, Figura 1). A fazenda dista a 11 km da cidade do Município sede (Huambo), possui uma área de aproximadamente 800 ha está limitada a Sul pela aldeia da Katenguenha através do rios Ateñla; a Norte pelas Fazendas Fortunas e Filhos, Zé-Maria Dumbo e Fazenda Emiliano; a Este pelas aldeias Ombreira Kuleva e Mbilinga,

através dos rios Culimanhala e Kunhongãmua e a Oeste com a comunidade do Longueve e o rio Kunhongãmua.



Figura 1. Vista aérea (Google Earth) da área do estudo.

2.1.1. Características edafoclimáticas

A área de estudo apresenta solo ferralítico, de textura Franco-argilo-arenosa, com pH=5,77 [(em água) conforme o Quadro 2]. Apresenta tal como a maior parte do território da província

do Huambo, clima temperado (temperado-quente), sendo a temperatura média anual a rondar os 19°C. Apresenta duas estações: uma chuvosa (com cerca de sete meses de duração) e outra seca/cacimbo (com cerca de cinco meses de duração), o volume anual de pluviosidade média pode atingir os 1.400 mm ano⁻¹ (Missão de Pedologia de Angola, 1961).

Quadro 3. Característica química e física do solo da área de estudo.

pH		Bases				H ⁺ +Al ³⁺	Al ³⁺	SB	CTC	V	P
		Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺						
H ₂ O	KCl	----- cmolc dm ⁻³ -----				----- mg dm ⁻³ -----					
5,77	4,61	0,54	3,3	0,00	10,44	8,92	1,06	14,20	24,20	58,35	2,96
Prof.		Granulometria				C. E		Textura			
		Areia	Limo	Argila							
cm		----- % -----				µs cm ⁻¹					
0-20		68,5	9,8	21,7		29		Franco-Argilo-Arenosa			

Fonte: IIA-Chianga, Huambo – 2016

2.1.2. Aspectos sócio-económicos

De etnia Ovimbundo, a população da localidade de Ngongoinga dedica-se fundamentalmente à agricultura de subsistência, sendo o milho e feijão as principais culturas praticadas. Os poucos recursos financeiros, dificuldades de acesso as novas tecnologias de produção, são alguns dos factores que condicionam a produção agrícola local. Para além da actividade agrícola, a população dedica-se também à produção de carvão para fins comerciais e a criação de gado bovino em pequena escala.

2.2. Descrição Metodológica

O trabalho foi realizado em duas etapas compreendidas entre os meses de Agosto a Dezembro de 2015 e de Fevereiro a Junho de 2016.

Etapas I (Agosto a Dezembro de 2015)

Nesta etapa avaliou-se o efeito de cinco tratamentos sobre as variáveis diâmetro do caule (DC) e altura das plantas (AP) na cultura do feijão macunde, leguminosa de importância

económica e social para a população rural de baixa renda sobretudo no continente africano do qual é nativo (Lacerda *et al.*, 2004). A partir dos resultados obtidos nesta Etapa I, realizou-se uma segunda avaliação correspondente a Etapa II no ano 2016.

Etapa II (Fevereiro a Junho de 2016).

Nesta etapa avaliou-se o efeito dos cinco tratamentos sobre as variáveis diâmetro do caule (DC), altura das plantas (AP) e sobre outras variáveis como: número de nódulos (NN), coloração dos nódulos (CN), massa fresca dos nódulos (MFN), massa seca dos nódulos (MSN), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), número de folhas (NF), todas elas relacionadas com o processo de fixação biológica do nitrogénio segundo autores tais como: Lacerda e Moreira, 2000; Gómez *et al.*, 2002; Motta, 2002; Rumjanek, 2005, Moreira e Siqueira, 2006; Xavier *et al.*, 2006; Bastos *et al.*, 2012.

2.2.1. Características climáticas durante o ensaio

Os dados da temperatura (°C), humidade relativa (%) e pluviosidade (mm) correspondentes aos meses de permanência da cultura, foram determinados pela Estação Meteorológica automática da fazenda experimental da FCA no Ngongoinga.

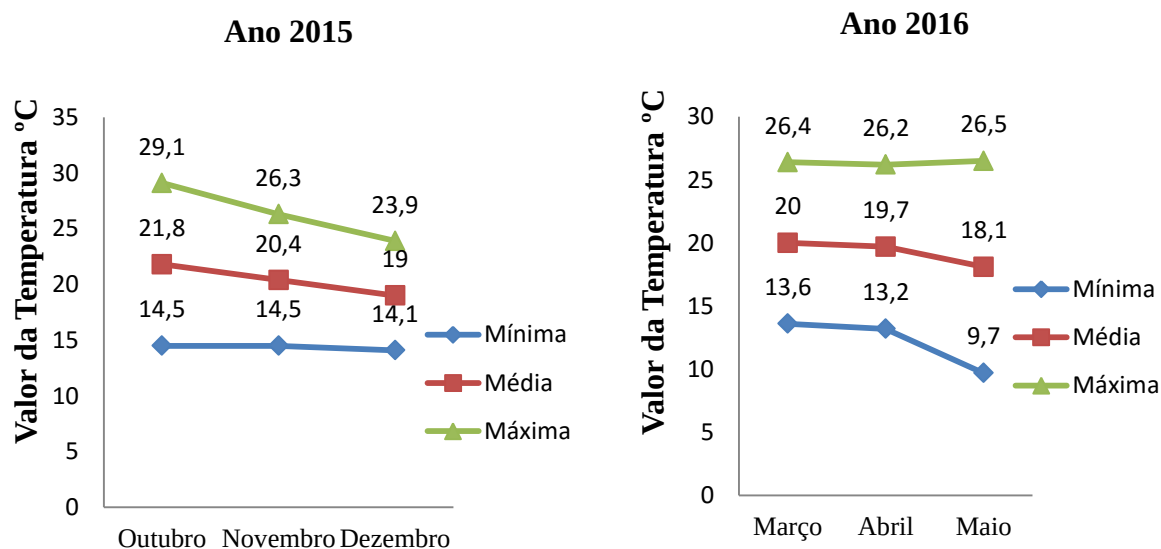


Figura 2. Comportamento da temperatura durante os meses de ensaio no ano de 2015.

Figura 3. Comportamento da temperatura durante os meses de ensaio no ano de 2016.

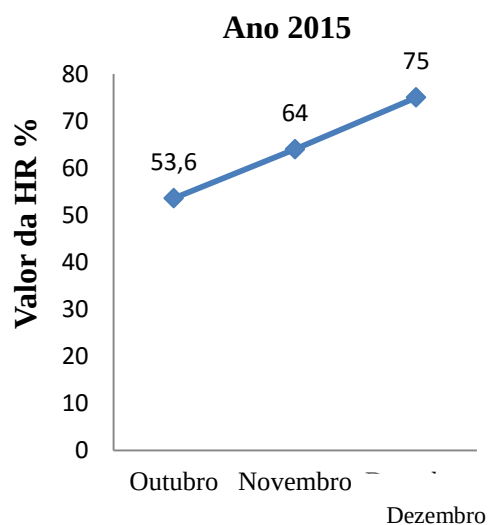


Figura 4. Comportamento da humidade relativa (HR) durante os meses de ensaio no ano de 2015.

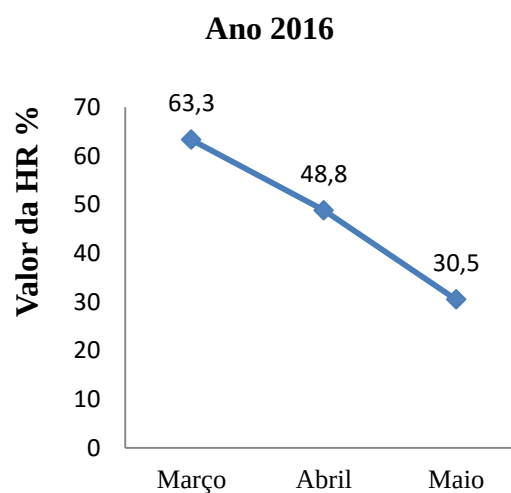


Figura 5. Comportamento da humidade relativa (HR) durante os meses de ensaio no ano de 2016.

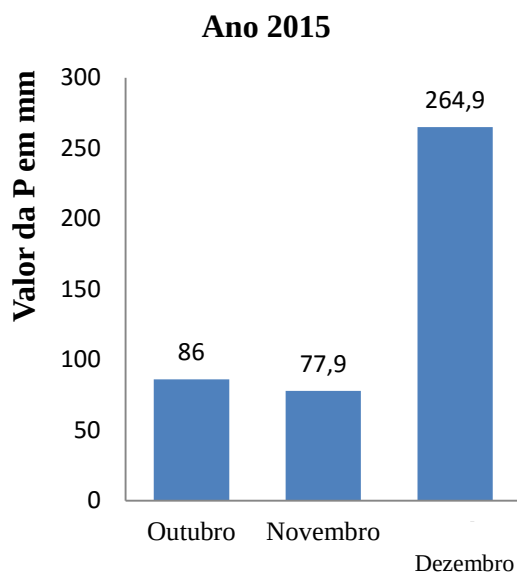


Figura 6. Comportamento da pluviosidade (P) durante os meses de ensaio no ano de 2015.

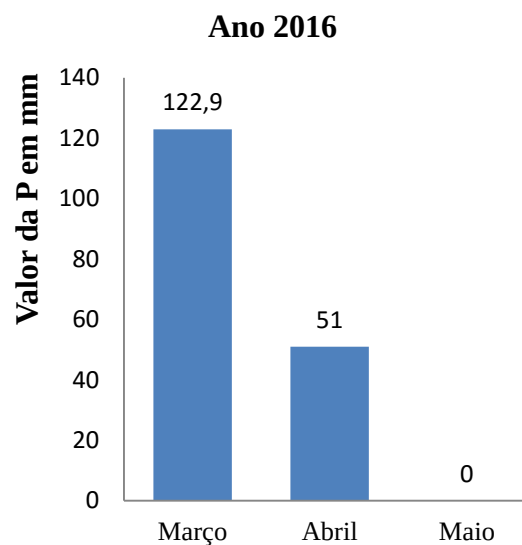


Figura 7. Comportamento da pluviosidade (P) durante os meses de ensaio no ano de 2016.

2.2.2. Delineamento Experimental

Para o delineamento experimental foi utilizado o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) com três repetições, com parcelas de 3 m x 4 m espaçadas entre si por 1 m (tendo 75 plantas por parcela), sendo a área total de 300 m².

2.2.3. Tratamentos estudados

Quadro 4. Tratamentos estudados e sua respectiva descrição.

Tratamentos	Descrição
T1	Feijão macunde + N ₂ + P ₂ O ₅ + K ₂ O
T2	Feijão macunde + P ₂ O ₅ + K ₂ O
T3	Feijão macunde + <i>Bradyrhizobium</i> R55 + P ₂ O ₅ + K ₂ O
T4	Feijão macunde + <i>Bradyrhizobium</i> R63 + P ₂ O ₅ + K ₂ O
T5	Feijão macunde + <i>Bradyrhizobium</i> USDA3384 + P ₂ O ₅ + K ₂ O

2.2.4. Cultivar utilizada

A cultivar de feijão macunde utilizada foi a de crescimento semí-prostrado (variedade Ohesse), destinada a produção de grãos secos. O poder germinativo foi previamente determinado e apresentou 85%. Tem grãos de cor castanha, pequenos, reniformes e com tegumento liso e anel do hilo castanho, com ciclo de vida em torno de 70-90 dias, considerada precoce segundo Freire Filho (2011).

2.2.5. Instalação dos ensaios

Antes da implantação do ensaio (30 dias antes), foi realizado o preparo do solo com a passagem de um arado de disco seguido de uma gradagem.

Foi realizada a adubação de fundo, aplicando uma mistura de Superfosfato 45% e Sulfato de potássio 52%, nas quantidades de 133,3 g e 57,7 g por parcela, aplicadas em todas as parcelas. A Ureia 46%, foi aplicada apenas nas parcelas do T1, sendo fraccionada em duas (32,51 g para adubação de fundo e 32,51 g para cobertura).

2.2.6. Inoculação das sementes

Os nódulos foram isolados na cultura do feijão macunde, no Município de Chitembo, provincia do Bié (Angola) e preparado o inoculante turfoso (*Bradyrhizobium* R55 e *Bradyrhizobium* R63), na Universidade de BREMEN-ALEMANHA.



Figura 8. Inoculantes (turfosos) de *Bradyrhizobium* R55, R63 e USDA3384 respectivamente.

Antes da inoculação realizou-se a desinfecção das sementes de feijão macunde, submergindo-as em etanol (C_2H_5OH) (70%v/v) durante 1 minuto e lavadas sucessivamente com água destilada, tratamento de desinfecção utilizado para outros géneros de plantas em investigações anteriores (Ghildiyal *et al.*, 2007; García *et al.*, 2008).

A inoculação das sementes procedeu-se do seguinte modo:

Misturou-se o pó (pegante) com água dentro do recipiente (tubo) apropriado.

Misturou-se o líquido do tubo com o conteúdo de uma bolsa da bactéria biofertilizante.

De seguida misturou-se o líquido café que continha a bactéria biofertilizante com as sementes em um vaso de plástico limpo.

Seguidamente efectuou-se a sementeira de imediato.



Figura 9. Preparação do material aderente.



Figura 10. Colocação do inoculante turfoso no recipiente com sementes.

O processo foi repetido para cada estirpe usando para o efeito materiais diferentes e limpos.



Figura 11. Sementeira do feijão macunde.

A sementeira foi realizada manualmente colocando-se três sementes por covacho, para posterior desbaste, deixando-se uma planta por covacho. O espaçamento adoptado foi de 0,20 m entre covas e 0,80 m entre linhas. Tendo assim, 5 linhas por parcela e 15 plantas por linha.

2.2.7. Operações culturais

Procedeu-se o desbaste 20 dias após a germinação e simultâneamente procedeu-se a sacha, aos 30 dias após a emergência (DAE) foi feita a adubação de cobertura com 32,51 g de Ureia 46%, nas parcelas que continham o tratamento um (T1).

Após a primeira sacha, as subcequentes foram sendo feitas sempre que houvesse necessidade. A rega foi garantida utilizando o sistema de rega por aspersão.

2.2.8. Variáveis avaliadas

As avaliações foram realizadas aos 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 dias após emergência e corresponderam, respectivamente, aos estádios V3, V6, R1, R2, R3, R4 e R5 (Campos *et al.*, 2000). Para a avaliação das variáveis destrutivas (NN, CN, MFN, MSN, MFPA, MSPA, NF) foram colhidas ao acaso 3 plantas por parcela, perfazendo no total 9 plantas por tratamento para cada dia de amostragem e para as variáveis não destrutivas (DC e AP) foram escolhidas o mesmo número de plantas ao acaso.

Diâmetro do caule (DC)

Foi determinado com o auxílio de um paquímetro digital colocado no caule da planta entre o nó cotiledonar.

Altura da planta (AP)

Foi determinada com o auxílio de uma fita métrica de 5 m, a partir do colo da planta até a inserção do último trifólio.

Número de nódulos (NN)

Colectados os sistemas radiculares de três plantas ao acaso por unidade parcelar, com o auxílio de uma pá reta, o material foi cuidadosamente lavado com água corrente e posteriormente foi determinado o número de nódulos por planta, mediante contagem.



Figura 12. Raiz do feijão macunde com nódulos.

Coloração interna dos nódulos (CN)

A coloração dos nódulos foi determinada observando a coloração do seu interior, através de um corte feito nos mesmos com um bisturi.

Massa fresca dos nódulos (MFN)

Após a contagem, os nódulos foram colocados em uma placa de petri e levados para uma balança digital analítica e pesada para determinação da MFN através da subtração do peso da placa que foi previamente determinado [MFN=Peso total (peso da placa + massa do nódulo) - peso da placa].

Massa seca dos nódulos (MSN)

Após a determinação da MFN, os nódulos foram colocados para secar em estufa com ventilação (72°C; 72 h) e posteriormente colocados em uma placa de petri levando-a para uma balança digital analítica, a sua massa foi calculada seguindo o método para a MFN.



Figura 13. Determinação da MSN em uma balança digital analítica.

Massa fresca da parte aérea (MFPA)

Em cada época de colecta, as plantas foram cuidadosamente retiradas do solo e a parte aérea e raízes foram separadas. Após o corte as plantas foram pesadas em uma balança digital analítica para a determinação da MFPA.

Massa seca da parte aérea (MSPA)

Depois de determinado a massa fresca, as amostras foram colocadas em estufa com ventilação, tal como os nódulos (72°C; 72 h), até atingir a massa constante e posteriormente pesadas em uma balança digital analítica para a determinação da MSPA.

Efectividade relativa das estirpes (Efr)

Para cada estirpe tal como em trabalhos realizados por Lacerda *et al.* (2004) e Frigo (2013), foi calculada segundo a expressão:

$$Efr = \frac{MSPA}{MSPA \text{ da testemunha com } N \text{ mineral}} \times 100\%$$

2.2.9. Análise estatística

Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de correlação, empregando-se o programa de análises estatísticas INFOSTAT ver. 2008 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Altura das plantas (AP)

A resposta da AP em relação aos tratamentos dos ensaios realizados em 2015 e 2016 é apresentada na Figura 14. Onde observa-se que embora não exista diferença significativa entre os tratamentos, de modo geral as plantas do T1, T2 e T4 apresentaram maior valor da AP em ambos os anos. É interessante destacar também que no ensaio realizado em 2015 o menor valor foi atingido no T5, enquanto em 2016 o menor valor foi exibido no T3.

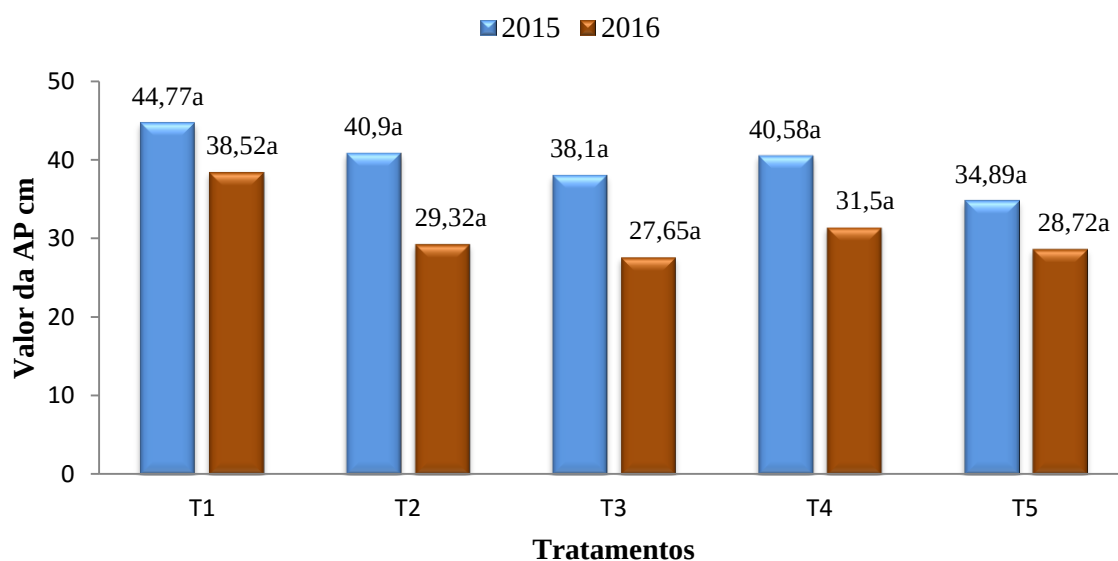


Figura 14. Valor médio da altura das plantas (AP) nos diferentes tratamentos nos anos 2015 e 2016. Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Weber e Mielniczuk (2009), a ausência de diferença significativa da AP entre tratamentos pode estar relacionada ao facto de que o Nitrogénio além de ter sido fornecido na forma mineral, está presente na matéria orgânica do solo, constituindo a principal fonte de Nitrogénio para as plantas, facilitando assim a sua absorção. Resultado semelhante da AP no T1 foi encontrado por Nascimento *et al.* (2012), em estudo sobre crescimento inicial do feijão macunde preto sob diferentes condições de sombreamento e adubação nitrogenada, onde observaram que as plantas de feijão macunde preto com adição de adubação nitrogenada, foram um pouco superiores na última época de colecta na altura caular. Ainda em relação ao aumento da altura das plantas com adubação nitrogenada, Frigo (2013), em estudo sobre

feijão macunde submetido à inoculação com rizóbio e cultivado em latossolo, relata que, em relação a altura das plantas, o tratamento que obteve a maior altura foi o tratamento adubado com Nitrogénio, não diferindo estatisticamente do tratamento inoculado, sendo que sua altura chegou a um valor de 90% da altura do tratamento adubado.

3.2. Diâmetro do caule (DC)

Para esta variável os resultados foram similares com os obtidos na variável AP, já que, não houve diferença significativa entre os tratamentos como mostra a figura 15. Não obstante, as plantas do T4 superaram numericamente os demais tratamentos. O menor resultado no ensaio realizado em 2015 foi observado no T1, e em 2016 nos tratamentos T2, T3 e T5.

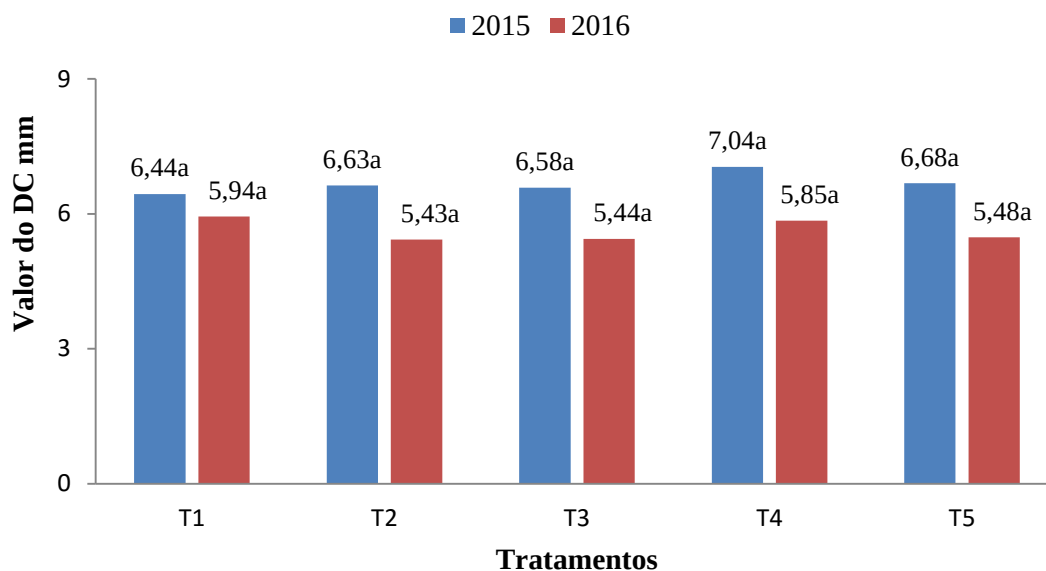


Figura 15. Valor médio do diâmetro do caule (DC) nos diferentes tratamentos nos anos 2015 e 2016. Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O valor do DC normalmente é um indicativo da produtividade de uma planta ou cultura, pois, de acordo com Fancelli e Dourado-Neto (2000) e Cruz *et al.* (2008), normalmente o diâmetro do caule apresenta correlação com a produtividade por se tratar de um órgão de reserva da planta, o caule actua como estrutura de armazenamento de sólidos solúveis que serão utilizados posteriormente na formação dos grãos.

3.3. Número de nódulos (NN)

Não foi observada diferença significativa no que respeita ao NN para todos os tratamentos (figura 16). As plantas do T4 apresentaram maior NN, seguidas das plantas do T2 e os menores NN foram observados nos tratamentos T3 e T1.

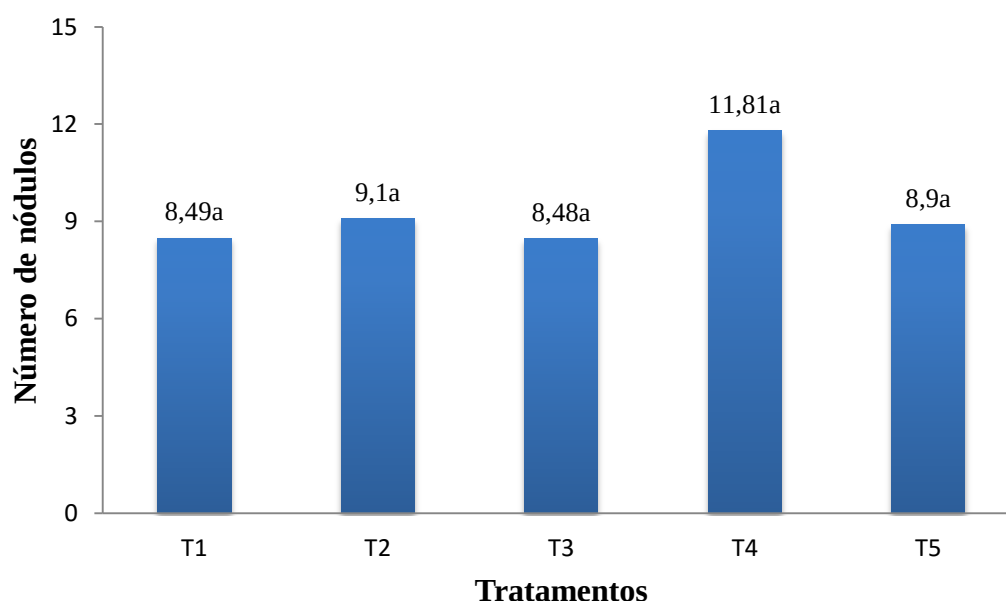


Figura 16. Valor médio do Número de nódulos para os diferentes tratamentos. Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Estes resultados coincidem com os observados por Almeida *et al.* (2010), em que o valor do NN não foi estatisticamente diferente, tanto para tratamentos inoculados, como para tratamento com Nitrogénio mineral, o que indicou que a população nodulífera nativa de feijão macunde não foi inibida pela adição de Nitrogénio mineral. Segundo Bastos *et al.* (2012), em condições de campo, considera-se que o número de nódulo acima de 58 e massa seca de nódulos acima de $0,33 \text{ g.planta}^{-1}$ são suficientes para garantir o fornecimento de Nitrogénio por meio da FBN. Portanto, acredita-se que em condições de campo os limites podem ser inferiores sem afectar a FBN para a cultura do feijão macunde. Confirmando os resultados encontrados no presente trabalho.

3.4. Coloração dos nódulos (CN)

Não houve diferença significativa entre tratamentos com relação a esta variável. De forma geral todas as plantas apresentaram a mesma coloração interna nos nódulos (rosa-vermelha).

Estes resultados indicam que os nódulos estiveram activos, ou seja, fixando o Nitrogénio com eficiência, conforme investigações realizadas por Stralioetto (2002), Fernandes e Rodrigues (2014), que relatam, que a presença de nódulos com o interior rosa-vermelho indica que os mesmos estão activos e fixando o nitrogénio, já a coloração branca indica que o processo de fixação biológica de nitrogénio não está ocorrendo.

Quadro 5. Resultado da análise de variância para a coloração dos nódulos (CN) nos diferentes tratamentos.

Tratamento	CN	Nível de Significância
	Média	
1	1,43	A
2	1,49	A
3	1,51	A
4	1,62	A
5	1,37	A

A CN é representada por valor numérico entre 0-2. Onde 0-representa ausência de cor (ausência de nódulo), 1-branca e 2-rosa ou vermelha. Valor superior a 1 demonstra uma tendência a coloração Rosa-Vermelha. Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.5. Massa fresca dos nódulos (MFN)

Para a variável MFN, conforme apresenta a Figura 17, não houve diferença significativa entre os tratamentos, apresentou maior MFN o T4, seguido do T2 e T5 com valor numérico igual. Os menores valores foram exibidos pelos tratamentos T1 e T3.

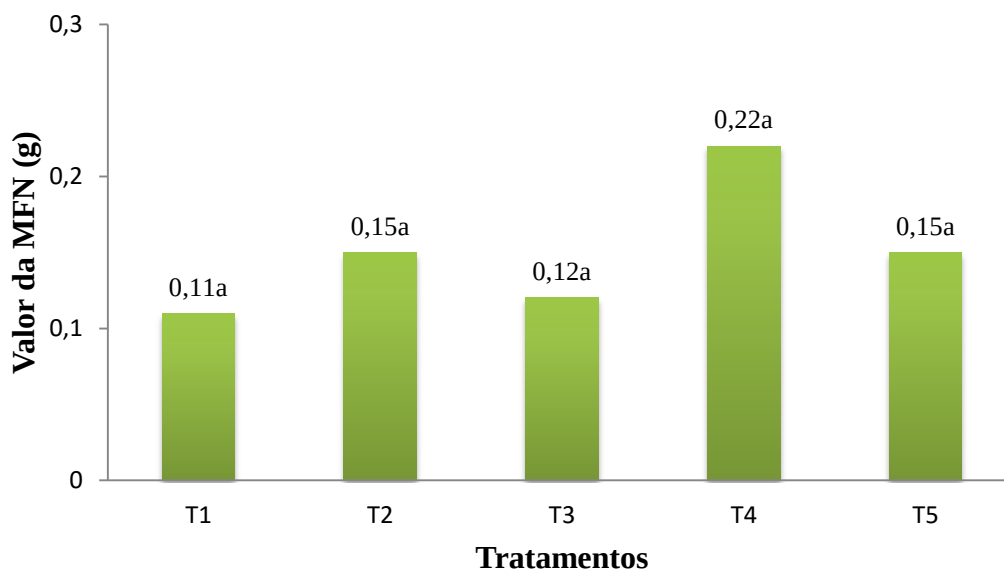


Figura 17. Valor médio da massa fresca dos nódulos (MFN) para os diferentes tratamentos. Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Parâmetros relacionados com o número e massa de nódulos são critérios frequentemente utilizados para avaliação da simbiose entre rizóbios e leguminosas, fazendo parte, inclusive, do protocolo para avaliação da eficiência agronômica de estirpes no Brasil pela RELARE (Rede de Laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola) (Xavier *et al.*, 2006).

3.6. Massa seca dos nódulos (MSN)

Para a MSN, também não houve diferença significativa (Figura 18), tal como para a MFN pois que, existiu uma correlação alta ($C.C=0,82$) entre as duas variáveis. O tratamento T4 destacou-se dos demais por produzir maior MSN, seguido dos tratamentos T5 e T2. Os tratamentos T1 e T3 apresentaram os valores mais baixos.

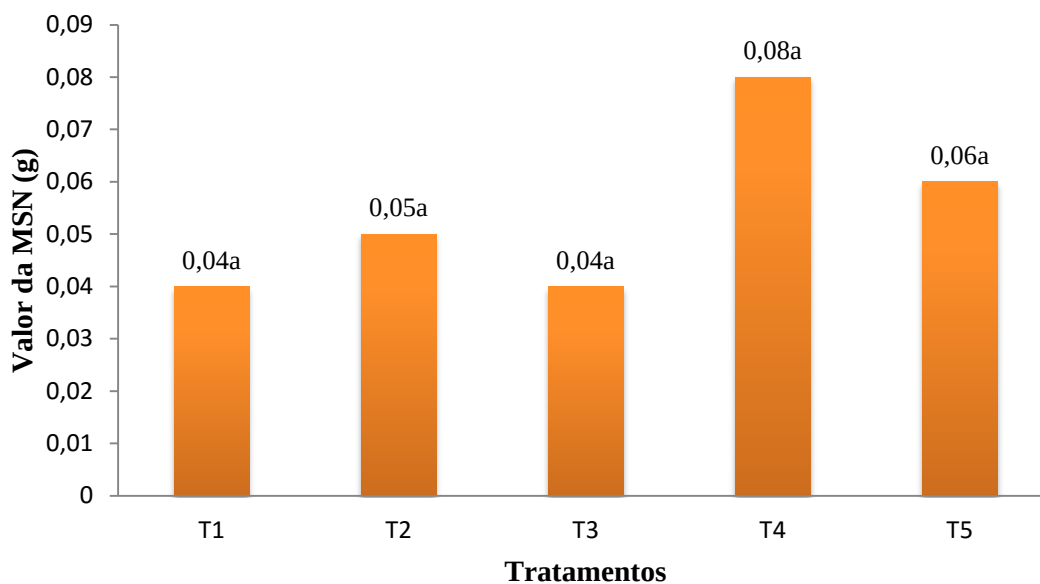


Figura 18. Valor médio da massa seca dos nódulos para os diferentes tratamentos. Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Estes resultados mostram que a adição de nitrogénio equivalente a 25 kg ha^{-1} , poderá não ter inibido a nodulação no T1, diferindo dos resultados encontrados por Brito *et al.* (2009), em seu trabalho intitulado Marcha de absorção do nitrogénio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão macunde [*Vigna unguiculata* (L.)] e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinado consumo de 15N , verificaram que a adição de 27 kg ha^{-1} de nitrogénio na forma de ureia estimulou a nodulação em feijão macunde, em um experimento de casa de vegetação utilizando vasos plásticos com 5 kg de solo. Enquanto Silva *et al.* (2012), estudando a nodulação e eficiência da fixação do nitrogénio em feijão macunde por efeito da taxa do inóculo, constataram que o tratamento controle + nitrogénio apresentou menores NN e MSN em valores absolutos quando comparado ao tratamento controle e às diferentes concentrações da estirpe BR 3267 no inoculante, demonstrando assim, que a aplicação de nitrogénio equivalente a 20 kg ha^{-1} inibiu a nodulação espontânea em plantas de feijão macunde, em casa de vegetação.

3.6.1. Avaliação da massa seca dos nódulos nos dias de amostragem

A avaliação da MSN em relação aos dias após a emergência (DAE) em que foram colhidas as amostras, portanto 10, 20, 30, 40, 50, 60, e 70 (figura 19) que corresponde aos estádios

fenológicos do feijão macunde, V3, V6, R1, R2, R3, R4 e R5 (Campos *et al.*, 2000), permitiram identificar que o valor numérico da MSN para todos os tratamentos foi crescendo ao longo dos 10, 20, e 30 dias, apresentando o valor máximo aos 40 dias (R2), e foi decrescendo até atingir o menor valor aos 70 dias (R5). No Quadro 5 pode-se observar que houve diferença significativa na MSN ao longo do ciclo fenológico da cultura.

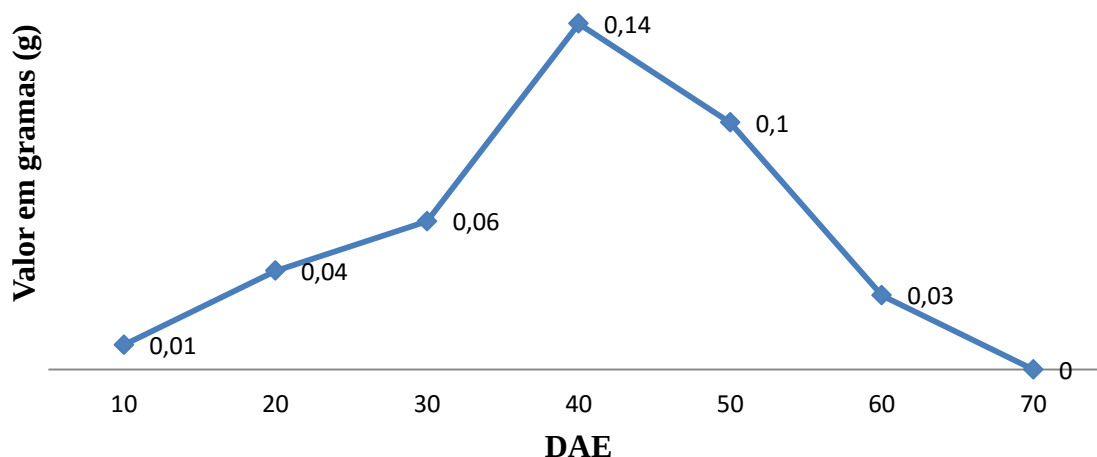


Figura 19. Valores médios da massa seca dos nódulos nos diferentes dias de amostragem: 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 dias após a emergência (DAE).

Segundo Hungria e Vargas (1994), geralmente o período de senescência nodular ocorre após o florescimento e início do enchimento dos grãos, pois que, os fotossintatos acumulados são direccionados para os grãos, desfavorecendo os nódulos. O que confirma o decréscimo da MSN observado no presente trabalho após o estágio R2 (floração). Resultados similares foram verificados por Saboya *et al.* (2008), em trabalho sobre a inoculação de rizóbio em feijão macunde em latossolo vermelho-amarelo em Gurupi-TO (Brasil), em que houve um decréscimo da MSN para todos os tratamentos aos 55 DAE, em comparação com a primeira avaliação que foi aos 35 DAE (floração).

Quadro 6. **Resultado da análise da variância para MSN nos diferentes dias de amostragem.**

DAE	MSN (gplanta ⁻¹)	Nível de Significância
	Média	
10	0,01	Ab
20	0,04	Bc
30	0,06	C
40	0,14	E
50	0,1	D
60	0,06	Abc
70	-----	-----

Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O maior acúmulo da MSN ocorreu por altura da floração, indicando que, uma vez formados, os nódulos aumentaram a sua massa e conseqüentemente a eficiência da fixação de N₂, tal como relata Xavier *et al.* (2005). O mesmo autor considera que, observação como esta é importante e sustentada por Wadisirisuk e Weaver (1985), que encontraram correlação positiva entre a massa de nódulos e a quantidade de Nitrogênio acumulado em feijão macunde.

3.7. Massa fresca da parte aérea (MFPA)

Para esta variável, em termos gerais o valor mais alto verificou-se no T2 seguido dos tratamentos T1 e T4, não diferindo estatisticamente dos demais (Figura 20). A MFPA foi menor no T3.

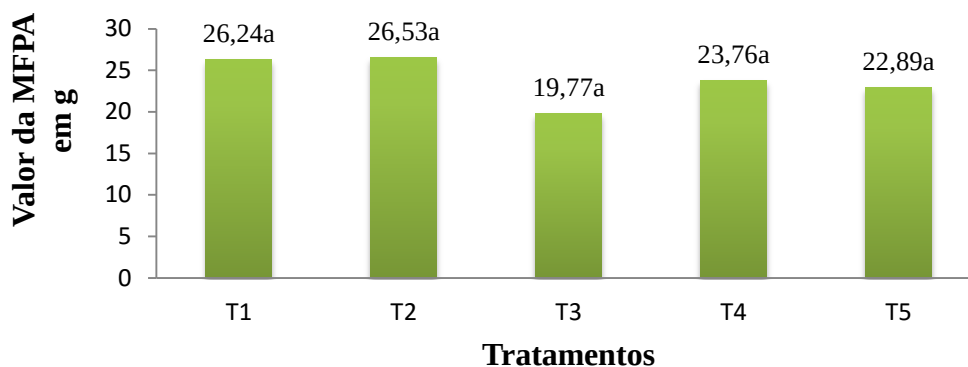


Figura 20. Valor médio da massa fresca da parte aérea (MFPA) para os diferentes tratamentos. Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.8. Massa seca da parte aérea (MSPA)

Conforme apresentado na figura 21, a MSPA foi maior no tratamento T2 sem diferença estatística em relação aos demais tratamentos, seguido dos tratamentos T1 e T4.

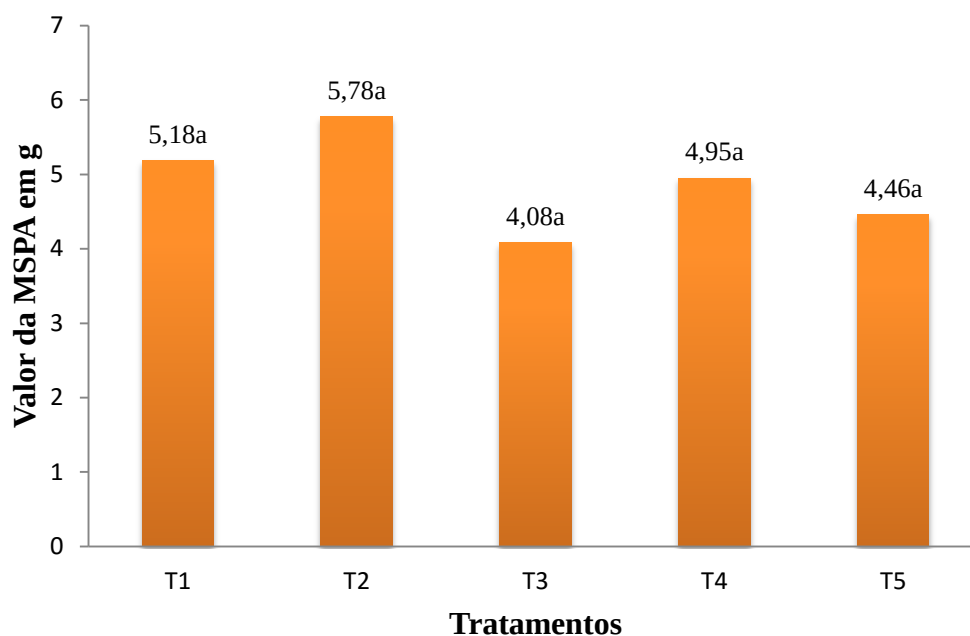


Figura 21. Valor médio da massa seca da parte aérea (MSPA) para os diferentes tratamentos. Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Estes resultados sugerem que a população nativa foi fundamental para o fornecimento de Nitrogénio nas plantas do T2, o que proporcionou um aumento claro da MSPA que foi numericamente superior ao T1, que embora se tenha fornecido nitrogénio mineral apresentou valor muito próximo ao T4. Almeida *et al.* (2010), estudando a produtividade do feijão macunde cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas, também não encontraram diferença estatística significativa para MSPA em feijão macunde cv. BR 17 inoculado, ao comparar o tratamento adubado, inoculado com rizóbios e sem inoculação. Desta forma, comprova-se que a população nativa de rizóbios presentes na área é capaz de realizar a simbiose e fornecer o nitrogénio necessário ao desenvolvimento da cultura. De acordo com Boddey (2013), em todas as regiões tropicais geralmente a cultura forma nódulos com as populações de rizóbio nativas no solo.

Resultados diferentes foram encontrados por Ferreira *et al.* (2011), cultivando feijão macunde e avaliando a MSPA em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, observaram maiores produções para os tratamentos inoculados, quando comparados ao tratamento que recebeu adubação com nitrogénio mineral.

O resultado apresentado pelo tratamento T4 demonstra que a capacidade de adaptação e fixação de nitrogénio da estirpe R63 é relativamente superior em comparação com as estirpes R55 e USDA3384.

3.9. Número de folhas (NF)

Para o NF não houve diferença significativa entre os tratamentos (figura 22). O tratamento T1 apresentou maior NF, seguido do tratamento T4.

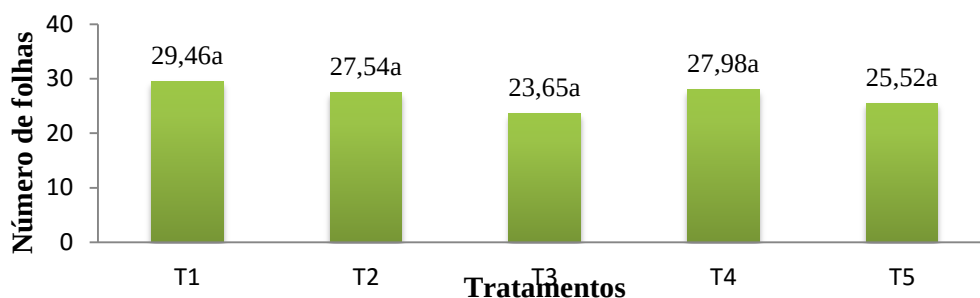


Figura 22. Valor médio do número de folhas para os diferentes tratamentos. Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Estes resultados pressupõem que a adição de nitrogénio mineral no tratamento T1 (25 kg ha⁻¹), tenha proporcionado um aumento no NF em cerca de 5% em relação ao tratamento T4 que foi cerca de 14% superior aos tratamentos T3 e T5. De acordo com Cruz *et al.* (2008), uma planta bem nutrida em Nitrogénio apresenta maior crescimento da área foliar e do sistema radicular, pois este nutriente influencia a divisão, a expansão celular e a fotossíntese. Isto sugere que a estirpe R63 tenha fornecido maior quantidade de nitrogénio as plantas do T4, quando comparada com as estirpes R55 nas plantas do T3 e USDA3384 nas plantas do T5.

3.10. Efectividade relativa das estirpes (Efr)

Em relação à eficiência relativa das estirpes, a qual compara a produção média de MSPA dos tratamentos inoculados com a mesma média do tratamento com adubação mineral (T1), para o presente trabalho, apresentou maior efectividade a estirpe R63 e a menor efectividade observou-se na estirpe USDA 3384 e R55 (figura 23).

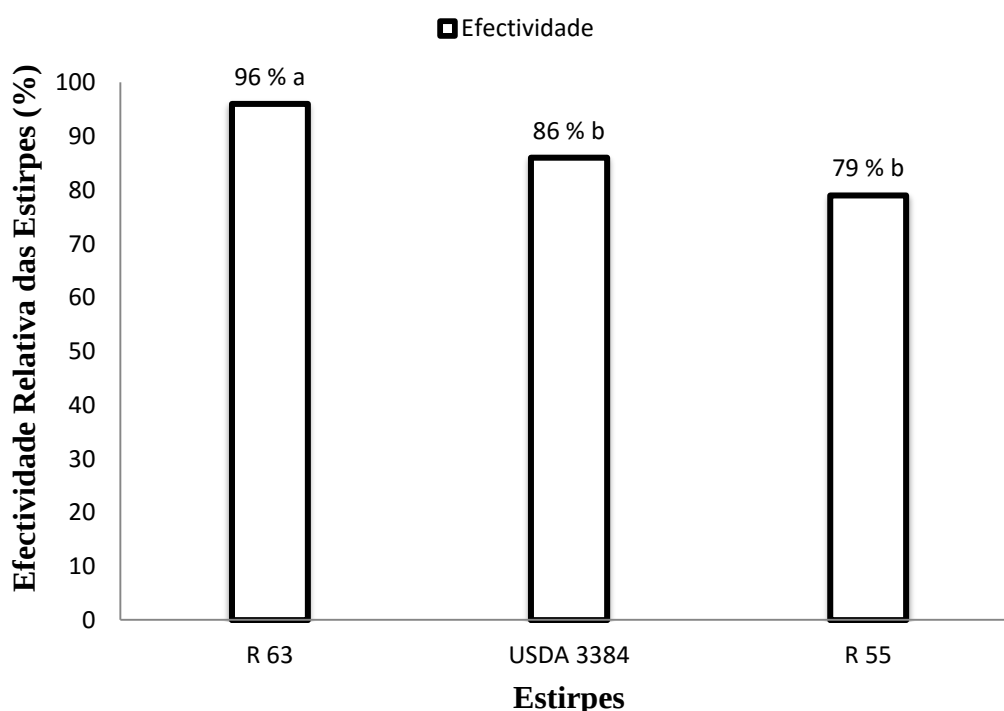


Figura 23. Percentagem de MSPA para as estirpes estudadas em relação ao tratamento adubado (T1).

Esses resultados mostram que a fixação biológica promovida pela estirpe R63 atendeu em 96% a necessidade da cultivar de feijão macunde estudada em relação ao suprimento de nitrogénio, 86% para a estirpe USDA3384 e 79% para a estirpe R55. Estes resultados ficaram relativamente abaixo do tratamento adubado, diferindo dos resultados encontrados por Chagas Júnior *et al.* (2010), onde três das estirpes testadas apresentaram eficiência superior ao tratamento adubado. Resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho foram encontrados por Soares *et al.* (2006) e Nascimento *et al.* (2010), onde estes últimos, estudando a eficiência de isolados de rizóbios nativos em feijão macunde, constataram que os isolados testados apresentaram grande eficiência na fixação do nitrogénio, parte deles com produção de MSPA equivalente a 80%, ou mais, da MSPA produzida pelo tratamento com nitrogénio mineral. Os mesmos autores encontraram correlação positiva tanto para a MSPA e a eficiência dos isolados, como para o nitrogénio total e a eficiência dos isolados em fixar este elemento. Considerando que quanto maior a eficiência do isolado, maior a quantidade de nitrogénio presente na planta. Silva (2007), também encontrou correlação positiva entre as mesmas variáveis em plantas de amendoim.

Em trabalhos realizados por Pimratch *et al.* (2004) sugeriram que o acúmulo de MSPA é a característica mais confiável para selecção de cultivares com maior potencial simbiótico em solos com baixa disponibilidade de nitrogénio. Ainda Pimratch (2004) relata alta correlação entre o acúmulo de MSPA e o peso de 100 grãos, indicando que a FBN pode contribuir para aumento de produtividade, entretanto, em menor escala quando comparada à contribuição para o crescimento vegetativo.

Hungria e Vargas (1994), consideram que para as leguminosas que respondem a inoculação com bactérias diazotróficas simbiontes, recomenda-se uso de pequenas doses de nitrogénio aplicadas na sementeira. Recomendação esta sustentada por Xavier *et al.* (2008), que constataram aumento da produtividade de feijão macunde com o uso da inoculação, e que o efeito desta prática é favorecida quando a cultura é adubada com no máximo 20 kg ha⁻¹ de nitrogénio.

4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

4.1. Conclusões

De acordo com os objectivos do presente trabalho, os resultados obtidos permitiram concluir que:

- A estirpe *Bradyrhizobium* R63 apresentou maior efectividade na nodulação e portanto no crescimento e desenvolvimento do feijão macunde nas condições edafoclimáticas da fazenda experimental da FCA, em comparação com as estirpes *Bradyrhizobium* USDA3384 e *Bradyrhizobium* R55.
- As estirpes *Bradyrhizobium* USDA3384 e *Bradyrhizobium* R55 em termos gerais foram as que menor valor apresentaram para todas as variáveis estudadas, portanto apresentaram menor efectividade.

4.2. Recomendações

Os resultados obtidos neste trabalho permitem fazer as seguintes recomendações:

1. Que se faça um estudo das mesmas estirpes em solo corrigido, de forma a avaliar o seu desempenho em feijão macunde nestas condições.
2. Que se façam estudos da população nodulífera nativa, uma vez que as plantas do tratamento T2, embora sem inoculação e sem adição de nitrogénio, apresentaram valores superiores em termos de MSPA em comparação com os restantes, o que demonstrou que a população nativa presente na área foi capaz de realizar a simbiose e fornecer este elemento necessário ao desenvolvimento das plantas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A. L. G.; Alcântara, R. M. C. M.; Nóbrega, R. S. A; Nóbrega. J. C. A.; Leite, L. F. C. & Silva, J. A. L. (2010) Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, p. 3-6.
- Aduan, R. E.; Vilela, M. F. & Junior, F. B. R. (2004) Os grandes ciclos biogeoquímicos do planeta. EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF. 25 p.
- Andrade Júnior, A. S.; Santos, A. A.; Sobrinhos, C. A.; Bastos, E. A.; Melo, F. B.; Viana, F. M. P.; Filho, F. R. F.; Carneiro, J. S.; Rocha, M. M.; Cardoso, M. J.; Silva, P. H. S. & Ribeiro, V. Q. (2002) Cultivo do feijão-caupi. Embrapa Teresina. Embrapa Meio-Norte. Sistema de Produção. 108 p. Versão Eletrônica. Disponível em www.cpamn.embrapa.br/sistemadeproducao. Consultado a 14/10/2015.
- Bastos, V. J.; Melo, A. M.; Alves, J. M. A.; Uchôa, S. C. P.; Silva, P. M. C. & Teixeira Junior, D. L. (2012) Avaliação da fixação biológica de nitrogênio em feijão caupi submetido a diferentes manejos da vegetação natural na savana de Roraima. Revista Agro@mbiente On-line, v. 6, n. 2: p. 133-139.
- Boddey, R. M.; Atakora, W. K.; Fosu, M.; Guimarães, A. P. & Xavier, G. R. (2013) Sucesso na inoculação do feijão-caupi com rizóbio na África ocidental. III CONAC. Congresso nacional de Feijão-caupi. Área: Microbiologia. Recife – PE. p. 1.
- Brito, M. M. P.; Muraoka, T. & Silva, E. C. (2009) Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada consumo de 15N. R. Bras. Ci. Solo, 33:1215-1226.
- Campos, F. L.; Lopes, A. C. A; Freire Filho, F. R. & Queiroz, V. R. (2000) Ciclo Fenológico em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.): uma proposta de escala de desenvolvimento. Revista Científica Rural, v.5: p.110-116.
- Campos, J. H. B. C.; Madson, T. S. & Silva, V. P. R. (2010) Impacto do aquecimento global no cultivo do feijão-caupi, no Estado da Paraíba. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.14, n.4: p.396-404.

- Cardoso, M. J.; Melo, F. De B.; Andrade Júnior, A. S. & Lima, M. G. (2000) Clima e aspectos de plantio. In: CARDOSO, M. J. (Org.). A cultura do feijão-caupi no meio-norte do Brasil. Teresina: Embrapa Meio-Norte, p. 49-88.
- Chagas Júnior, A. F.; Oliveira, L. A.; Oliveira, A. N. & Willerding, A. L. (2009) Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central. Acta Amazônica vol. 39 p. 489 – 494.
- Chagas Júnior, A. F.; Rahmeier, W.; Fidelis, R. R.; Santos, G. R. & Chagas, L. F. B. (2010) Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbios inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Grupeto. Revista Ciência Agronômica, v. 41, out-dez, 2010.
- Chalk, P. M.; Alves, B. J. R.; Boddey, R. M. & Urquiaga, S. (2010) Integrated effects of abiotic stresses on inoculant performance, legume growth and symbiotic dependence estimated by ^{15}N dilution. Plant and Soil, 328:1-16.
- Chen, W. X.; Yan, G. H. & Li, J. L. (1988) Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 38, p. 392-397.
- Chueiri, W. A.; Pajara, F. & Bozza, D. (2007) Importância da inoculação e nodulação na cultura da soja. Manah: técnicas de adubação, nº 169. Disponível em: <http://www.manah.com.br>. Consultado a 12/01/2016.
- Conceição, J.; Grangeia, R. & Gala, T. (2009) Importância do azoto. Disponível em <http://tiagogala.no.sapo.pt/FQ/11-FQ-azoto.doc>. Consultado a 13/05/2016.
- Cruz, S. C. S.; Pereira, F. R. S.; Santos, J. R.; Albuquerque, A. W. & Pereira, R. G. (2008) Adubação nitrogenada para o milho cultivado em sistema plantio directo, no Estado de Alagoas. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. Campina Grande, PB, UAEA/UFCG. v.12, n.1, p.62–68.
- Diniz, A. C. (1991) Angola o meio físico e potencialidades agronômicas. Lisboa, Instituto para a Cooperação Económica. p. 102-110.
- Doorenbos, J. & Kassam, A. H. (2000) Efeito da água no rendimento das culturas. 2.ed. Campina Grande: UFPB, 221p. (Estudos FAO: Irrigação e Drenagem, 33).
- Duarte, M. F.; Pocojeski, E.; Silva, L. S.; Graupe, F. A. & Britzke, D. (2007) Perdas de nitrogênio por volatilização de amônia com aplicação de ureia em solo de várzea com diferentes níveis de humidade. Ciência Rural, v.37, n.3, mai-jun, 2007.

- Dumet, D.; Adeleke, R. & Faloye, B. (2008) Diretrizes de regeneração: feijão-frade ou feijão-caupi. Em: Dulloo, M.E., Thormann, I., Jorge, M.A. & Hanson, J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 8 pp.
- Embrapa (2004) Cultivo do feijão-caupi. EMBRAPA Meio Norte. Teresina, PI. Setembro de 2004.
- Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (2007) Origem e história do feijão. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br>. Consultado a 08/03/2016.
- Fancelli, A. L. & Dourado-Neto, D. (2000) Produção de milho. Guaíba: Agropecuária, 360p.
- FAO (2012) FAOSTAT. Crops. Cow peas, dry. Disponível em: <http://faostat.fao.org> Consultado a 15/02/2016.
- Fernandes, M. F.; Fernandes, R. P. M. & Hungria, M. (2003) Seleção de rizóbios para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.38, n.7, p. 835-842, julho de 2003.
- Fernandes, J. R. C. & Rodrigues, P. (2014) Importância da inoculação com bactérias *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* na produção de leguminosas e o uso do azoto. Horto-fruticultura e Floricultura. Disponível em www.agronegocios.eu/noticias/seccao/hortofruticultura. Consultado a 12/11/2015.
- Ferreira, E. P. B.; Martins, L. M. V.; Xavier G. R. & Rumjanek, N.G. (2011) Nodulação e produção de grãos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculado com isolados de rizóbio. Revista Caatinga, Mossoró, v. 24, n. 4, p. 27-35, out.-dez., 2011.
- Figueiredo, M. V. B.; Burity, H. A.; Stmford, N. P. & Santos, C. E. R. S. (2008) Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guaíba: Agrolivros, 568 p.
- Fleischman, D. & Kramer, D. (1998) Photosynthetic rhizobia. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1364, p. 17-36.
- Freire Filho, F. R.; Ribeiro, V. Q.; Barreto, P. D. & Santos, A. A. (2005) Melhoramento genético. Em: Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p.29-92.

- Freire Filho, F. R. (2011) Feijão-caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: EMBRAPA Meio Norte, , 84 p. Disponível em: www.embrapa.com!buscadepublicacao!916831!feijão. Consultado a 15/06/2016.
- Frigo, G. R. (2013) Feijão-caupi submetido à inoculação com rizóbio e cultivado em latossolo do cerrado matogrossense. RONDONÓPOLIS – MT. p.13-20.
- Frota, K. D. M. G.; Soares, R. A. M. & Areas, J. A. G. (2008) Composição química do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.28: p. 470-476.
- García, A. F; Moctezuma, J. G. A; Rodríguez De La O; J. L. & Ambris, A. C. (2008) Germinación in vitro de semillas de *Nolinaparviflora* (H.B.K.) Hemsl. ForestaVeracruzana. 10(2): 27-33.
- Garrity, G. M. & Holt, J. G. (2001) The road map to the Manual. Em: Garrity, G. M.; Boone, D. R.; Castenholz, R. W. (Ed). Bergey's manual of systematic bacteriology (Ed. 2) New York: Springer-Verlag, v.1: p. 119-154.
- Ghildiyal, S. K.; Sharma, C. M. & Khanduri, V. P. (2007) Improvement in germination of Chirpine (*Pinus roxburghii*) by a preso wing treatment with hydrogen peroxide. Journal of Tropical Forest Science. 19:113–118.
- Gillis, M.; Janssens, D.; Hoste, J.; Kersters, J.; Dobereiner, J. & De Ley, J. (2008) Genotypic and phenotypic characterization of new nitrogen-fixing *Acetobacter* sp. Associated with sugar cane. Em: International Congress of Nitrogen Fixation, 7, Koln, 2008. Abstracts... Koln (Cologne), University of Cologne/Max Planck Institute for Plant Breeding Session. p. 8-17.
- Giraud, E.; Hannibal, L.; Fardoux, J.; Verméglio, A. & Dreyfus, B. (2000) Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene* 50 sensitive. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, p. 14795-14800.
- Gómez, L. A.; Vazez, V.; Hernández, Z.; Sánchez, T.; Toscano, V. & Sánchez, M. (2002) Evaluation of tolerance to phosphorus shortage in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) in Cuba. I. nutritive solution culture. AGRONOMÍA MESOAMERICANA 13(1): p.59-65.

- Gonzaga, S. S. (2002) Inoculação de sementes de leguminosas. Disponível em: www.caprilvirtual.com.br/artigos-legum-cppsul.pdf. Consultado a 28/04/16.
- Graham, P. H. & Vance, C. P. (2003) Legumes: Importance and constraints to greater utilization. *Plant Physiology*, v.131: p.872-877.
- Hartwig, U. A. (1998) The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, v. 1: p. 92-120.
- Hirsch, P. R. (1996) Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia In: *The Field*. *New Phytologist*, v. 133: p. 159-171.
- Hungria, M. & Vargas, M. A. T. (1994) Fixação biológica do nitrogénio em soja. Em: Araújo, R. S.; Hungria, M. *Microorganismos de importância Agrícola*. Brasília: Embrapa-SPI, p. 9-90.
- Hungria, M. & Vargas, M. A. T. (2000) Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, v. 65: p. 151-164.
- Hungria, M.; Campo, R. J.; Mendes, I. C. & Graham, P. H. (2006) Contribution of biological nitrogen fixation to the Nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: Singh, R. P.; Shankar, N. ; Jaiwal, P. K. (Ed.). *Nitrogen nutrition and sustainable plant productiv.* Houston: Studium Press, p. 43-93.
- Missão de Pedologia de Angola (1961) Carta geral dos solos de Angola. Distrito de Huambo. 2ª Série, Nº 27, 275 p.
- Kahindi, J. H. P.; Woome, P.; George, T.; Moreira, F. M. S.; Karanja, N. K. & Giller, K. E. (1997) Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied Soil Ecology*, v. 6, p. 55-76.
- Kluthcouski, J; Aida, H.; Thung, M.; Oliveira, F. R. A. & Cobucci, T. (2005) Manejo antecipado do nitrogênio nas principais culturas anuais. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 63 p.
- Lacerda, A. M & Moreira, F. M. S. (2000) Eficiência e selecção de isolados de rizóbio em *Vigna unguiculata*. Em: Congresso de Iniciação Científica da UFLA, 13, 2000. Resumos, UFLA, p. 46.

- Lacerda, A. M.; Moreira, F. M. S.; Andrade, M. J. B. & Soares, A. L. L. (2004) Efeito de estirpes de rizóbios sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. *Revista Seres*, 51(293): 67-82.
- Liu, J.; Wang, E. T. & Chen, W. X. (2005) Diverse rhizobia associated with wood legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of the China. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(5):465-477.
- Machado, J. C.; Oliveira, J. A.; Vieira, M. G. G. C. & Alves, M. C. (2006) Desenvolvimento de mudas de leucaena e flamboyant em diferentes composições de substratos. *Revista Verde de Agronomia e Desenvolvimento Sustentável*, v.1: p.16-23.
- Manchanda, G. & Garg, N. (2008) Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 30, p. 595-618.
- Martins, L. M. V.; Xavier, G. R.; Neves, M. C. P. & Rumjanek, N. G. (1997) Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbios. Embrapa. Comunicado Técnico. Nº 19. Dez. p. 1-14.
- Molouba, F.; Lorquin, J.; Willems, A.; Hoste, B.; Giraud, E.; Dreyfus, B.; Gillis, M.; Lajudie, P. & Boivin-Masson, C. (1999) Photosynthetic *Bradyrhizobia* from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. v. 65, p. 3084-3094.
- Moreira, F. M. S. & Siqueira, J. O. (2002) Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA. 626p.
- Moreira, F. M. S. & Siqueira, J. O. (2006) Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 729p.
- Moreira, F. M. S. (2008) Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosas. Em: Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O.; Brussaard, L. Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: UFLA, p. 621-680.
- Motta, J. S. (2002) Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium sp.* isoladas de áreas de mineração de Bauxitas reabilitadas. Lavras: Universidade Federal de Lavras, (Dissertação de Mestrado) 43p.
- Moura, J. Z.; Pádua, L. E. M.; Moura, S. G.; Torres, J. S. & Silva, P. R. R. (2012) Desenvolvimento fenológico e exigência térmica associada a graus-dia do feijão-caupi. *Revista Caatinga*. v. 25: N. 3.

- 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. (2010) Efficiency of native rhizobia isolates from Paraíba state on cowpea. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.5: n.1, p.36-42, jan.-mar., 2010.
- Nascimento, J. ; Faustino, M. N. S; J. Meneses, A. G. ; Silva, J. V.; Silvas, S. S. & Carvalho, C. M. (2012) Crescimento inicial do feijão-de-corda preto sob diferentes condições de sombreamento e adubação nitrogenada. Fortaleza – Ceará.
- Newton, W. E. (2000) Nitrogen fixation in perspective. Em: Pedrosa, F. O.; Hungria, M.; Yates, M. G.; Newton, W. E. (Eds.). Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Nóbrega, J. Q.; Rao, T. V. R.; Beltrão, N. E. De M. & Fidelis Filho, J. (2001) Análise de crescimento do feijoeiro submetido a quatro níveis de umidade do solo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.5, n.3: p.437-443.
- Novais, R. F.; Alvarez, V.; H. Barros, F. N.; Fontes, R. L. P.; Cantarutti, R. B. & Neves, J. C. L. (2007) Fertilidade do solo. 1º ed. p. 400-407.
- Oliveira, J. P. (2009) Investigação da variabilidade genética em rizóbios que nodulam o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes centros de diversidade. Curitiba. p. 13.
- Onofre, A. V. C. (2008) Diversidade genética e avaliação de genótipos de feijão-caupi contrastantes para resistência aos estresses bióticos e abióticos com marcadores SSR, DAF e ISSR. Dissertação (Mestrado em Botânica - Melhoramento Genético de Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Pedro, J. (2007) Uso, manejo e caracterização de agricultores e de variedades locais angolanas de feijão macunde (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis Santa Catarina – Brasil. 110 p.
- Pimratch, S. (2004) Heritability and correlation for nitrogen fixation and agronomic traits of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Songklanakarin Journal Science Technology*, v.26, n.3, p. 305-315.

- Pimratch, S.; Jogloy, S.; Toomsan, B.; Jaisil, P.; Kesmala, T. & Patanothai, A. (2004) Evaluation of seven peanut genotypes for nitrogen fixation and agronomic traits. Songklanakarin Journal Science Technology, v.26, n.3: p. 295- 304.
- Pitard, R. M. (2000) Banco de germoplasma de bactérias diazotróficas e actinomicetos. Disponível em: www.cnpab.embrapa.br. Consultado a 29/04/2016.
- Rahmeier, W. (2009) Caracterização de isolados e eficiência de estirpes de rizóbios em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal da Fundação Universidade Federal do Tocantins. 68 p.
- Rumjanek, N. G. (2005) Fixação biológica de nitrogênio. In: Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. A.; Ribeiro, V. Q. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa. p. 279-335.
- Saboya, R. C. C.; Borges, P. R. S.; Saboya L. M. F.; Siebeneichler, S. C. & Xavier, G. R. (2008) Inoculação de rizóbio em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em latossolo vermelho-amarelo em Gurupi, TO. Embrapa Cerrado. Doc 230. 1ª Ed. p. 15.
- Santos, J. Q. (2012) Fertilização: Fundamentos da utilização dos adubos e corretivos. 4ª ed. Publicações Europa América. Coleção EUROAGRO. p. 44-66.
- Santos, A. B. & Silva, O. F. (2002) Manejo do nitrogênio. Em: Aidar, H.; Kluthcouski, J. & Stone, L. F. Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 207-216.
- Santos, C. E. R. S.; Stamford, N. P.; Borges, W. L.; Neves, M. C. P.; Runjanek, N. G.; Nascimento, L. R. S.; Freitas, A. D. S.; Vieira, I. M. M. B. & Willems, A. (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant and Soil, v.287: p.3-14.
- Silva, V. N.; Silva, L. E. S. F. & Figueiredo, V. B. (2006) Atuação de rizóbio com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp). Acta Scientiarum Agronomy, 28(3): 407-412.
- Silva, M. F. (2007) Efetividade da inoculação com *Bradyrhizobium* spp. em amendoim cultivado em solo da zona da mata de Pernambuco. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 56p.
- Silva, M. F. (2011) Taxa de inóculo na habilidade competitiva de rizóbios e eficiência na fixação do N₂ em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). RECIFE, 74 p.

- Silva, M. F.; Rosália, C. E.; Santos, S.; Sousa, C. A.; Araújo, R. S. L.; Stamford, N. P. & Figueiredo, M. V. B. (2012) Nodulação e eficiência da fixação do N₂ em feijão-caupi por efeito da taxa do inoculo. Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.
- Soares, A. L. L.; Pereira, J. P. A. R.; Ferreira, P. A. A.; Vale, H. M. M.; Lima, A. S.; Andrade, M. J. B. & Moreira, F. M. S. (2006) Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi. R. Bras. Ci. Solo, 30(5):795- 802.
- Straliotto, R. (2002) A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro. Embrapa Publicações, Novembro de 2002. Disponível em <http://www.cnpab.embrapa.br/publicações/>. Consultado a 24/05/2016.
- Teixeira, M. L. F.; Coutinho, H. C. L. & Franco, A. A. (1996) Effects of *Cerotoma arcuata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on predation of nodules and on N₂ of *Phaseolus vulgaris* Row crops, forage and small grains. Entomological Society of America, v. 89, p. 165-169.
- Van Berkum, P.; Tully, R. E. & Keister, D. L. (1995) Nonpigmented and bacteriochlorophyll-containing bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene indica*. Applied Environmental Microbiology, v. 61, p. 623–629.
- Wadisirisuk, P. & Weaver, R.W. (1985) Importance of bacteroid number in nodules and effective nodule mass to dinitrogen fixation by cowpeas. Plant and Soil, v.87: p. 223-231.
- Weber, M.A. & Mielniczuk, J. (2009) Estoque e disponibilidade de nitrogênio no solo em experimento de longa duração. Revista Brasileira de Ciência do Solo. n.33. p. 429-437.
- Xavier, T. F; Araújo, A. S.; Santos, V. B. & Campos, F. L. (2005) Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. Trabalho de iniciação científica do primeiro autor na Universidade Estadual do Piauí-Brasil.
- Xavier, G. R.; Martins, L. M. V.; Ribeiro, J. R. A. & Rumjanek, N. G. (2006) Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. Caatinga (Mossoró, Brasil), v.19, n.1: p.25-33.

- Xavier, G. R.; Martins, L. M.; Rumjanek, N. G. & Neves, M. C. P. (2007) Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro. *Caatinga* (Mossoró, Brasil), v. 20, n. 4, p. 01-09.
- Xavier, T. F. X.; Araújo, A. S. F.; Santos, V. B. & Campos, F. L. (2008) Inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e a produtividade de grãos de feijão-caupi. *Ciência Rural*, v.38, n.7.
- Zhang, W. T.; Yang, J. K.; Yuan, T. Y. & Zhou, J. C. (2007) Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Biology and Fertility of soils*, v.44, p.201-210.
- Zilli, J. E.; Valisheski, R. R.; Freire Filho, F. R.; Neves, M. C. P. & Rumjanek, N.G. (2004) Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.35, p.281-287.
- Zilli, J. E.; Valichski, R. R.; Rumjanek, N. G.; Simões-Araújo, J. L.; Freire Filho, F. R. & Neves, M. C. P. (2006) Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41: p. 811-818.
- Zilli, J. E; Marson, L. C.; Marson, B. F; Rumjanek, N. G. & Xavier, G. R. (2009) Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. *Revista ACTA Amazônica*. v. 39, n. 04, p. 749-758.