

**Fixação Biológica do Nitrogênio
e Colonização Micorrízica em
Genótipos de Caupi
(*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)
Cultivados em Solo de
Tabuleiros Costeiros**





ISSN 1678-1961

Dezembro, 2008

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 35

Fixação Biológica do Nitrogênio e Colonização Micorrízica em Genótipos de Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Cultivados em Solo de Tabuleiros Costeiros

Marcelo Ferreira Fernandes

Antônio Carlos Barreto

Roberta Pereira Miranda Fernandes

Jean Karla Sant´anna de Araújo

Aracaju, SE
2008

Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=fixas&pagina=publicacoesonline>

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Av. Beira Mar, 3250, Aracaju, SE, CEP 49025-040
Caixa Postal 44
Fone: (79) 4009-1344
Fax: (79) 4009-1399
www.cpatc.embrapa.br
sac@cpatc.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Ronaldo Souza Resende
Secretária-Executiva: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Membros: Semíramis Rabelo Ramalho Ramos, Julio Roberto Araujo de Amorim, Ana da Silva Léo, Daniel Luis Mascia Vieira, Maria Geovânia Lima Manos, Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Hymerson Costa Azevedo.

Supervisora editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Tratamento de ilustrações: Sandra Helena dos Santos
Editoração eletrônica: Sandra Helena dos Santos
Foto da Capa: Marcelo Ferreira Fernandes

1ª edição

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Fernandes, Marcelo Ferreira

Fixação biológica do nitrogênio e colonização microrrizica em genótipos de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivados em solos de tabuleiros costeiros / Marcelo Ferreira Fernandes ... [et al.]. -- Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2008.

15 p. : il. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN1678-1961; 35).

Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=fixas&pagina=publicacoesonline>

1. Feijão caupi. 2. Melhoramento genético. I. Barreto, Antônio Carlos. II. Fernandes, Roberta Pereira Miranda. III. Araújo, Jean Karla Sant'anna de. IV. Título. V. Série.

CDD 635.65

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	11
Conclusões	16
Agradecimento	17
Referências Bibliográficas	17

Fixação Biológica do Nitrogênio e Colonização Micorrízica em Genótipos de Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Cultivados em Solo de Tabuleiros Costeiros

Fernandes, M.F.; Barreto, A.C.; Fernandes, R.P.M.; Araújo, J.K. de S.

Resumo

Resumo: O presente estudo foi conduzido para avaliar a variabilidade entre dez genótipos de caupi quanto a características relacionadas à fixação biológica do nitrogênio (FBN) e à colonização por fungos micorrízicos arbusculares (FMA). O experimento foi implantado em um solo Argissolo Amarelo distrófico, típico dos tabuleiros costeiros, situado no Campo Experimental de Umbaúba da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Umbaúba, SE). Foram avaliadas nove linhagens e uma cultivar de caupi, sendo o experimento disposto em delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições. Após 48 dias do plantio, quando todos os genótipos apresentavam-se em início de floração, foram coletadas a seiva xilemática, a parte aérea, as raízes e os nódulos rizobianos. Determinaram-se a eficiência relativa da FBN, descrita pela relação entre as concentrações de N-ureído e N-total na seiva, a matéria seca dos nódulos, a porcentagem de colonização das raízes por FMAs e os teores de N e P na parte aérea. Observaram-se diferenças significativas na massa seca de nódulos por planta, sendo a maior nodulação obtida na cultivar IPA 205. A linhagem com maior eficiência da FBN para a nutrição nitrogenada das plantas durante o florescimento foi a 698003, com 49% do N da seiva derivado deste processo. A porcentagem do comprimento radicular colonizado por fungos micorrízicos variou de 43 a 57% entre os genótipos estudados. Estes resultados indicam que o caupi apresenta alta variabilidade intraespecífica quanto à capacidade de obtenção de benefícios da FBN e quanto à intensidade de colonização micorrízica.

Biological Nitrogen Fixation and Mycorrhizal Colonization in Genotypes of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Grown in a Coastal Tableland Soil

Abstract

Summary: This study was carried out to evaluate the variability among ten cowpea genotypes regarding biological nitrogen fixation (BNF) and mycorrhizal colonization traits. The experiment was installed in an Argissolo Amarelo Distrófico (Ultisol), typical of the coastal tablelands, located at the Umbaúba Experimental Station (Embrapa Coastal Tablelands, Umbaúba, SE, Brazil). Nine lineages and one cultivar of cowpea were evaluated in an experiment laid out in a randomized block design, with four replicates. Forty-eight days after sowing, xylem sap, shoots, roots and nodules were collected. The relative dependency of plants on FBN, expressed as the ratio between ureide-N and total-N concentrations in the xylem sap, the dry weight of nodules, the percent of the root length colonized by mycorrhizal fungi, and the shoot P and N concentrations were measured. Significant differences were observed in the dry matter of nodules per plant, with the highest values obtained in cultivar IPA 205. The lineage with the highest dependency on BNF at flowering was the 698003, with 49% of the N in xylem sap derived from this process. The percent of the root length colonized by mycorrhizal fungi varied from 43 to 57% among the studied genotypes. These results demonstrate a wide intra-specific variability regarding the capacity of cowpea to obtain benefits from BNF and the intensity of mycorrhizal colonization.

Introdução

A salinização é um dos principais fatores que afetam milhões de hectares de terra. O caupi é uma das culturas de maior importância na alimentação da população dos estados do Nordeste do Brasil, sendo cultivada essencialmente por pequenos produtores. Desta forma, alternativas que propiciem a elevação da produtividade desta cultura sem onerar os custos de produção são de importância social e econômica para a região.

Uma das estratégias para redução dos custos de produção do caupi é a seleção de genótipos cujas associações simbióticas com microrganismos do solo apresentem alta eficiência na aquisição de nutrientes, especialmente nitrogênio (N) e fósforo (P).

Por se associar simbioticamente com bactérias fixadoras do N_2 atmosférico dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (Fernandes *et al.*, 2003; Zilli *et al.*, 2004; Zilli *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2006; Xavier *et al.*, 2007), o caupi apresenta grande potencial de crescimento em solos deficientes em nitrogênio.

Além disto, as raízes do caupi associam-se a fungos micorrízicos-arbusculares (FMAs), estabelecendo uma simbiose denominada micorriza (Muthukumar e Udaiyan, 2002). O efeito mais notável desta associação para as plantas é o incremento da absorção de P, principalmente em condições de restrição deste nutriente no solo (Hayman *et al.*, 1978). Pelo fato de diversas leguminosas tropicais apresentarem alta intensidade de colonização radicular e densidade de esporos de FMAs em sua rizosfera, o cultivo destas pode aumentar o número de propágulos destes fungos e o potencial de inóculo do solo (Harinikumar e Bagyaraj, 1988; Espíndola *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 1999). Hungria *et al.* (1997) relataram que o cultivo do feijoeiro, foi capaz de incrementar não apenas o número de esporos de FMA no solo, mas também a diversidade de espécies destes fungos, comparativamente ao cultivo do milho. Assim, o cultivo consorciado de leguminosas com algumas culturas altamente micotróficas, como citros, mandioca e algodão pode resultar em maior colonização micorrízica das raízes destas últimas e, conseqüentemente, em maior capacidade de absorção de fósforo e maior produtividade em condições de utilização reduzida de insumos.

A existência de variabilidade genética intraespecífica quanto à capacidade de FBN (Franco *et al.*, 2002; Hungria e Boher, 2000) e quanto à capacidade de colonização micorrízica (Khalil *et al.*, 1994; Khalil *et al.*, 1999) já foi relatada para algumas espécies de importância agrônômica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar nove linhagens e uma cultivar de caupi quanto à FBN e colonização por fungos micorrízicos nativos dos tabuleiros costeiros, visando selecionar linhagens com maior potencial de obtenção de benefícios destas interações com microrganismos do solo.

Material e Métodos

O experimento foi instalado no campo Experimental de Umbaúba (Embrapa Tabuleiros Costeiros) localizado no município de Umbaúba, SE (11°20'S e 37°40'W), em um solo classificado como Argissolo Amarelo distrófico A moderado. A caracterização química do solo é apresentada na Tabela 1.

Foram avaliadas nove linhagens de caupi do tipo ramador, denominadas 16001, 579002, 139003, 349000, 190004, 698003, 198001, 570007, 1982002, e a cultivar IPA 205. O experimento foi disposto no delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições.

Imediatamente antes do plantio, o solo foi adubado com 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅, sob a forma de superfosfato simples, e 30 kg ha⁻¹ de K₂O, como cloreto de potássio. Foram utilizadas quatro sementes por cova, em espaçamento de 80 x 40 cm. Após duas semanas do plantio, efetuou-se desbaste deixando-se duas plantas por cova. Não foram realizadas inoculações com rizóbios e FMAs.

Tabela 1. Caracterização química do solo utilizado no experimento

Variáveis químicas	Valores
pH em água (1:2,5)	4,8
Matéria orgânica ⁽¹⁾	19 g dm ⁻³
N total ⁽²⁾	1 g dm ⁻³
P ⁽³⁾	7 mg dm ⁻³
K ⁽⁴⁾	0,1 cmol _c dm ⁻³
Ca ²⁺ + Mg ²⁺ ⁽⁵⁾	0,9 cmol _c dm ⁻³
Al ³⁺ ⁽⁵⁾	0,3 cmol _c dm ⁻³

⁽¹⁾ Método de Walkley-Black Embrapa 1997 (Jackson, 1959)

⁽²⁾ Embrapa, 1997

⁽³⁾ Extraído com Mehlich-1, determinado de acordo com (Embrapa 1997)

⁽⁴⁾ Extraído com Mehlich-1, determinado por fotometria de chama (Embrapa, 1997)

⁽⁵⁾ Extraídos com KCl 1 N, determinados por espectrometria de absorção atômica (Embrapa, 1997)

Aos 48 dias após o plantio, quando aproximadamente todos os genótipos se apresentavam em início de floração, as plantas contidas em uma área de 1 m² de cada parcela experimental foram cortadas a cerca de 3 cm do coleto. A parte aérea foi coletada, secada em estufa de ventilação forçada (65°C, 72 h) e triturada em moinho de facas para posterior determinação dos teores de P e N (Embrapa, 1997).

A seiva xilemática exsudada na região do corte foi coletada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur por cerca de 15 min., acondicionada em frasco de vidro e armazenada a -20°C. As concentrações de N total (Bohley, 1967, citado por Hungria, 1994) e N-ureído (Vogels e van der Drift, 1970) da seiva xilemática foram determinadas por colorimetria, visando determinar a relação N-ureído: N-total, utilizada para avaliar a contribuição da FBN para cada genótipo. Esta relação tem sido indicada como uma importante característica a ser avaliada para a seleção de rizóbios eficientes e cultivares de leguminosas com alto potencial de FBN, já que associações eficientes resultam em transporte de uma maior concentração do N-total sob a forma de N-ureído na seiva xilemática (Neves *et al.*, 1982; Hungria e Neves, 1986; Herridge e People, 2002).

Amostras de raízes frescas foram retiradas durante a coleta, cortadas em segmentos de 1 a 2 cm de comprimento e acondicionadas em etanol 50% para determinação da intensidade de colonização micorrízica. Estas amostras foram tratadas de acordo com a técnica proposta por Koske e Gema (1989) para coloração das estruturas fúngicas. O comprimento radicular colonizado por FMA foi determinado pelo método das interseções em placa reticulada proposto por Ambler e Young (1977) e testado por Giovanetti e Mosse (1980). Foram contadas, no mínimo, 100 interseções sob microscópio estereoscópico com aumento de 40 vezes.

As médias das variáveis foram comparadas entre os diferentes genótipos pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Os valores de contribuição percentual da FBN foram correlacionados aos de matéria seca de nódulos e aos teores de N na parte aérea utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. A análise de componentes principais (ACP) foi utilizada para ordenar os genótipos estudados de acordo com as características simbióticas e quanto aos teores de P e N, avaliados conjuntamente. Para esta análise utilizou-se uma matriz de variância-covariância obtida após a relativização de cada variável pelo respectivo valor máximo. Correlações de Pearson entre os valores das variáveis estudadas e os escores dos genótipos na ordenação foram utilizadas para caracterizar as principais variações ocorridas ao longo dos eixos.

Resultados e Discussão

Observou-se variabilidade quanto à nodulação entre genótipos de caupi, sendo o máximo de massa seca de nódulo por planta obtido na cultivar IPA 205 (Figura 1). As demais linhagens produziram cerca de metade ou menos da massa de nódulos desta cultivar. Comparativamente aos resultados encontrados por Vasconcelos *et al.* (1988), a variedade IPA 205 superou a todos os 19 genótipos de caupi testados quanto à massa de nódulos por aqueles autores. Entretanto, a nodulação dos demais genótipos incluídos em nosso estudo é similar à dos avaliados por Vasconcelos *et al.* (1988).

Alta variabilidade genética na nodulação das raízes por rizóbios foi observada também em outras leguminosas como feijão (Pacovsky *et al.*, 1984; Graham, 1981) e soja (Peres e Vidor, 1980).

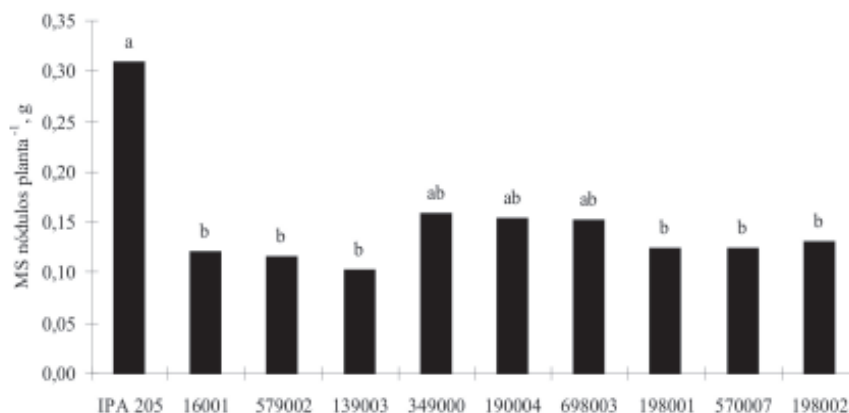


Figura 1. Produção de matéria seca (MS) de nódulos rizobianos por planta (g), em diferentes linhagens e na cultivar IPA 205 de caupi, cultivadas em solo de tabuleiro costeiro.

A contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada de caupi, expressa como porcentagem do N da seiva xilemática transportado sob a forma de N-ureído, variou de 27 a 49% (Figura 2). Esta contribuição foi menor do que a observada por Awonaike *et al.* (1990) e Eaglesham *et al.* (1982), que relataram valores nas faixas de 54-70 e 61-76%, respectivamente. Utilizando a técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, Boddey *et al.* (1990) estimaram que a contribuição da

FBN para o caupi foi de 70,3 a 73,5%, em experimento em Brasília, enquanto, no Rio de Janeiro, os valores obtidos (31,8-36,7%) foram semelhantes aos do presente trabalho.

Trabalhos anteriores (Neves *et al.*, 1982; Souza, 1991) mostraram que a atividade de nitrogenase de associações entre diferentes estirpes de rizóbios e cultivares de caupi atinge um máximo, aproximadamente, uma semana antes do início da floração, apresentando uma queda após este estágio. Desta forma, é possível que valores maiores de contribuição da FBN tenham sido atingidos anteriormente à data de coleta dos exsudatos no presente estudo. Além disso, é importante ressaltar que a não utilização de calagem neste experimento pode ter afetado negativamente a eficiência de FBN nos genótipos avaliados. Visto que a FBN responde positivamente aos teores de molibdênio no solo (Campo *et al.*, 1999), a baixa disponibilidade apresentada por este nutriente sob condições de acidez pode ter contribuído para reduzir a eficiência do processo simbiótico no presente estudo.

A linhagem 698003 apresentou a maior eficiência da FBN para a nutrição nitrogenada, embora tenha diferido estatisticamente apenas das linhagens 190004 e 579002, que foram os genótipos com menor eficiência deste processo.

Não foram observadas relações entre o acúmulo de matéria seca nos nódulos e contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada das linhagens de caupi (dados não mostrados). Esta ausência de correlação pode estar relacionada ao fato dos nódulos formados pelas associações entre as diferentes linhagens e os rizóbios apresentarem diferentes níveis de eficiência da FBN. Pacovsky *et al.* (1984), por exemplo, avaliaram características relacionadas à eficiência da FBN em três cultivares de *Phaseolus vulgaris* e observaram que a cultivar "Dwarf Horticultural", embora tenha apresentado menor massa de nódulos secos por planta, não diferiu das outras duas cultivares quanto à quantidade de N proveniente da FBN por planta. Os autores relatam, no entanto, que esta variedade apresentou maior atividade específica de nitrogenase g^{-1} de nódulo ($\text{mmol N}_2 \text{g de nódulo}^{-1} \text{h}^{-1}$), podendo esta maior eficiência da nitrogenase ter compensado a menor produção de massa nodular.

Quanto ao teor de N na parte aérea das plantas, foram obtidas diferenças significativas entre os genótipos de caupi (Figura 3). Observou-se ainda correlação negativa e significativa entre esses teores e a contribuição da FBN

para a nutrição nitrogenada (Figura 4). Neves *et al.* (1982) observaram que em feijão comum (cv. Rio Tibagi) existe uma correlação negativa entre a atividade de redutase do nitrato e a concentração de ureídeos na seiva, o que, de acordo com estes autores, indicaria que vias metabólicas de síntese de ureídeos funcionam alternativamente à da redutase do nitrato.

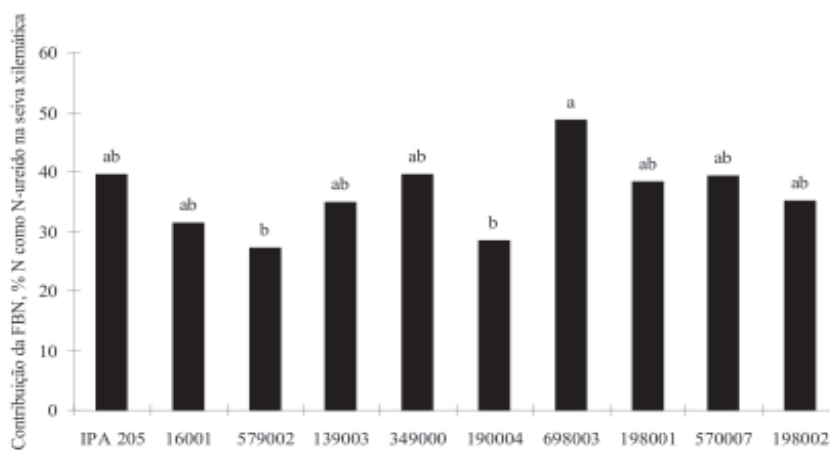


Figura 2. Contribuição da fixação biológica de N para a nutrição nitrogenada em diferentes linhagens e na cultivar IPA 205 de caupi cultivadas em solo de tabuleiros costeiros, expressa pela relação percentual entre os teores de N-ureído e N-total na seiva xilemática.

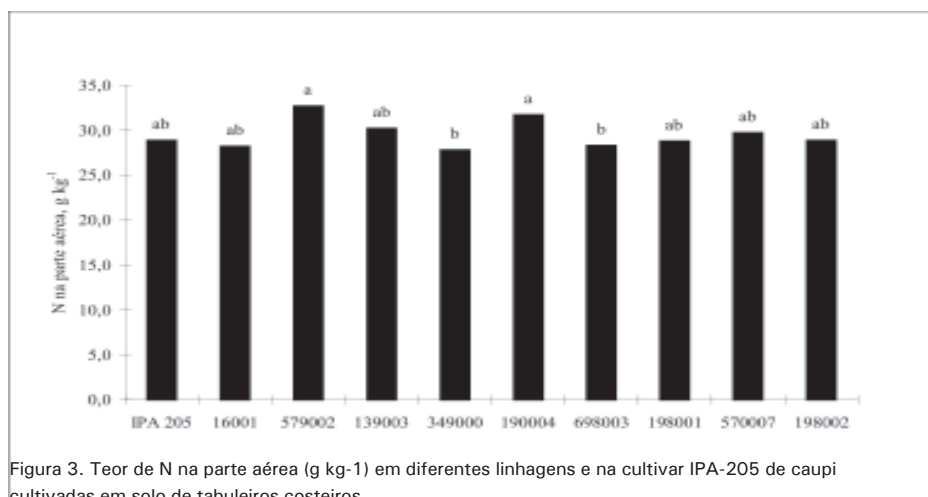


Figura 3. Teor de N na parte aérea (g kg⁻¹) em diferentes linhagens e na cultivar IPA-205 de caupi cultivadas em solo de tabuleiros costeiros.

14 Fixação Biológica do Nitrogênio e Colonização Micorrízica em Genótipos de Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Cultivados em Solo de Tabuleiros Costeiros

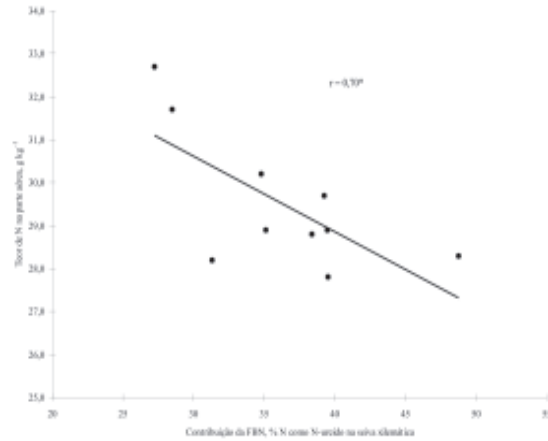


Figura 4. Correlação entre o teor de N na parte aérea e a contribuição da FBN para diferentes linhagens e para a cultivar IPA 205 de caupi cultivadas em solo de tabuleiros costeiros.

Assim, no presente estudo, um acúmulo precoce de N nos tecidos vegetais, via absorção e assimilação deste nutriente do solo, podem ter resultado em inibição de processos de FBN que surgiram mais tardiamente no ciclo da cultura. Diferenças entre linhagens de caupi quanto à intensidade de inibição da FBN pelo nitrogênio mineral também já foram relatadas por Eaglesham *et al.* (1982).

Os genótipos variaram quanto à capacidade de associação a FMAs nativos, observando-se percentagens de colonização radicular de 43 a 57% entre os mesmos (Figura 5).

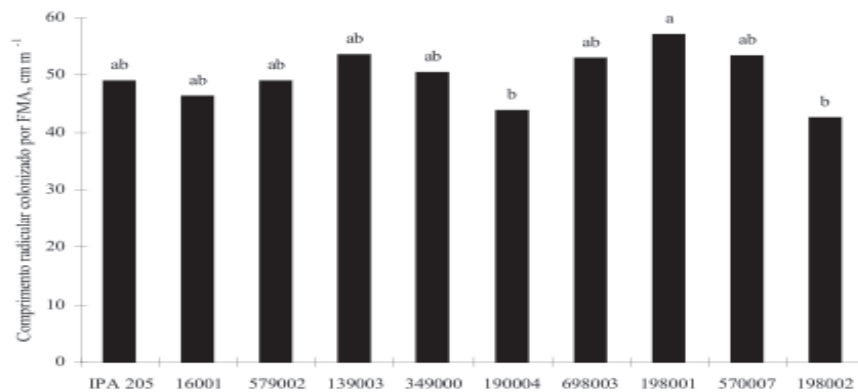


Figura 5. Porcentagem (cm m⁻¹) do comprimento radicular de diferentes linhagens e da cultivar IPA 205 de caupi colonizado por fungos micorrízicos arbusculares nativos em solo de tabuleiros costeiros.

Diferenças intra-específicas quanto ao número de esporos na rizosfera e à porcentagem de infecção radicular por fungos MA também foram observadas em amendoim (Kesava Rao *et al.*, 1990). Estes autores observaram, ainda, uma correlação significativa e positiva entre a porcentagem de colonização micorrízica e a produtividade de vagens de amendoim. Estas diferenças intra e interespecíficas na capacidade das plantas em desenvolverem associações com fungos MA têm sido atribuídas, principalmente, a algumas características relacionadas à capacidade de absorção e à demanda de nutrientes das espécies vegetais. Assim, plantas que apresentam sistemas radiculares eficientes na absorção de nutrientes (Crush, 1974; St. John, 1980), ou menor demanda por fósforo (Hall, 1975), tendem a apresentar menor colonização e dependência de fungos micorrízicos.

Não se observaram diferenças nos teores de P da parte aérea entre os genótipos estudados (média = 3,7 g kg⁻¹, erro padrão: 0,13, n = 40).

A Figura 6 representa a ordenação dos genótipos quanto às variáveis relacionadas às simbioses e aos teores de N e P, analisadas em conjunto. Da variabilidade total dos dados, 89% foram explicados pela ordenação; sendo 73% e 13% desta variabilidade representadas ao longo dos eixos 1 e 2, respectivamente. O eixo 1 foi caracterizado por um gradiente de nodulação, ao longo do qual observa-se um incremento altamente significativo na massa de nódulos a partir dos genótipos à esquerda em direção aos localizados à direita do gráfico. A cultivar IPA 205 apresentou grande superioridade em termos de nodulação em relação aos demais genótipos.

O eixo 2 foi negativamente correlacionado à eficiência da FBN (eFBN) e à porcentagem de colonização micorrízica (FMA), indicando um incremento gradual em ambas as características à medida que os genótipos são ordenados de cima para baixo no gráfico. O genótipo 698003 destacou-se quanto a estas duas características, sendo seguido por um grupo intermediário formado pelos genótipos 198001, 349000, IPA 205 e 570007.

Os teores de N na parte aérea (TN PA) apresentaram tendência oposta à observada para a eficiência da FBN e a colonização por FMA ao longo do eixo 2.

16 Fixação Biológica do Nitrogênio e Colonização Micorrízica em Genótipos de Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Cultivados em Solo de Tabuleiros Costeiros

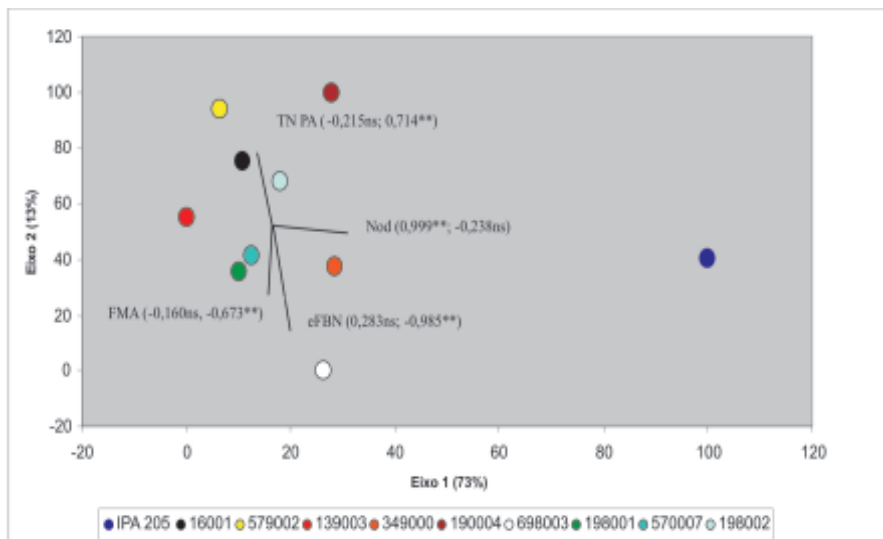


Figura 6. Ordenação multivariada (ACP) dos genótipos de caupi quanto às propriedades simbióticas [porcentagem de colonização por FMA (FMA); eficiência da FBN (eFBN), massa de nódulos por planta (Nod)] e aos teores de N (TN PA) e P na parte aérea. Valores entre parênteses, em frente aos nomes das variáveis analisadas, representam o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre estas variáveis e os eixos 1 e 2, respectivamente (**: $p < 0,01$; ns: não-significativo, $p > 0,05$). Valores percentuais entre parênteses nos eixos 1 e 2 representam a porcentagem da variabilidade total dos dados representada em cada um destes eixos.

Esses resultados indicam a possibilidade de obtenção de genótipos de caupi com alta eficiência simbiótica com rizóbios e FMA, simultaneamente. A obtenção destes materiais apresenta potencial de beneficiar a nutrição nitrogenada e fosfatada do caupi e, conseqüentemente, de contribuir para o aumento da produtividade e a redução nos custos de produção da cultura.

Conclusões

1. Os genótipos de caupi testados apresentam variabilidade genética quanto à contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada e quanto à intensidade de colonização radicular por fungos micorrízicos, destacando-se, respectivamente, quanto a estas variáveis, as linhagens 698003 e 198001.

2. O genótipo 698003 possui alta eficiência de FBN e colonização por FMA, simultaneamente, podendo representar uma alternativa importante de cultivo em condições de menor disponibilidade de N e P solúveis no solo.

Agradecimento

Os autores agradecem à Fundação Banco do Brasil pelo financiamento deste trabalho.

Referências Bibliográficas

AMBLER, J.R.; YOUNG, J.L. Techniques for determining roots length infected by vesicular-arbuscular mycorrhizas. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.41, p.551-556, 1977.

AWONAIKE, K.O.; KUMARASINGHE, K.S.; DANSO, S.K.A. Nitrogen fixation and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) as influenced by cultivar and *Bradyrhizobium* strains. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.4, p.163-171, 1990.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; NEVES, M.C.P. Quantification of the contribution of N₂ fixation to field grown legumes - a strategy for the practical application of the ¹⁵N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.649-655, 1990.

CAMPO, R.; ALBINO, U.; HUNGRIA, M. Importance of molybdenum and cobalt in the biological nitrogen fixation. In: Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, M.G., Newton, W.E.. (Org.). **Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1999, v. 38, p. 597-598.

COSTA, J.V.T.; LIRA Jr., M.A.; FERREIRA, R.L.C.; STAMFORD, N.P.; ARAÚJO, F.A.S. Desenvolvimento de nódulos e plantas de caupi (*Vigna*

unguiculata) por métodos destrutivo e não destrutivo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.19, p.11-19, 2006.

CRUSH, J.R. Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. **New Phytologist**, Oxford, v.72, p.743-749, 1974.

DAKORA, F.D.; ABOYINGA, R.A.; MAHAMA, Y.; APASEKU, J. Assessment of N₂-fixation in groundnut (*Arachis hipogaea* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and their relative contribution to a succeeding maize crop in Northern Ghana. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.3, p.389-399, 1987.

EAGLESHAM, A.R.J.; AYANABA, A.; RAO, V.; ESKEW, D.L. Mineral N effects on cowpea and soybean crops in a Nigerian soil. II. Amounts of N fixed and accrual to the soil. **Plant and Soil**, The Hague, v.68. p.183-192, 1982.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: Embrapa, 1997. 212p. : il. (Embrapa-CNPS. Documentos; 1).

ESPÍNDOLA, J.A.A.; ALMEIDA, D.L.; GUERRA, J.G.M.; SILVA, E.M.R., SOUZA, F.A. Influência da adubação verde sobre a simbiose micorrízica e a produção da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 5., Florianópolis, SC, 1994. **Resumos...** Florianópolis: UFSC, 1994. p.46.

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

FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C.; TSAI, S.M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.1145-1150, 2002.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford,

v.84, p.489-500, 1980.

GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.4, p.93-112, 1981.

HALL, I.R. Endomycorrhizas of *Metrosideros umbelata* and *Weinmannia racemosa*. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v.13, p.463-472, 1975.

HAYMAN, D.S. Endomycorrhizae. In: DOMMERGUES, Y.R.; KRUPA, S.V., ed. **Interactions between nonpathogenic soil microorganisms and plants**. Amsterdam: Elsevier, 1978. p.401-442.

HUNGRIA, M. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S., ed. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa - SPI, 1994, p.249-284.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura ou consórcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, p.807-818, 1997.

HUNGRIA, M.; BOHER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Ontogenia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, p.715-730, 1986.

JACKSON, M.L. Organic matter determination for soil. In: JACKSON, M.L., ed. **Soil Chemical Analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1958. p.205-226.

KESAVA RAO, P.S.; TILAK, K.V.B.R.; ARUNACHALAM, V. Genetic variation for VA mycorrhiza-dependent phosphate mobilisation in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v.122, p.137-142, 1990.

KHALIL, S.; LOYNACHAN, T.E.; TABATABAI, M.A. Plant determinants of

mycorrhizal dependency in soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v.91, p. 135-141, 1999.

KHALIL, S.; LOYNACHAN, T.E.; TABATABAI, M.A. Mycorrhizal dependency and nutrient uptake by improved and unimproved corn and soybean cultivars. **Agronomy Journal**, Madison, v.86, p.949-958, 1994.

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v.92, p.486-505, 1989.

NEVES, M.C.P.; FERNANDES, M.S.; SÁ, M.F.M. Assimilação de nitrogênio em plantas noduladas de *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, p.689-696, 1982.

PACOVSKY, R.S.; BAYNE, H.G.; BETHLENFALVAY, G.J. Symbiotic interaction between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. **Crop Science**, Madison, v.24, p.101-104, 1984.

PERES, J.R.R.; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja. **Agronomia Sul Riograndense**, Porto Alegre, v.16, p.205-219, 1980.

RAJAPAKSE, S.; ZUBERER, D. A.; MILLER Jr., J. C. Influence of phosphorus level on VA Mycorrhizal colonization and growth of cowpea cultivars. **Plant and Soil**, v.114, p. 45-52, 1989.

SIQUEIRA, J.O. Micorrizas arbusculares. In: ARAÚJO, R.; HUNGRIA, M., ed. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.151-194.

SOUZA, L.V. Efeito da deficiência hídrica sobre o crescimento, a fixação do dinitrogênio e a produção de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Recife, PE. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, 1991.

ST. JOHN, T.V. Root size, root hairs and mycorrhizal infection: a re-examination of Baylis's hypothesis with tropical trees. **New Phytologist**, Oxford, v.84, p.483-487, 1980.

VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em solos de cerrado. Brasília: Embrapa-CPAC/Embrapa-SPI, 1994. 83p.

VASCONCELOS, I.; MENDES FILHO, P.F.; FREIRE, V.F.; ALMEIDA, R.T. Variabilidade da nodulação e fixação biológica do nitrogênio entre cultivares de caupi, *Vigna unguiculata* (L) Walp. **Ciencia Agronômica**, Fortaleza, v.19, p.179-181, 1988.

VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analysis of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, New York, v.33, p.143-157, 1970.

XAVIER, T.F.; ARAÚJO, A.S.F.; SANTOS, V.B.; CAMPOS, F.L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, p.561-564, 2007.

ZILLI, J.E.; VALISHESKI, R.R.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.281-287, 2004.

ZILLI, J.E; VALICHESKI, R.R; RUMJANEK, N.G.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.811-818, 2006.

Embrapa

Tabuleiros Costeiros

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

