INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS VESÍCULO-ARBUSCULARES
E *Bradyrhizobium* spp. EM CAUPI
[*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

ROBERTO WAGNER CAVALCANTI RAPOSO
Engenheiro Agrônomo e Zootecnista

Orientador: SIU MUI TSAI

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro de 1989

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Raposo, Roberto Wagner Cavalcanti
R219t110 Inoculação de fungos micorrízicos, vesículo-arbus-
culares e Bradyrhizobium spp. em caupi | Vigna ungui-
culata (L.) Walp. | Piracicaba, 1989.
84 p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio - Inocula-
ção 2. Feijão-de-corda - Micorriza - Inoculação 3.
Feijão-de-corda - Nutrição 5. Micorriza - Inoculação
6. Nitrogênio - Fixação 7. Relação fungo-bactéria I.
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pi-
racicaba

CDD 635.652

INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS VESÍCULO-ARBUSCULARES
E *Bradyrhizobium* spp. EM CAUPI
[*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

ROBERTO WAGNER CAVALCANTI RAPOSO

Aprovada em: 30/11/89

Comissão Julgadora:

~~Drª SIU MUI TSAI~~ CENA/USP

~~Dr. MURILO DE MELO~~ CEBTEC/ESALQ/USP

~~Dr. TAKASHI MURAOKA~~ CENA/USP

Drª SIU MUI TSAI

- Orientador

Aos meus pais José e Eneida Raposo,

OFEREÇO.

À minha esposa Graça e aos
meus filhos Allison,
Ewerton e
Annie,

DEDICO.

HOMENAGEM

Ao CSTR/CAMPUS VII DA UFPB,
pelos 10 anos de serviços
prestados à Agropecuária
Brasileira.

AGRADECIMENTOS

À UFPB, CAPES/PICD, ESALQ e CENA, pela oportunidade da realização do curso e deste trabalho.

À Dr^a Siu Mui Tsai, por acreditar, confiar e me orientar.

Aos Drs. Takashi Muraoka e Murilo de Melo, pelas sugestões e amizade.

Aos laboratoristas Francisco Carlos Montrazi, pelo auxílio na realização das análises químicas, Sr. Mário e Márcio, da Seção de Microbiologia do Solo, do CENA/USP.

Aos laboratoristas da Nutrição Mineral de Plantas da ESALQ/USP, Marcelo, Lúcia, Ademir, pela amizade e análises efetuadas.

Aos colegas, Beto, Marli, Paulo, Rosângela, Therese, Oscar, Wilson, Contado e João Carlos, pela certeza que queremos um Brasil melhor.

À PUBLIQUE, pelos trabalhos datilográficos.

.v.

Aos professores e pesquisadores do CENA e da
ESALQ.

A todos, que direta ou indiretamente colaboraram
para a realização deste trabalho.

Í N D I C E

	página
LISTA DE TABELA.....	viii
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Experimento 1	17
3.1.1. Planta.....	17
3.1.2. Solo.....	18
3.1.3. Delineamento experimental.....	21
3.1.4. Preparo do inóculo.....	21
3.1.5. Instalação, condução e coleta do experimento.....	22
3.1.6. Parâmetros avaliados.....	22
3.2. Experimento 2	26
3.2.1. Planta.....	27
3.2.2. Estirpes e isolados de <i>Bradyrhizobium</i> spp.	27
3.2.3. Delineamento experimental.....	29
3.2.4. Instalação e condução do experi - mento.....	29

3.2.5. Parâmetros avaliados.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Experimento 1	33
4.2. Experimento 2	54
5. CONCLUSÕES.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

TABELA

página

6	Efeito de fungos micorrízicos no número, peso, atividade da enzima nitrógenoase em caupi, cultivares BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69.....	38
7	Porcentagem de colonização do sistema radicular e número de esporos no solo coletado ao final do experimento nos 2 cultivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69).....	40
8	Influência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares no número de folhas e superfície foliar em caupi, cultivares BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69.	42
9	Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares associados a dois cultivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69) no teor e acúmulo de N, P e K na parte aérea.....	44

TABELA

página

10	Eficiência de fungos micorrízicos vesí- culo-arbusculares associados a dois cul- tivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69) no teor e acúmulo de Ca, Mg e S na parte aérea.....	47
11	Eficiência de fungos micorrízicos vesí- culo-arbusculares associados a dois cul- tivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69) no teor e acúmulo dos mi- cronutrientes Fe, Mn, Cu e Zn na parte aérea.....	50
12	Efeito de diferentes estirpes e isola- dos de <i>Bradyrhizobium</i> spp. no número, peso e atividade da enzima nitrogenase nos nódulos de dois cultivares de cau- pi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69).....	55
13	Avaliação da eficiência simbiótica de estirpes e isolados de dois cultivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN v-69)	

TABELA

página

13	com base no peso da matéria seca da par	
	te aérea e teor e acúmulo de nitrogênio	
	e eficiência relativa.....	58

INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS
VESÍCULO-ARBUSCULARES E *Bradyrhizobium* spp.
EM CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

Autor: ROBERTO WAGNER CAVALCANTI RAPOSO

Orientador: SIU MUI TSAI

RESUMO

Para determinar o fungo micorrízico vesículo-arbuscular que possibilite uma melhor interação na tríplíce simbiose fungo MVA-caupi-*Rhizobium* e, selecionar as melhores estirpes de *Bradyrhizobium* sp. para caupi, na nodulação e fixação biológica de nitrogênio, dois experimentos foram instalados, em casa-de-vegetação, utilizando-se dois cultivares: BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69.

No primeiro experimento, um solo tipo areia quartzosa de Belém (PA), da Amazônia, com 23 ppm de P e 68% de saturação em bases, após a calagem, foi colocado em vasos de barro com 2,5 kg de capacidade. O delineamento foi um factorial inteiramente casualizado com quatro tratamentos (Fungos Nativos, *Acaulospora morrowae*, *Glomus etunicatum* e *Gigas*

pora margarita) e duas cultivares já mencionadas acima, com quatro repetições. O solo dos três tratamentos foi esterilizado com brometo de metila. Todos os tratamentos foram inoculados com *Bradyrhizobium* sp., estirpe C-516. As plantas foram colhidas para análise aos 81 dias após a germinação.

No segundo experimento, desenvolvido em vasos de Leonard modificado, sete estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (CM 1525, CM 1527, CM 1528, C-516, SMS 84, SMS 85 e SEMIA 6145), foram testadas contra dois controles (com 100 ppm de N e sem N), com quatro repetições. Aos quarentas e oito dias após a emergência as plantas foram colhidas para análise.

Houve um maior desenvolvimento vegetal e acúmulo de nutrientes nas duas cultivares quando foram introduzidos os fungos micorrízicos, tendo ocorrido diferenças a nível de cultivar, sendo *A. morrowae* ou *G. etunicatum* os mais eficientes para BR-08 Caldeirão e *G. margarita* ou *G. etunicatum* para o cultivar IPEAN V-69.

As estirpes SEMIA 6145, CM 1527 e CM 1528 foram as melhores para os dois cultivares em todos os parâmetros estudados. Notou-se certo grau de especificidade hospedeira para o isolado CM 1525, o qual foi eficiente para o cultivar IPEAN V-69 e não para o cultivar BR-08 Caldeirão.

INOCULATION OF VESICULAR-ARBUSCULAR
MYCORRHIZAL FUNGI AND *Bradyrhizobium* spp.
IN COWPEA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

Author: ROBERTO WAGNER CAVALCANTI RAPOSO

Adviser: SIU MUI TSAI

SUMMARY

In order to determine the effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the tripartite symbiosis VAM-cowpea-*Rhizobium*, and to select the best strains of *Bradyrhizobium* sp. for caupi, two experiments were carried out in greenhouse using two cowpea cultivars (BR-08 Caldeirão and IPEAN V-69).

In the first experiment, a quartz sand soil from Belém (PA) - Amazon, with 23 ppm P and 68% of basis saturation, after liming, was put in clay pots with 2.5 kg of capacity. The factorial design consisted of four treatments (Native fungi, *Acaulospora morrowae*, *Glomus etunicatum* and *Gigaspora margarita*) and two cowpea cultivars (mentioned above), with four applications. The soil was sterilized using

methyl bromide. All the treatments were inoculated with *Bradyrhizobium* sp., strain C-516. Plants were harvested 81 after germination.

In the second experiment, carried out in Leonard jars, seven strains of *Bradyrhizobium* sp. (CM 1525, CM 1527, CM 1528, C-516, SMS 84, SMS 85 and SEMIA 6145), were tested against two controls (with 100 ppm of N and without N), with four replications. After 48 days, the plants were harvest.

There was a greater development and nutrient uptake for both cultivars when the mycorrhizal fungi were inoculated. It was found differences in the effect of VAM fungus species on cowpea development, being *A. morrowae* or *G. etunicatum* the best species for the cultivar BR-08 Caldeirão and *G. margarita* or *G. etunicatum* for the cultivar IPEAN V-69.

The strains SEMIA 6145, CM 1527 and CM 1528 were the best for cultivars BR-08 Caldeirão and IPEAN V-69 in all parameters studied. However, there was a certain degree of specificity with the strain CM-1525 being efficient for cultivar IPEAN V-69 and not for cultivar BR-08 Caldeirão.

1. INTRODUÇÃO

Os solos da região amazônica vêm sendo explorados em ritmo acelerado nos últimos anos, no afã de desenvolver a agropecuária na região. Contudo, este tipo de exploração tem causado polêmica quanto à sua viabilidade (SCHUBART, 1977).

A bacia amazônica possui $2,8 \times 10^9$ ha de floresta tropical úmida remanescente no planeta. Em 1979, 1,1% dessa área tinha sido substancialmente alterado pelo homem, sendo que a taxa de desmatamento é estimada em 0,4% ao ano (GUSMÃO CÂMARA, 1983; GRAINER, 1983). Sua população é relativamente pequena e seus agricultores ganham seu sustento com uma agricultura nômade: a floresta é derrubada e queimada, sendo a cultura instalada entre os tocos e ramos parcialmente queimados; com os cultivos sucessivos, a fertilidade natural do solo entra em declínio, a potencialidade cai e em poucos anos a área é abandonada e uma outra parte da floresta é cortada e queimada para novo plantio.

Para o desenvolvimento agrícola racional da região Norte os Órgãos de Pesquisa desta região têm procurado desenvolver trabalhos que minimizem os efeitos adversos provindos do manejo inadequado gerado pela intensiva explora

ção dos solos para fins agrícolas. Com a intensificação da agricultura da região, o desgaste dos solos se torna um problema crucial, necessitando-se de soluções que somente a longo prazo poderão trazer benefícios (SCHUBART, 1977). A atenção da pesquisa deve portanto centralizar-se no uso adequado da terra, através da introdução de novos sistemas de cultivo que possam enriquecer o solo e aumentar a produtividade das culturas.

Nesse caso, as leguminosas nativas ou adaptadas com o potencial para a produção de biomassa (adubo verde ou forragem para o gado) ou de alimento para o homem (vagens e grãos), seriam indicadas para a manutenção da fertilidade dos solos. A vantagem do uso dessas leguminosas reside principalmente na capacidade de estabelecerem simbioses com rizóbio e os fungos MVA em seus sistemas radiculares, de modo a possibilitar um máximo aproveitamento de nutrientes do solo e ar, com baixo custo de produção.

O uso do caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] tem sido crescente na dieta alimentar da população brasileira e representa hoje 20% (ARAÚJO e WATT, 1988) do total da produção nacional de feijão. Sua alta capacidade de sobrevivência em condições climáticas adversas, aliada à sua tolerância a solos de baixa fertilidade, têm sido o fator principal de sua recomendação para o cultivo da região.

Os solos de terra firme da Amazônia são na sua

maioria, ácidos e de baixa fertilidade e onde a cultura do caupi não apresenta bom rendimento sem adubação (OLIVEIRA e SYLVESTER-BRADLEY, 1982). Em solos arenosos a ocorrência de nodulação varia com o tipo de floresta, havendo pouca nodulação em florestas primárias e boa nodulação em floresta secundária e que a formação abundante de nodulação predomina em solos arenosos poderia ser explicado por uma perda de N por lixiviação, tornando maior o desequilíbrio desse elemento nessas condições, levando a leguminosa a nodular (SYLVESTER-BRADLEY et alii, 1980).

O Centro de Pesquisas Agropecuária do Trópico Úmido (CPATU) com sede em Belém (PA) tem procurado desenvolver, dentre outras áreas de atuação, trabalhos com caupi buscando melhorar o índice de produtividade desta cultura inclusive, em áreas com solos arenosos como Capitão Paço, solo este que foi encaminhado para o CENA onde se desenvolveu o trabalho.

Este trabalho, que constou de dois experimentos distintos, teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação de diferentes espécies de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (MVA), estirpes de *Bradyrhizobium* spp. e alguns isolados da própria região nos parâmetros de fixação biológica de nitrogênio, nutrição mineral e crescimento de duas cultivares de caupi.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PRINCÍPIOS DE MICORRIZOLOGIA

A rizosfera das plantas possui, na maioria das vezes, seres microscópicos que formam uma associação benéfica entre eles e a planta proporcionando um melhor estado nutricional do vegetal. Os fungos micorrízicos são os principais representantes destes seres microscópicos, e proporcionam juntos com as raízes de plantas uma maior absorção de nutrientes favorecendo a ambos. A esta simbiose entre fungos micorrízicos e raízes chamamos de micorriza (do grego, *mi-kes* = fungo; *rhiza* = raiz). Tal denominação foi pela primeira vez utilizada no final do século passado, quando se iniciaram os estudos sobre este tipo de associação, tendo Frank¹, citado por POWELL & BAGYARAJ (1984), sido o autor desse estudo.

Considerando o tipo de colonização das raízes, GERDEMANN (1968) agrupou as micorrizas em ectomicorrizas, ectoendomicorrizas e endomicorrizas. As ectomicorrizas

¹ FRANK, A.B. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Ber. Dtsch. Bot. Ges., s.1, 3: 128, 1885.

penetram a raiz colonizando o córtex intercelularmente e as ectoendomicorrizas e endomicorrizas intracelularmente.

Sugerindo uma classificação de micorrizas, LEWIS (1975) agrupou as micorrizas em quatro categorias: ectomicorriza, endomicorrizas vesículo-arbusculares (MVA), micorrizas ericáceas e micorrizas orquidáceas. As ectomicorrizas, recobrem o sistema radicular formando um manto composto de hifas, circundando as células epidérmicas e corticais da raiz, formando a rede Hartig segundo GERDEMANN (1974) e são comuns em espécies das famílias Pinaceae, Betulaceae e Fagaceae. As micorrizas ericáceas podem ser ericóide e arbutóide. O tipo ericóide é o mais importante e não formam manto como as ectomicorrizas porém consiste também de um complexo de hifas intracelulares nas células corticais externas e são comumente encontradas em plantas do gênero Erica, Vaccinium, Rhododendron e Calluna e micorrizas do tipo arbutóide são ectoendomicorrizas encontradas nos gêneros Actous, Arbutus e Arctostaphylos segundo READ & STRIBLEY (1975). As micorrizas arbutóides proporcionam nas raízes modificadas das plantas tanto um revestimento como nas ectomicorrizas, como penetração intracelular de hifas em células do córtex semelhante a estruturas de endomicorrizas.

As micorrizas orquidáceas que, na maioria das vezes, pertencem ao gênero Rhizoctonia, são de fundamental importância às plântulas de orquídeas originadas de minúsculas

sementes, pois através de suas hifas intracelulares no córtex da raiz, fornecem nutrientes e fotossintatos indispensáveis ao crescimento das plântulas (HADLEY, 1975).

As micorrizas vesículo-arbusculares são de extrema importância, uma vez que ocorrem em inúmeras culturas de interesse agrônômico, como as pertencentes às famílias das gramíneas e leguminosas. O conhecimento taxonômico é de grande importância, contudo é baseado ainda na morfologia dos esporos e das hifas de sustentação, uma vez que esses fungos não podem ser cultivados em cultura axênica (ALLEN et alii, 1979). Segundo TRAPPE & SCHENCK (1982) os principais gêneros de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares são: *Glomus*, *Gigaspora*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora* e, mais recentemente, *Scuttelospora*, descrito por WALKER & SANDERS (1987).

Segundo PARADA (1984), a grande importância da micorriza reside no fato dela promover um melhor crescimento da planta, em função do maior fornecimento de nutrientes. No estudo nutricional de plantas micorrizadas diversos autores observaram maior concentração dos macronutrientes N, P, K, Ca, Mg e S (SAIF, 1987; AMES & BETHLENFALVAY, 1987; BAREA & AZCÓN-AGUILLAR, 1983; COOPER, 1984; MOSSE, 1973) e dos micronutrientes, Cu, Zn e B (PACOVSKY, 1986; MAMO & KILLHAM, 1987; DIXON et alii, 1989; RHODES & GERDEMANN, 1980; COOPER, 1984; TIMMER & LEYDEN, 1980; SWAMINATHAN & VERMA, 1979). No caso dos micronutrientes Fe e Mn, existem duas situações dis

tintas. A primeira é que em solos ácidos com altos teores de Fe e Mn, os fungos micorrízicos protegem as plantas contra a toxidez destes nutrientes em comparação com plantas não micorrizadas (PACOVSKY, 1986). Em solo onde se procedeu uma correção de acidez mediante calagem os níveis de Fe e Mn no solo caem a níveis tolerados pela planta. Neste caso, os fungos micorrízicos propiciam uma maior absorção destes elementos. MAMO & KILLHAM (1989) trabalhando com diferentes níveis de calagem e com fungos micorrízicos encontraram aumentos nos valores acumulados de Fe, Mn, Cu e Zn em plantas inoculadas com fungo micorrízico comparados às plantas não micorrizadas.

Contudo, o efeito marcante dos fungos micorrízicos está, sem dúvida nenhuma, na capacidade maior de absorver P em plantas micorrizadas, pois o micélio dos fungos micorrízicos, através de seus finos ramos é capaz de explorar micro-habitats, normalmente não atingidos pelas raízes (MOSSE, 1973). MURDOCK et alii (1967) acreditavam que os fungos micorrízicos vesículo-arbusculares solubilizavam os fosfatos insolúveis, mas o que ocorre é uma exploração maior do volume do solo, absorvendo conseqüentemente, mais nutrientes do solo.

Muito embora haja casos em que as micorrizas prejudicam o crescimento, tal como o citado por SCHENCK & KELLAN (1978), a maioria dos trabalhos indicam o favorecimento dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares para o desenvolvimento do vegetal. Diminuição à resistência ao trans-

porte de água (SAFIR et alii, 1971), o aumento na transpiração (SAFIR & NELSEN, 1985 e AUGÉ, 1989), tolerância à salinidade (OJALA et alii, 1983 e POSS et alii, 1985), redução do índice de mortalidade de mudas por ocasião do transporte (MENGE et alii, 1978), aumento da superfície foliar (RAJAPAKSE et alii, 1989), aumento da resistência de plantas às doenças de raízes causadas por fungos (DAVIS & MENGE, 1981) e nematóides (OLIVEIRA & ZAMBOLIM, 1986), aumento da nodulação, atividade da enzima nitrogenase e fixação biológica de nitrogênio em leguminosas (MOSSE et alii, 1976 e BAREA & AZCÓN - AGUILLAR, 1983).

2.2. MICORRIZAS EM CAUPI

ISLAM et alii (1981) trabalhando com dois cultivares de caupi inoculado com *Glomus mosseae* obtiveram aumento na porcentagem de raízes infectadas, peso da parte aérea e nodulação, constatando também que o transplante não acarretou aumento na produção.

AMES & BETHLENFALVAY (1987), estudaram em caupi a interação competitiva de rizóbios pelos sítios de nodulação e constataram que nem a aplicação do P nem a ação do fungo MVA afetaram a interação pelos rizóbia por sítios de nodulação e sugerem a existência de uma influência localiza

da, não sistêmica e não mediada pelo P, do fungo MVA no peso da raiz e atividade do nódulo de caupi.

Conforme já mencionado existe um efeito positivo da presença de fungos micorrízicos no aumento da superfície foliar. Vários pesquisadores têm realizado a muitos anos pesquisas para determinar a metodologia mais adequada para determinação da superfície foliar (PAQUIN & COULOMBE, 1959; WILLIAMS, 1954) e inclusive para caupi (NANGJU & WAN-KI, 1980 e OSEI-YEBOAH et alii, 1983). Contudo, o que se tem procurado é uma técnica barata, simples e precisa de determinação.

Em solos com baixo nível de P e elevada acidez HOWELER et alii (1987) mostraram que o caupi era extremamente dependente de fungo micorrízico, apresentando uma dependência micorrízica de 74%.

A especificidade hospedeira é conceituada como uma associação simbiótica entre um determinado microrganismo adaptado a uma determinada espécie ou grupo de plantas. Tem sido observado que varia segundo a cultivar, solo e nível de fertilidade (HOWELER et alii, 1987; BONETTI, 1988).

OLIVEIRA & BONETTI (1983) observaram existir especificidade entre o caupi e a espécie de fungo utilizado, sendo o gênero *Acaulospora* o que mais beneficiou o peso e o número dos nódulos em relação a outras espécies.

ALMEIDA et alii (1985) trabalhando com um pod

zólico arenoso da região litorânea e outro, de textura argilosa do sertão do Ceará, constataram incremento significativo do peso da matéria seca de todas as plantas inoculadas com os fungos micorrízicos: *Glomus epigaeum*, *G. macrocarpum*, *G. fasciculatum*, *Gygospora margarita* e *Acaulospora laevis*, em relação à testemunha.

2.3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CAUPI

Um dos primeiros trabalhos realizados com caupi no Brasil [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] com a finalidade de estudar alguns parâmetros da fixação biológica de nitrogênio, dentre eles a inoculação cruzada nesta leguminosa, foi conduzido por GALLI (1959), usando estirpes isoladas de caupi e de seis outras leguminosas, entretanto poucas informações foram fornecidas.

GARGANTINI & WUTKE (1960) demonstraram que caupi nodulando com estirpes nativas fixava quantidade de nitrogênio equivalente a 73 kg/ha. Contudo, dados da FAO (1984) estimam que a quantidade de nitrogênio fixado pelo caupi em condições de campo pode variar de 73 a 354 kg de N/ha.ano. Este amplo intervalo inclusive varia largamente com a planta hospedeira, eficiência da estirpe utilizada, condições de solo e clima e metodologia usada na determinação da fixação, FAO

(1984). Contudo, LARUE & PATERSON (1981) acham que a quantidade de N fixado no campo deve ser menor considerando a baixa produtividade do caupi, pois segundo TEIXEIRA et alii (1988) a produtividade média no Brasil é 268,5 kg/ha e, no mundo, 200 kg/ha segundo dados da FAO (1976).

HUXLEY (1980), realizando um experimento em casa-de-vegetação, estimou que 88% do N absorvido pelo caupi, provém da fixação biológica do nitrogênio.

Com relação a fatores ambientais BONETTI (1988) e STAMFORD et alii (1988) enfatizam a necessidade de que sejam feitos estudos relacionados com fatores ambientais notadamente temperatura, umidade, luz, salinidade e acidez.

De acordo com DART & MERCER (1965), a nodulação e a fixação de nitrogênio são influenciadas pela luz e altas temperaturas e a intensidade desses efeitos era mediada pela interação entre a variedade da planta e a estirpe. Segundo BONETTI (1988) temperatura elevada e acidez são os fatores do ambiente que mais interferem na fixação biológica do nitrogênio na região Amazônica. STAMFORD et alii (1988) observaram que na região Nordeste do Brasil, além da temperatura, a salinidade e umidade interferem na fixação biológica do nitrogênio em caupi. DART & MERCER (1965) verificaram o efeito da temperatura na nodulação e na concentração de leg-hemoglobina dos nódulos de caupi, sendo as temperaturas de 24°C e 33°C ótimas para a nodulação das raízes primárias e

secundárias, respectivamente.

Estudando o efeito do pH no crescimento, nodulação e fixação de nitrogênio em caupi, CHONG et alii (1987), observaram que a pH 3,8 praticamente não havia fixação de nitrogênio nem desenvolvimento sendo o pH ideal para o desenvolvimento da parte aérea e da raiz o intervalo de 5,9 a 6,3.

A ocorrência de respostas diferentes à inoculação em diferentes genótipos de planta, de uma dada leguminosa, proporcionando acúmulo de N distintos, leva a acreditar que deve-se ter uma preocupação muito maior em melhorar os cultivares daquela espécie de planta que a estirpe de rizóbio, muito embora isto não impeça que trabalhos paralelos possam ser desenvolvidos tentando-se obter estirpes selecionadas e adaptadas perfeitamente àquele cultivar.

ZARY et alii (1978) trabalhando com 100 genótipos de caupi encontraram diferenças significativas na eficiência de fixação de nitrogênio entre os genótipos inoculados com um inoculante comercial formado por uma mistura de estirpes de *Rhizobium*, tendo GRAHAM & SCOTT (1983) encontrado resultados semelhantes. STAMFORD (1978) e STAMFORD & NEPTUNE (1979), trabalhando com 5 cultivares de caupi, mostraram a ocorrência de especificidade ao nível de cultivar, na formação de nódulos pretos, sugerindo que o caráter nódulo deve ser promovido pela planta regressões distintas entre N total absorvido e peso de nódulos, de acordo com os cultivares, demonstrando diferentes graus de eficiência na

capacidade de fixar nitrogênio.

BARRETO (1978) trabalhando com dois cultivares de caupi constatou a existência de ampla variação, entre os cultivares nos caracteres número e porcentagem de nódulos eficientes, peso da parte aérea e produção de sementes, evidenciando a necessidade de pesquisar fatores que maximizem a expressão de estirpes selecionadas e adaptadas às condições locais, bem como a possibilidade de seleção de genótipos de caupi mais efetivas na associação simbiótica.

BONETTI et alii (1986) coletaram 27 amostras de diferentes áreas agrícolas do Estado de Rondônia e constatarem em 6 sítios a presença de estirpes ineficientes quanto à produção de matéria seca e peso de nódulos em caupi.

MINCHIN et alii (1978) trabalharam com quatro estirpes de *Rhizobium* eficientes na fixação biológica de nitrogênio em caupi, combinadas com quatro cultivares de caupi semi-ereto de habitats de crescimento distinto e observaram diferenças significativas entre e dentro de cultivares nos parâmetros avaliados e nenhuma estirpe foi claramente superior para todas os cultivares testadas, muito embora os isolados de solos tropicais deram geralmente maior produção de sementes do que a estirpe exótica testada.

Procurando obter estirpes de comprovada eficiência na nodulação e fixação de nitrogênio em caupi, SENANAYAKE et alii (1987) observaram que o peso fresco de nódulos

los aumentou com a idade da planta inicialmente e estabilizou em 20-30 dias após plantio, seguido de um fluxo secundário de crescimento do nódulo após 30 dias, tendo a fixação de nitrogênio atingido o máximo no mesmo período.

NEVES et alii (1981) compararam a eficiência de produção de caupi cv. TVu 1503 entre plantas inoculadas com isolados de *Rhizobium* sp. e plantas recebendo 200 ppm N-NO₃ e observaram que houveram dois picos na taxa de fixação durante o crescimento da planta: os primeiros nove dias depois do princípio do florescimento (42 dias após a semeadura) e o segundo durante o enchimento das vagens (63 dias após a semeadura), tendo as plantas que receberam 200 ppm N-NO₃, acontecido picos semelhantes só que 5 dias antes do florescimento, indicando que este cultivar foi selecionado para solos com alto teor de N-inorgânico.

MINCHIN et alii (1981), compararam plantas de caupi inoculadas com *Rhizobium*, estirpe CB 756, com plantas da mesma espécie fertilizadas em períodos distintos, com 20 ppm de N-NO₃ em solução e constataram que as plantas inoculadas foram mais eficientes na distribuição do nitrogênio reduzido para as sementes indicando contudo a necessidade de uma dose "starter" de N para possibilitar maior nodulação, produção de ramos e pedúnculos.

Trabalhos realizados em alguns países tropicais mostraram a ocorrência de variação na eficiência das es

tirpes quanto à capacidade de fixar nitrogênio no caupi. No Brasil, as informações também são divergentes, principalmente em função das diferentes condições de clima e solo, as quais afetam *Bradyrhizobium*, a planta hospedeira, a nodulação e a própria fixação do nitrogênio.

Em experimentos conduzidos em casa-de-vegetação, usando solo podzólico arenoso, pobre em nitrogênio, mantendo a temperatura e o pH adequados à cultura do caupi, VASCONCELOS et alii (1975, 1979), inoculando sementes do cultivar Pituíba (CE 31), com estirpes isoladas no Ceará e outras procedentes do sul do Brasil, constataram equivalência estatística quanto à fixação de N_2 , entre todas as estirpes selecionadas e as bactérias da população nativa. ARAÚJO & PEREIRA (1983) não observaram efeito da inoculação, mas sempre uma estirpe introduzida pelo inoculante foi mais eficiente do que o tratamento sem inoculação e/ou com adubação nitrogenada. Em solos da zona da Mata de Pernambuco, pobres em matéria orgânica, STAMFORD & SANTOS (1986) verificaram efeito altamente significativo, quando o caupi foi inoculado com estirpes de comprovada eficiência.

DANSO & OWIREDU (1988) procuraram determinar a habilidade relativa de três estirpes, na formação de nódulos em caupi, quando competindo mutuamente e contra populações nativas de *Bradyrhizobia* em três solos de Ghana e observaram que a adição de cerca de 10^5 células de cada estirpe

por grama de solo ou várias combinações entre as estirpes sempre aumentou o número de nódulos, N total e peso da parte aérea em todos os três solos, comparado com o solo não inoculado e que a magnitude desta inoculação era influenciada pelo tipo de solos e acreditam por isso na possibilidade de aumentar a nodulação, fixação de nitrogênio e produção de caupi crescendo no campo através da inoculação com estirpes selecionadas. GRAHAM & SCOTT (1984), contudo, acreditam que a nodulação natural com rizóbia nativos pode suprir a maior parte do N requerido para a ótima produção de caupi.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. EXPERIMENTO 1: SELEÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS VESÍCULO-ARBUSCULARES (MVA) PARA CAUPI

Com o objetivo de avaliar o efeito da inoculação de diferentes fungos micorrízicos vesículo - arbusculares (MVA) em dois cultivares de caupi, comparando com os fungos nativos do solo, instalou-se um experimento em casa-de-vegetação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Campus de Piracicaba, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, no período de outubro de 1988 a janeiro de 1989.

3.1.1. PLANTA

A planta utilizada foi o caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], sendo os seguintes cultivares escolhidos para o estudo: BR-08-Caldeirão e IPEAN V-69, cujas sementes foram fornecidas pela EMBRAPA-Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido (CPATU) - Belém (PA).

3.1.2. SOLO

O solo utilizado foi coletado pela EMBRAPA de Belém (PA), classificado como Areia Quartzosa, o qual é atualmente explorado com a cultura do caupi naquela região.

O solo foi seco ao ar e peneirado em malha de 2 mm, seguindo para análise química e granulométrica, no Departamento de Química e Nutrição Mineral de Plantas e Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes da ESALQ/USP, e os resultados são apresentados, respectivamente nas Tabelas 1 e 2.

Com base na análise química, tornou-se necessário realizar uma calagem e adubação corretiva de potássio, utilizando-se Ca(OH)_2 e MgCO_3 na proporção de 3:1 (Ca:Mg) de forma a elevar a saturação de bases para 68,3 e o pH para 6,1. Desta forma, utilizou-se 241 mg KCl e 2,51 g da mistura de Ca(OH)_2 e MgO_3 /vaso. O resultado da adubação e calagem se encontra na Tabela 1.

Fez-se a determinação do nitrogênio total e mineral presente no solo através do método de extração do N-mineral com KCl 2N com posterior destilação e titulação. O resultado se encontra na Tabela 3.

Tabela 1 - Resultado de análise química das amostras de solo antes e após a calagem.

Condição do solo	M.O. %	pH	H+Al	Ca	Mg	K	P	S	T	V	Fe	Mn	Cu	Zn
		CaCl ₂	— meq/100 cm ³			—	ppm	meq/100 cm ³	cm ³	%			ppm	
sem ca-lagem	3,44	4,0	3,47	0,88	0,22	0,12	18,3	1,20	4,96	24,5	51,6	3,21	0,31	0,75
com ca-lagem	3,08	6,1	1,46	2,10	0,78	0,26	22,9	3,15	4,61	68,3	17,5	2,26	0,15	0,41

Tabela 2 - Análise granulométrica do solo em estudo.

Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila
49,18	35,34	5,54	9,94

Tabela 3 - Análise do teor de N e de N-mineral no solo antes e após a ca
lagem.

Condição do solo	N%	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻
		ppm	
sem calagem	0,081	8,1	9,1
com calagem	0,084	21,8	10,4

Cerca de 70 kg de solo foi fumigado com brometo de metila para eliminação de esporos de fungos micorrízicos nativos. Aplicou-se 50 cm³/m³ de solo deixando-o atuar por 3 dias consecutivos. Após este período procurou-se deixar o solo descoberto durante 10 dias sendo revolvido periodicamente para eliminação de resíduos de brometo de metila.

Em seguida, o solo foi colocado em vasos de barro, cabendo a cada um 2,5 kg solo. Na ocasião da semeadura, em cada vaso com solo esterilizado e reinoculado com fungo MVA foi colocado sobre o inóculo 5 ml de uma suspensão de filtrado deste solo antes de ter sido esterilizado com brometo de metila, para fornecer a mesma microflora, mas livre dos propágulos do fungo MVA.

3.1.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O esquema do experimento foi um fatorial 4x2 inteiramente casualizado, com 4 tratamentos: Fungos Nativos (FN), *Acaulospora morrowae* (Am), *Glomus etunicatum* (Ge) e *Gygaspora margarita* (Gm) e dois cultivares (BR-08-Caldeirão e IPEAN V-69), com 04 repetições.

3.1.4. PREPARO DOS INÓCULOS

Cerca de 17 dias antes do plantio preparou-se o inoculante na Seção de Microbiologia do Solo do CENA, crescendo as bactérias estirpe C-516, em meio líquido Yu, sob agitação constante por 7 dias até que apresentassem densidade correspondente a 10^9 cél./ml. A turfa esterilizada por radiação γ (5 Mrad), recebeu 40 ml da mistura de bactérias e foi incubada por 10 dias numa temperatura de 28°C para que houvesse o máximo crescimento de células. SOMASEGARAN & HOBEN (1985).

Os inóculos dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares foram obtidos em vasos de multiplicação com milho em substrato esterilizado, e constituíam de esporos e raízes das plantas infectadas com fungo micorrízico.

3.1.5. INSTALAÇÃO, CONDUÇÃO E COLETA DO EXPERIMENTO

As sementes de caupi foram previamente esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio a 10% (v/v). Para a esterilização de sementes o tempo requerido foi de 5 minutos seguidos de 6 lavagens com água esterilizada para eliminar o excesso de hipoclorito (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985).

Em seguida, estas sementes foram peletizadas com sacarose a 10% e turfa inoculada com *Bradyrhizobium* spp., estirpe C-516.

A reinfestação com fungo micorrízico foi feita colocando-se 10 g de inóculo a cerca de 5 cm de profundidade, e as sementes colocadas aproximadamente 3 cm acima. O plantio foi realizado em 31 de outubro de 1988, semeando-se 6 sementes por vaso, ocorrendo uma germinação homogênea no dia 04 de novembro de 1988. O desbaste foi realizado no dia 09 de novembro, deixando-se 2 plantas por vaso.

Efetuuou-se a coleta do experimento 81 dias após o plantio.

3.1.6. PARÂMETROS AVALIADOS

. Atividade total e específica da enzima nitrogenase;

- . Número e peso da matéria seca de nódulos;
- . Número de folhas e superfície foliar;
- . Porcentagem de colonização do sistema radicular por fungo micorrízico vesículo-arbuscular colorindo-se as raízes com "Trypan-blue";
- . Peso da matéria seca da parte aérea das raízes e relação peso raiz/parte aérea;
- . Número de esporos através da técnica do peneiramento úmido segundo
- . Concentração e acúmulo dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e dos micronutrientes (Fe, Mn, Cu e Zn), segundo SARRUGE & HAAG (1979).

A determinação da atividade da nitrogenase foi feita em dois dias em virtude da determinação da superfície foliar e procurou-se avaliar pela manhã; às 9:00 horas. O método da redução do acetileno descrito por HARDY et alii (1968) teve o procedimento de preparo das amostras e posterior determinação descrito por SAITO (1978), sendo que o tempo de incubação da amostra sido de meia hora.

Os nódulos, após a determinação da atividade de nitrogenase foram destacados e contados, colocando-se em seguida em estufa (65-70°C) e pesados.

Para a determinação do número de folhas e superfície foliar procedeu-se da seguinte maneira: destacou-se as folhas de cada planta do vaso e colocou-se em folhas de

papel ofício indo rapidamente para xerox. Face o número elevado de folhas e procurando manter o tempo constante na determinação, ou seja, pela manhã, das 8 às 11 horas da manhã, dividiu-se a atividade em 2 manhãs. Procurou-se evitar que as folhas perdessem a turgidez, acelerando a xerox das folhas. Com a xerox das folhas procurou-se cortar no formato original contando-se em seguida em seguida o número de folhas por vaso. A superfície foliar foi realizada determinando o peso de uma superfície conhecida do mesmo material utilizado na xerox e pesando o total das folhas de cada vaso, fazendo-se o cálculo em seguida.

Para quantificação da infecção micorrízica coletou-se uma certa quantidade de raiz, selecionou-se as mais finas, determinou-se o peso fresco para posteriormente se determinar o peso total da raiz, e colocou-se em FAA para conservação. Para a coloração da raiz procedeu-se segundo PHILLIPS & HAYMAN (1970).

Parte da raiz mantida em FAA foi lavada em água corrente e imersas com KOH 10%, durante 5 horas a uma temperatura de 60°C. Em seguida lavou-se com água corrente. A raiz clarificada com solução de HCl 5% para retirar o excesso de KOH por 5 minutos e finalmente, lavando-se com água em seguida. Posteriormente, procedeu-se à coloração com lactoglicerol mais Trypan-blue 0,05% em banho-maria por 50 minutos. Após substituir-se o lactoglicerol colorido pelo lactoglicerol incolor.

Na determinação da porcentagem de colonização das raízes seguiu-se a técnica de GIOVANNETTI & MOSSE (1980), pesando-se 500 mg de raízes coloridas, cortando-se em pedaços e espalhados sobre uma placa de Petri em cujo fundo foram marcadas linhas paralelas transversais, formando um quadriculado cujos quadrados mediam 0,5 polegadas. A técnica consistiu em se contar sob microscópio estereoscópio o número de intersecções dos pedaços de raiz com as linhas horizontais ou verticais (numa só direção) do quadriculado, que tinham ou não, naquele ponto, a presença de estruturas fúngicas que fossem características dos fungos micorrízicos.

O cálculo da porcentagem de colonização de raiz, é feito utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de colonização da raiz} = \frac{\text{Nº de raízes com presença de MVA}}{\text{Nº total de raízes}} \times 100.$$

Seguindo-se a metodologia descrita por GERDEMANN & NICOLSON (1963) tornou-se 50 ml de cada amostra de solo e colocando em 1 litro de água agitou-se para em seguida passar em um conjunto de peneiras cujas malhas eram de 250, 105 e 53 μ . Os esporos foram recolhidos em becker com água.

No sentido de facilitar a identificação dos esporos eliminando-se os grãos de areia e outros sedimentos centrifugou-se as frações (esporos + grão de areia e outros sedimentos) com água destilada por um tempo total de 3 minutos a 3000 rpm, eliminando-se em seguida, com cuidado, o so-

brenadante e adicionando-se sacarose aos tubos mexendo com um bastão e centrifugando-se por um tempo total de 2 minutos a 3000 rpm. Após um repouso de 1 minuto, passou-se com cuidado o sobrenadante por uma peneira de 44 μ lavando-se com bastante água destilada, até que diminuísse drasticamente a concentração de sacarose na parede dos esporos que, em seguida foram coletados procedendo-se a contagem dos mesmos, com auxílio de placa estriada e dividida em seis partes, colocada sob microscópio estereoscópico. A contagem foi expressa em número de esporos por 100 ml de solo, OHMS (1957).

3.2. EXPERIMENTO 2: SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bradyrhizobium* spp. COM MAIOR EFICIÊNCIA NA FBN EM CAUPI

Objetivando-se selecionar estirpes altamente eficientes na FBN em caupi, um ensaio em vasos de Leonard modificado (Vicente, 1970), foi montado em casa-de-vegetação da Seção de Microbiologia do Solo, do CENA, da ESALQ/USP, no período de dezembro de 1988 a janeiro de 1989.

3.2.1. PLANTA

Utilizaram-se dois cultivares de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp): BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69.

3.2.2. ESTIRPES E ISOLADOS DE *Bradyrhizobium* spp.

Utilizaram-se quatro estirpes: SMS 84 (632 ARC -Wisconsin/USA), SMS 85 (IAC) e SEMIA 614S (Líbia), fornecidos pela Seção de Microbiologia do Solo, do Instituto Agrônomo de Campinas e C-516 e três isolados: CM 1525, CM 1527 e CM 1528 estes quatro últimos da Seção de Microbiologia do Solo do CENA/USP.

As estirpes SMS 84, SMS 85, SEMIA 6145 e C-516 foram escolhidas por serem do grupo caupi.

Os isolados CM 1525, CM 1527 e CM 1528 foram isolados de um solo cultivado com caupi, em Belém (PA), há vários anos. Na obtenção destes isolados tomou-se o solo já mencionado e colocou-se em vasos, colocando-se sementes previamente esterilizadas dos dois cultivares: dois vasos para IPEAN V-69 e dois para BR-08 Caldeirão. Aos 44 dias após o plantio coletou as plantas separando-se os nódulos das cultivares em separado, selecionando com base no tamanho dos nódulos, segundo VINCENT (1970). Logo em seguida fez-se a determi-

nação da atividade da nitrogenase dos nódulos selecionados, adotando-se o critério que os nódulos que propiciassem a maior atividade seguiriam para serem riscadas em placas para caracterização morfológica e teste de eficiência segundo VINCENT (1970). A Tabela 4 sintetiza as características dos isolados obtidos.

Tabela 4 - Características dos isolados obtidos para caupi na Seção de Microbiologia do Solo/CENA, utilizados no experimento com vaso de Leonard.

Característica	CM 1525	CM 1527	CM 1528
Cultivar	IPEAN V-69	BR-08 Caldeirão	BR-08 Caldeirão
Tempo crescimento em meio de cultura	8 dias	3 dias	5 dias
Crescimento em manitol com indicador	alcaliniza	acidifica	alcaliniza
Formação de goma	pequena	abundante	normal
ARA ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$)	30	50	87

3.2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi esquematizado um fatorial 7x2, inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e dois cultivares BR - 08 Caldeirão e IPEAN V-69. Os tratamentos foram os seguintes: SMS 84, SMS 85, SEMIA 6145, C-516, CM 1525, CM 1527 e CM 1528. Todos os tratamentos com 4 repetições.

3.2.4. INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Utilizando-se de vasos de Leonard modificado (VINCENT, 1970), com vermiculita e areia (2:1) e solução nutritiva de McKNIGHT (1949), ambos esterilizados em autoclave a 121°C por 3 horas, procedeu-se a colocação de 6 sementes por vaso previamente esterilizados em álcool e hipoclorito de sódio segundo SOMASEGARAN & HOBEN (1985) e lavadas 6 vezes em água esterilizada.

Os inoculantes foram preparados no CENA, 8 dias antes do desbaste, deixando-os crescer em meio líquido YM, sob agitação constante por 8 dias até que apresentassem densidade correspondente a 10^9 céls./ml.

Três dias após a germinação procedeu-se o desbaste, deixando-se 2 plantas por vaso e colocando-se 2 ml/vaso do inoculante e uma camada de areia gros-

sa lavada e esterilizada para proteger de possíveis contaminações.

O tratamento com nitrogênio recebeu 100 ppm de N na forma de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

A temperatura média durante o desenvolver do experimento oscilou entre 28 e 32°C durante o dia e 23 e 27 °C durante a noite.

3.2.5. PARÂMETROS AVALIADOS

Aos 48 dias após a emergência das plântulas procedeu-se a coleta do experimento, separando-se as plantas em parte aérea, raízes e posteriormente nódulos.

Os parâmetros avaliados foram:

- . Atividade total e específica da enzima nitrogenase segundo HARDY et alii (1968).

- . Número e peso da matéria seca dos nódulos.

- . Peso da matéria seca da parte aérea.

- . Concentração e acúmulo de N da parte aérea.

- . Eficiência relativa de cada tratamento, segundo BERGENSEN et alii (1971).

Para determinação da atividade da enzima nitrogenase foi utilizado o método de redução de acetileno segundo HARDY et alii (1968), sendo as raízes incubadas em frascos de

500 ml com 90% de ar e 10% de acetileno por 30 minutos em temperatura ambiente. Exatos 0,5 ml do volume contido na amostra foram injetados no cromatógrafo a gás da Seção de Microbiologia do Solo do CENA, tipo BECKMAN modelo GC-65, usando detector de chama de hidrogênio a 50°C e coluna de vidro de 3,2 mm de diâmetro externo por 0,5 m de comprimento, contendo PORAPAK N de 100-120 mesh a 110°C. O gás carregador foi o N₂ a um fluxo de 40 ml/min. O padrão de C₂H₄ foi preparado na concentração de 500 ppm.

Os cálculos para a determinação da atividade da nitrogenase foram realizados utilizando-se a fórmula:

$$CE = L \times A \times K \times R$$

onde: CE = concentração de etileno evoluído;

L = leitura do pico (mm) da amostra;

A = atenuação do pico;

K = fator de correção das amostras;

R = range do aparelho.

O fator K foi calculado da seguinte maneira:

$$K = K' \times \frac{1}{\text{tempo de incubação}} \times \frac{1}{\text{volume injetado}} \times \frac{1}{\text{nº de plantas}}$$

sendo K' o fator de correção, para o gás padrão (C_2H_4), cujo cálculo é:

$$K' = \frac{\text{concentração de etileno}}{L \times A \times R} ;$$

L e A = leitura e atenuação do peso padrão;

R = range do aparelho.

O volume do padrão injetado foi de 0,5 ml.

Em seguida, os nódulos foram destacados das raízes sendo contados, colocados em estufa (65-70°C) e pesados.

A parte aérea foi colocada dentro de sacos de papel em estufa (65-70°C) por 72 horas para determinação do peso da matéria seca. O N total foi avaliado pelo método semi-microKjedahl de acordo com SARRUGE & HAAG (1979), determinando-se a porcentagem de N da matéria seca da parte aérea. O N acumulado foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca (mg) da parte aérea pela porcentagem dividindo - se por 100.

A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada segundo a fórmula:

$$Efr = \frac{\text{média peso matéria seca planta inoculada}}{\text{média peso matéria seca planta com N}} \times 100 ,$$

adaptada da fórmula de BERGENSEN et alii (1971).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTO 1: SELEÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS VESÍCULO-ARBUSCULARES (MVA) EM CAUPI

EFEITO NO CRESCIMENTO VEGETAL (PESO DA MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA E DA RAIZ E RELAÇÃO RAIZ/PARTE AÉREA)

Avaliando-se inicialmente, o peso da matéria seca da parte aérea dos 2 cultivares de caupi na Tabela 5, percebe-se que houve diferenças nas respostas à infestação com fungos micorrízicos para os mesmos, sendo que para o cultivar BR - 08 Caldeirão, as melhores respostas foram para *A. morrowae* e *G. etunicatum*, seguido de *G. margarita* que não diferiu dos fungos nativos. Resultados semelhantes foram obtidos por OLIVEIRA & BONETTI (1983) em Manaus (AM) e ALMEIDA et alii (1985), em Fortaleza (CE). Os fungos micorrízicos *A. morrowae* e *G. etunicatum* proporcionaram um incremento de 34 e 28%, respectivamente, em relação aos fungos nativos no peso da matéria seca da parte aérea. No caso de *G. margarita*, embora não de forma significativa, houve um incremento de aproximadamente 5%. Para o cultivar IPEAN V-69 houve uma resposta significativa à infestação com fungos micorrízicos em relação aos fun

gos nativos, sendo *G. etunicatum* e *G. margarita*, os fungos que propiciaram os melhores resultados com 58 e 54%, respectivamente, e, *A. morrowae*, 17% superior, no peso da matéria seca da parte aérea em relação aos fungos nativos. Constate-se que mesmo o solo sendo de textura arenosa, com teor médio de P ($\approx$ 23 ppm), houve resposta à infestação com fungos micorrízicos no desenvolvimento vegetal em relação à flora nativa. Um fato surpreendente é o fungo micorrízico *G. margarita*, que geralmente é adaptado às condições de acidez ter proporcionado bom resultados em condições de pH em CaCl_2 0,01M em torno de 6,1, para o cultivar IPEAN V-69.

Com relação ao peso da matéria seca da raiz, a Tabela 5 mostra que os fungos micorrízicos nativos e *A. morrowae*, proporcionaram os menores valores seguidos de perto por *G. margarita* e *G. etunicatum*, ou seja mesmo as plantas da cultivar BR-08, tendo desenvolvido melhor na sua parte aérea, nos casos onde se infestou com fungo MVA, o sistema radicular mostrou melhor desenvolvimento. Para o cultivar IPEAN V-69, os fungos *A. morrowae* e *G. etunicatum* apresentaram os menores valores.

O parâmetro relação peso de raiz/peso parte aérea observado na Tabela 5, nos permite averiguar se o aumento da absorção de nutrientes e a subsequente translocação para a parte aérea da planta, aumenta a utilização de fotossintato na parte aérea e daí, menos fotossintato são transfe

Tabela 5 - Influência dos fungos micorrízicos no peso da matéria seca da parte aérea e da raiz e na relação raiz/parte aérea em caupi, cultivares BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69. Média de 4 repetições.

Tratamento	Matéria seca (g/planta)				Relação	
	Parte Aérea		Raiz		raiz/parte aérea	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
F. Nativos	5,90 b ¹	6,64 c	1,56 c	2,45a	0,26 b	0,37a
<i>A. morrowae</i>	7,92a	7,77 b	1,63 bc	1,83 b	0,21 c	0,24 b
<i>G. etunicatum</i>	7,55a	10,49a	1,92a	2,32ab	0,25 b	0,22 b
<i>G. margarita</i>	6,18 b	10,20a	1,89ab	2,47a	0,30a	0,24 b
CV(%)	9,49	8,26	9,72	16,28	6,92	19,75
DMS (5%)	1,05	1,12	0,26	0,57	0,02	0,04

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

(1) cv. BR-08 Caldeirão.

(2) cv. IPEAN V-69.

ridos para a raiz. Consequentemente, a relação raiz/parte aérea é usualmente menor em plantas micorrizadas do que em plantas controle não micorrizadas. No caso em questão, a relação raiz/parte aérea para o cultivar BR-08 com o fungo *A. morrowae* foi o que proporcionou menor relação seguido por *G. etu-*

*nica*tum e Fungos Nativos. Para o cultivar IPEAN V-69 observou-se que a menor relação raiz/parte aérea foi para o tratamento com *G. etunicatum* seguido por *A. morrowae* e *G. margarita*.

Pode-se constatar com isso que houveram respostas distintas quanto à infestação com fungo micorrízico vesículo-arbuscular com relação ao cultivar nos parâmetros avaliados. Segundo OLLIVIER et alii (1983) que encontrou também respostas diferentes de cultivar a cultivar, a estimulação do crescimento, pode ser devida ao aparecimento adicional de fosfatases alcalinas solúveis nos extratos de raízes micorrizadas e depende do fungo envolvido, sugerindo a origem fúngica para tal fenômeno e não do cultivar.

EFEITO NOS PARÂMETROS DE NODULAÇÃO (NÚMERO E PESO DE NÓDULOS E ATIVIDADE DA NITROGENASE)

Conforme pode-se observar na Tabela 6, a infestação com fungos micorrízicos *A. morrowae*, *G. etunicatum* e *G. margarita*, foi superior aos fungos nativos no número de nódulos apenas no cultivar BR-08 Caldeirão, não se constatando diferença significativa no número de nódulos para o cultivar IPEAN V-69. Contudo, constata-se uma tendência de haver respostas distintas conforme o cultivar pois, para BR-08 Cal

deirão, o fungo *G. margarita* mostrou-se superior e os fungos nativos, os que tiveram menor número de nódulos, já para o cultivar IPEAN V-69 houve uma inversão de valores, ou seja, os fungos nativos, embora não de forma significativa, propiciaram maiores valores no número de nódulos.

Com relação ao peso de nódulos, a Tabela 6 mostra claramente o efeito positivo da infestação com fungos micorrízicos em relação aos fungos nativos, para o cultivar BR-08 Caldeirão na qual os fungos *A. morrowae* e *G. etunicatum* possibilitaram uma maior interação proporcionando maior absorção de P por parte do sistema radicular, fazendo com que os nódulos tivessem um maior peso. Para o cultivar IPEAN V-69 não se observou diferença significativa no peso de nódulo para os tratamentos, contudo se observarmos com cuidado o peso de nódulos é relativamente maior para *G. etunicatum* e *A. morrowae*, se considerarmos por unidade, haja visto o menor número de nódulos neste cultivar.

A atividade total da nitrogenase na Tabela 6 indica que tanto *A. morrowae* como *G. etunicatum* propiciaram uma melhor fixação de nitrogênio em relação aos fungos nativos para o cultivar BR-08 Caldeirão. Para o cultivar IPEAN V-69 tal fato se repetiu com menores valores sugerindo uma capacidade menor de fixar nitrogênio que o cultivar BR-08 Caldeirão. Vários autores obtiveram aumentos da atividade da nitrogenase com fungo MVA, como CARLING et alii (1988), AMES

Tabela 6 - Efeito de fungos micorrízicos no número, peso e atividade da enzima nitrogenase em caupi, cultivares BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69. Média de 4 repetições.

Tratamento	Nodulação		Atividade da nitrogenase			
	Nº/Planta	Peso (mg/planta)	Total $\mu\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Específica $\mu\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g} \text{ nód.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
F. Nativos	56 b ¹	162a	138 c	230a	2,1 c	15,8 b 7,4 c
A. morrowae	82a	142a	325a	221a	11,7a	6,9a 36,7a 32,0a
G. etunicatum	82a	136a	285ab	241a	10,7a	3,6 b 40,3a 15,8 bc
G. margarita	99a	117a	200 bc	213a	4,6 b	4,7 b 22,6 b 21,9 b
CV(%)	15,4	20,2	23,5	18,8	17,7	24,8 31,1 30,5
DMS (5%)	18,9	46,9	85,5	70,7	2,0	1,6 13,8 9,1

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

(1) cv. BR-08 Caldeirão; (2) IPEAN V-69.

& BETHLENFALVAY (1987), YOUNG et alii (1988) e RAJAPKSE et alii (1989).

Com relação à atividade específica pode-se observar que a eficiência da fixação de nitrogênio foi aumentada para ambos os cultivares quando em interação com *A. morrowae*, secundado por *G. etunicatum* para BR-08 Caldeirão e *G. margarita* para IPEAN V-69. O aumento da atividade específica da nitrogenase foi relatado por vários pesquisadores como EL-HASSANIN & LYND (1985), LYND et alii (1985) e PURCINO & LYND (1985).

PORCENTAGEM DE COLONIZAÇÃO DAS RAÍZES E ESPORULAÇÃO DOS FUNGOS MVA NO SOLO

Os dados referentes às médias da porcentagem de colonização das raízes e do número de esporos dos fungos em estudo se encontram na Tabela 7.

Dentre os fungos infestados no solo deve-se destacar a abundante produção de esporos por parte das espécies *A. morrowae* e *G. etunicatum* em ambos os cultivares, não acontecendo tal produção com *G. margarita* e acredita-se que existam características biológicas intrínseca a cada espécie na produção de uma maior ou menor produção de esporos. A porcentagem de colonização com fungos nativos foi relativamen-

Tabela 7 - Porcentagem de colonização do sistema radicular e número de esporos no solo coletado ao final do experimento nas 2 cultivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69). Média de 4 repetições.

Tratamento	BR-08 Caldeirão		IPEAN V-69	
	% colonização	Nº esporos/ 100 ml solo	% colonização	Nº esporos/ 100 ml solo
Fungo Nativo	15 c ¹	66 c ¹	15,3 b	78 c
<i>A. morrowae</i>	55,8a	2143a	62,8a	4490a
<i>G. etunicatum</i>	61,8a	1484 b	63,0a	1470 b
<i>G. margarita</i>	28,0 b	174 c	51,0a	131 c
CV(%)	10,5	24,9	11,3	31,3
DMS (5%)	6,5	371	12,7	743

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

te baixa, assim como *G. margarita* para o cultivar BR-08 Caldeirão tendo os fungos *A. morrowae* e *G. etunicatum* sido mais infectivos. Para o cultivar IPEAN V-69 a porcentagem de colonização dos fungos *A. morrowae*, *G. etunicatum* e *G. margarita* não diferiram entre si estatisticamente, e foram superiores à porcentagem de colonização das raízes com fungos nativos. Um fato interessante deve-se a maior porcentagem de colonização

das raízes com *G. margarita* neste cultivar o que não aconteceu com BR-08 Caldeirão, indicando haver uma especificidade entre o fungo *G. margarita* e o cultivar IPEAN V-69. Trabalhos realizados por PLANCHETE et alii (1982) e OLLIVIER et alii (1983) observaram características semelhantes em outras plantas hospedeiras e fungos micorrízicos.

NÚMERO DE FOLHAS E SUPERFÍCIE FOLIAR

Conforme pode-se observar na Tabela 8, não se constatou diferença significativa entre o número de folhas do cultivar BR-08 Caldeirão entre os fungos nativos e *A. morrowae* e *G. etunicatum*, embora houvesse uma tendência destes dois últimos de serem superiores. A infestação com *G. margarita* mostrou ser a mais inefetiva para o aumento número de folhas neste cultivar. Para o cultivar IPEAN V-69 verificou-se que embora não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, havendo contudo, uma tendência do tratamento com *G. margarita*, proporcionar maior número de folhas. Considerando a superfície foliar do cultivar BR-08 Caldeirão observa-se que *A. morrowae* e *G. etunicatum* foram estatisticamente superiores que os demais tratamentos. Para o cultivar IPEAN V-69 o tratamento *G. margarita* foi superior mas não estatisticamente aos tratamentos com fungos nativos e *A. morrowae*

Tabela 8 - Influência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares no número de folhas e superfície foliar em caupi, cultivares BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69. Média de 4 repetições.

Tratamento	Nº de folhas/planta		Superfície foliar cm ² /planta	
	(1)	(2)	(1)	(2)
F. Nativos	36a	42a	87,0 b	127,9ab
<i>A. morrowae</i>	41a	36a	130,8a	127,7ab
<i>G. etunicatum</i>	42a	38a	116,2a	115,5 b
<i>Gi. margarita</i>	29 b	44a	78,0 b	158,6a
CV(%)	11,14	15,1	14,5	19,4
DMS (5%)	6,3	10,1	22,9	41,5

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

(1) cv. BR-08 Caldeirão.

(2) cv. IPEAN V-69.

tendo *G. etunicatum* apresentado a menor superfície foliar. HARRIS & PAUL (1987) relatam que plantas de soja inoculadas com *Rhizobium* e *G. fasciculatum* resultou em um favorecimento na taxa fotossintética indicando três níveis de resposta da fotossíntese para o requerimento de C na simbiose: remoção da

limitação do dreno de C; adaptação morfológica da planta e limitação da fonte de C.

TEOR E ACÚMULO DOS MACRONUTRIENTES PRIMÁRIOS (N, P, K)

A Tabela 9 retrata os teores e acúmulo dos macronutrientes N, P, K, considerados como primários, MALAVOLTA (1980), para o crescimento vegetal.

De uma forma geral os teores de N, P, K para todos os tratamentos estavam dentro dos níveis considerados como adequados, segundo as faixas de teores foliares para cultura de caupi descritas por DANTAS et alii (1979a).

A porcentagem de N para o cultivar BR-08 Caldeirão sofreu variação segundo a espécie de fungo micorrízico utilizada sendo que *A. morrowae* e *G. etunicatum* foi superior estatisticamente em relação a *G. margarita* e superior, embora não estatisticamente, aos fungos nativos. Para o cultivar IPEAN V-69 não se observou diferença entre os tratamentos.

Na % de fósforo não se constatou diferença significativa entre os tratamentos para ambos os cultivares. A ocorrência do efeito da diluição conforme trabalho de JARREL & BEVERLY (1981) não pode ser descartado neste caso.

Tabela 9 - Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares associados a dois cultivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69) no teor e acúmulo de N, P e K na parte aérea. Média de 4 repetições.

Cultivar	Tratamento	N %	N Total mg/planta	P %	P Total mg/planta	K %	K Total mg/planta
BR-08 Caldeirão	F. Nativos	2,74ab ¹	162 b	0,10a	5,9 b	1,53a	89,9a
	<i>A. morrowae</i>	2,93a	232a	0,11a	8,2a	1,19 b	92,7a
	<i>G. etunicatum</i>	2,83ab	214a	0,10a	7,4a	1,24 b	93,1a
	<i>G. margarita</i>	2,69 b	166 b	0,09a	6,0 b	1,56a	96,3a
CV(%)		4,9	11,1	6,9	9,0	9,4	5,3
DMS (5%)		0,22	33,0	0,01	0,96	0,2	8,16
IPEAN V-69	F. Nativos	2,80a	183 b	0,11a	7,0 b	1,51a	100,0 b
	<i>A. morrowae</i>	2,80a	215 b	0,11a	9,0 b	1,21 bc	94,1 b
	<i>G. etunicatum</i>	2,70a	285a	0,10a	11,0a	1,27 bc	132,4a
	<i>G. margarita</i>	2,80a	288a	0,10a	10,0a	0,99 c	101,0 b
CV(%)		6,7	11,4	11,6	13,1	12,6	10,7
DMS (5%)		0,31	42,6	0,02	1,91	0,24	18,5

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação a porcentagem de K observa-se pela Tabela 9 que os tratamentos Fungos Nativos e *G. margarita* proporcionaram os maiores teores, contudo, observa-se claramente que houve efeito de diluição, conforme JARREL & BEVERLY (1981), pois com o desenvolvimento menor do vegetal há uma concentração maior de K nestas plantas.

Quando se analisa os valores acumulados de N na Tabela 9 mais uma vez se constata o efeito positivo dos fungos *A. morrowae* e *G. etunicatum* no valor total de N absorvido para o cultivar BR-08 Caldeirão indicando que este fungo interage positivamente com *Bradyrhizobium* na maior fixação de nitrogênio para a planta hospedeira. Observando-se o cultivar IPEAN V-69 na Tabela 9 observa-se que mais uma vez *G. etunicatum* proporciona um maior acúmulo de N para a planta e mostrando ser uma espécie que pode ser utilizada na triplíce simbiose fungo MVA-*Bradyrhizobium*-Caupi cv. IPEAN V-69. Constate-se também que o fungo *G. margarita* proporcionou surpreendentemente maior acúmulo de N. Tal surpresa se deve ao fato do fungo *G. margarita* não ter sido influenciado pelo efeito do pH $\approx 6,1$, interagindo positivamente no desenvolvimento e absorção de N por parte do cultivar IPEAN V-69.

Pela Tabela 9 pode-se observar que os valores de P acumulados, no cultivar BR-08 Caldeirão, para os fungos *A. morrowae* e *G. etunicatum* foram semelhantes entre si, contudo, estatisticamente significativo em relação a *G.*

margarita e fungos nativos. Para o cultivar IPEAN V-69 observou que *G. etunicatum* e *G. margarita* apresentaram os maiores valores de P acumulado. Tal resultado justifica então o porquê das plantas terem assimilado mais N pela fixação biológica de nitrogênio, pois os nódulos mais bem nutridos em P proporcionam maiores condições da fixação.

Os valores acumulados de K na Tabela 9, para o cultivar BR-08 Caldeirão, nos diversos tratamentos, não diferiu estatisticamente sugerindo que para este nutriente, o cultivar BR-08 Caldeirão, respondeu indistintamente aos tratamentos. No cultivar IPEAN V-69 apenas *G. etunicatum* foi significativamente superior na absorção total de K em relação aos demais tratamentos, os quais não diferiram entre si. Vários trabalhos constatarem o efeito positivo na absorção de N, P e K em plantas micorrizadas com relação ao controle, entre eles (MOSSE, 1973; SAIF, 1987; POWELL, 1975; YOST & FOX, 1982).

TEOR E ACÚMULO DOS MACRONUTRIENTES SECUNDÁRIOS (Ca, Mg, S)

A Tabela 10 mostra a eficiência de diferentes fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em caupi no teor e acúmulo de Ca, Mg e S.

Tabela 10 - Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares associadas a dois cultivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69) no teor e acúmulo de Ca, Mg e S na parte aérea. Média de 4 repetições.

Cultivar	Tratamento	Ca %	Ca Total mg/planta	Mg %	Mg Total mg/planta	S %	S Total mg/planta
BR-08 Caldeirão	F. Nativos	1,50 c ¹	88,4 b	0,54 b	32,0 b	0,25a	14,8 b
	<i>A. morrowae</i>	1,77a	139,2a	0,65a	51,9a	0,27a	21,6a
	<i>G. etunicatum</i>	1,70ab	128,2a	0,66a	49,6a	0,25a	19,0ab
	<i>G. margarita</i>	1,60 bc	98,8 b	0,66a	40,8ab	0,24a	14,8 b
CV(%)		4,8	9,4	11,0	18,1	16,1	18,7
DMS (5%)		0,12	16,52	0,10	12,1	0,06	5,3
IPEAN V-69	F. Nativos	1,49a	98,7 c	0,54a	36,0 b	0,34a	22,8 b
	<i>A. morrowae</i>	1,47a	113,8 bc	0,60a	46,7ab	0,39a	30,1ab
	<i>G. etunicatum</i>	1,51a	159,5a	0,57a	60,2a	0,35a	36,6a
	<i>G. margarita</i>	1,40a	142,5ab	0,57a	58,4a	0,28a	28,6ab
CV(%)		13,1	20,0	12,7	19,1	19,81	21,9
DMS (5%)		0,32	39,6	0,12	14,8	0,11	10,45

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de cálcio para o cultivar BR-08 Caldeirão variou conforme o tratamento, sendo *A. morrowae* o que proporcionou o maior teor, seguido por *G. etunicatum*. Nos valores acumulados constata-se que a infestação com *A. morrowae* e *G. etunicatum* causaram a maior acúmulo para a cultivar já mencionada. Fato semelhante aconteceu com o teor e acúmulo de Mg e S sempre havendo uma ligeira superioridade tanto no teor como no acúmulo destes elementos. As comparações dos teores de Ca, Mg e S ficam prejudicadas pelo fato do efeito da diluição, ocorrido devido ao maior desenvolvimentos das plantas de determinado tratamento, conforme JARREL & BEVERLY (1981), daí considera-se que a discussão com base nos valores acumulados ser mais positiva.

Para o cultivar IPEAN V-69 na Tabela 10, o teor de cálcio para os diversos tratamentos não diferiram estatisticamente, o mesmo acontecendo com relação ao magnésio e ao enxofre. Contudo, mais uma vez, se constatou que o efeito da diluição descrito por JARREL & BEVERLY (1981), ocorreu nesta cultivar nos tratamentos. O valor acumulado de cálcio com o fungo *G. etunicatum* mostrou-se estatisticamente superior a *A. morrowae* e os fungos nativos, não diferindo, contudo, a *G. margarita*. Com relação ao acúmulo de magnésio tanto *G. etunicatum* como *G. margarita* foram superiores aos fungos nativos que foram ineficazes na maior absorção de magnésio. O fungo *A. morrowae* teve um comportamento intermediário na efi-

ciência de promover a melhor nutrição em termos de Mg. Com relação ao enxofre *G. etunicatum* promoveu a melhor absorção de S para planta sendo superior aos fungos nativos e estatisticamente semelhante a *A. morrowae* e *G. margarita*, embora com ligeira superioridade numérica.

Os resultados obtidos acima concordam com trabalhos de SAIF (1987), AMES & BETHLENFALVAY (1987), COOPER (1984), MOSSE (1973), GRAY & GERDEMANN (1973), YOST & FOX (1982), que constatarem uma maior absorção de cálcio, magnésio e enxofre nas plantas infestadas com fungos micorrízicos em relação ao controle sem fungo MVA. Destaque-se que o nosso controle era o solo com os fungos nativos, ou seja, houve um melhor desempenho das espécies utilizadas na absorção destes nutrientes.

TEOR E ACÚMULO DE MICRONUTRIENTES (Fe, Mn, Cu e Zn)

A Tabela 11 fornece os teores e acúmulo de Fe, Mn, Cu e Zn dos 2 cultivares de caupi para os tratamentos em estudo.

Para o cultivar BR-08 Caldeirão não se observou deficiências em termos dos micronutrientes em estudo segundo as faixas de teores foliares para a cultura de caupi descritas por DANTAS et alii (1979b) com exceção do elemento

Tabela 11 - Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares associados a dois cultivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69) no teor e acúmulo dos micronutrientes Fe, Mn, Cu e Zn na parte aérea. Média de 4 repetições.

Cultivar	Tratamento	Teores (ppm)				Acúmulo (µg/planta)			
		Fe	Mn	Cu	Zn	Fe	Mn	Cu	Zn
BR-08	F. Nativos	442a ¹	121ab	2,1 b	23 b	2605ab	721 bc	12 b	137 b
	A. <i>morrowae</i>	464a	162a	3,2a	26ab	3731a	1299a	25a	205a
	Caldeirão	310a	153ab	1,3 b	24 b	2342ab	1160ab	10 b	178ab
	G. <i>margarita</i>	357a	101 b	1,4 b	30a	2206 b	646 c	9 b	187a
CV(%)		25,4	25,1	29,3	15,8	32,6	31,2	29,4	15,9
DMS (5%)		165,6	54,3	0,94	6,0	1432,7	460	6,6	43,3
IPEAN	F. Nativos	306 b	107a	1,4 bc	29a	2035 b	721 b	9,8, bc	191 b
	A. <i>morrowae</i>	364ab	84a	2,6a	28a	2824 b	649 b	20,3a	220ab
	V-69	371ab	122a	1,6b	26a	3916a	1269a	16,0ab	268a
	G. <i>margarita</i>	396a	83a	0,5 c	27a	4029a	840 b	5,4c	278a
CV(%)		14,0	31	39,4	17,3	18,2	31,2	38,3	18,8
DMS (5%)		81	51	0,94	7,9	898	438	7,6	69

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

cobre, que no entanto, não ocorreu sintomas de deficiências deste elemento.

Muito embora o teor de Fe para plantas micorrizadas com *A. morrowae* tenha sido superior a todas as outras, não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, contudo, o efeito diluição se fez presente, pois quando se considerou o acúmulo de Fe as plantas infestadas com *A. morrowae* foi superior a *G. margarita* tendo *G. etunicatum* e fungos nativos apresentado acúmulos de Fe na faixa intermediária.

Com relação ao teor de Mn para o cultivar BR-08 Caldeirão observa-se que plantas micorrizadas com *A. morrowae* apresentaram maiores teores de Mn sendo que plantas com *G. margarita* apresentaram com menores teores. Os valores acumulados mostram a mesma tendência, ou seja, *A. morrowae* promoveu maior acúmulo de Mn na parte aérea, enquanto que *G. margarita* promoveu o menor acúmulo de Mn. Trabalhos conduzidos por PACOVSKY (1986) e MAMO & KILLHAM (1989) mostram em que casos extremos os fungos micorrízicos podem ter comportamento diferente conforme o pH do solo e o cultivar.

A Tabela 11 mostra que *A. morrowae* proporcionou maior concentração de Cu no cultivar BR-08 Caldeirão e maior valor acumulado, tendo os demais tratamentos não se diferenciado entre si. O teor de Cu nas plantas micorrizadas praticamente não atingiu teores considerados adequados segun

do faixas de teores proposto por DANTAS et alii (1979b).

Com relação ao teor e acúmulo de zinco na Tabela 11 houveram respostas semelhantes com a concentração tendo *G. margarita* sido superior aos tratamentos *G. etunicatum* e fungos nativos, com *A. morrowae*, contudo, não se observou diferença estatística. Observou-se o efeito da diluição para o zinco neste cultivar. Os valores acumulados de zinco indicam mais uma vez a superioridade do fungo micorrízico *A. morrowae* em proporcionar à planta maior quantidade de zinco acumulado, muito embora não tenha diferenciado estatisticamente em relação a *G. margarita*, foi superior em relação aos fungos nativos e *G. etunicatum*. Trabalhos conduzidos por SWAMINATHAN & VERMA (1979), concluíram que a inoculação com fungos MVA aumentam a assimilação de zinco em solos deficientes neste elemento.

Com relação ao cultivar IPEAN V-69 a Tabela 11 mostra que houve uma mudança de resposta aos tratamentos tendo *G. margarita*, favorecido o desenvolvimento do cultivar já mencionado seguido *G. etunicatum*.

A concentração de Fe nos tecidos do cultivar IPEAN V-69 no tratamento *G. margarita* mostrou-se maior que com fungos nativos estatisticamente, tendo *G. etunicatum* e *A. morrowae* apresentado comportamento semelhante. Para os valores acumulados de Fe observou-se que *G. margarita* e *G.*

etunicatum foram semelhantes entre si e superiores aos tratamentos *A. morrowae* e fungos nativos.

No que se refere ao teor e acúmulo de Mn constatase que o fungo *G. etunicatum* apresentou tanto maior concentração nos tecidos em relação aos demais tratamentos como maior acúmulo, tendo os demais tratamentos não se diferenciado entre si.

Plantas micorrizadas crescendo em solos com alto teor de Mn disponível assimilam menos Mn sendo protegidos contra a toxicidade de Mn em comparação com plantas não micorrizadas (PACOVSKY, 1986). Contudo, em condições de pH acima de 5,8 a concentração de Mn, cai para níveis não tóxicos e sua absorção passa a ter um comportamento normal e a participação dos fungos micorrízicos, neste caso passa a ser de facilitar a absorção do elemento. MAMO & KILLHAM (1989) observaram fenômeno semelhante quando trabalharam com calagem e fungos micorrízicos vesículo-arbusculares.

Da mesma forma que o cultivar BR-08 Caldeirão observou-se para IPEAN V-69 baixos teores de Cu na parte aérea, segundo faixas de teores de micronutrientes proposto por DANTAS et alii (1979b), contudo não se observou sintomas visuais de deficiência neste micronutriente.

Plantas micorrizadas com *A. morrowae* apresentou maior teor e acúmulo de cobre em relação aos demais tratamentos, seguido por *G. etunicatum*. A espécie *G. margarita*

foi quem possibilitou menor condição de absorção de cobre dentre os tratamentos. Fundamentalmente, a infestação com *A. morrowae* permitiu uma eficácia maior na absorção de cobre, concordando com TIMMER & LEYDEN (1980) que relatam a ação positiva dos fungos micorrízicos em solos deficientes neste elemento.

Na Tabela 11, permite-se observar que tanto *G. margarita* como *G. etunicatum* proporcionaram melhores condições de acumular zinco na parte aérea não se observando diferença significativa dos teores deste elemento devido principalmente ao efeito da diluição descrita por JARREL & BEVERLY (1981). Os teores podem ser considerados adequados segundo DANTAS et alii (1979b), muito embora esteja com teores próximos a níveis de deficiência contudo não se observou sintomas de deficiência. SWANNATHAN & VERMA (1979) tem obtido resultados positivos com plantas micorrizadas em solos deficientes neste elemento.

3.2. EXPERIMENTO 2: SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* sp. PARA CAUPI

NODULAÇÃO E ATIVIDADE DA NITROGENASE

A Tabela 12 mostra o efeito de diferentes isolados de *Bradyrhizobium* sp. nos parâmetros de nodulação e a-

Tabela 12 - Efeito de diferentes estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* spp. no número, peso e atividade da enzima nitrogenase nos nódulos de dois cultivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69). Média de 4 repetições.

Tratamentos	Nodulação		Atividade da nitrogenase			
	Nº/planta	Peso (mg/planta)	Total $\mu\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		Específica $\mu\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{nód} \cdot \text{h}^{-1}$	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
SMS 84	89a ¹	72ab	268a	234a	22a	9ab
SMS 85	20 bc	31 bcd	66 c	107 b	3 d	4 bc
SEMIA 6145	77a	63abc	255a	250a	12 bc	13a
C 516	73a	95a	250a	316a	12bc	10ab
CM 1525	22 bc	65abc	60 c	303a	3 d	9ab
CM 1527	71a	55abc	323a	249a	16ab	11ab
CM 1528	64ab	59abc	256a	300a	23a	9ab
NH ₄ NO ₃	98a	18 cd	163 b	48 bc	6 cd	0,3 c
Controle sem N	0 c	0 d	0	0 c	0 d	0 c
CV(%)	55		28		56	
DMS (5%)	44		77		7,6	

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

(1) cv. BR-08 Caldeirão; (2) cv. IPEAN V-69.

tividade da nitrogenase de dois cultivares de caupi.

Analisando o número de nódulos e o peso de nódulos, observa-se que os tratamentos que apresentaram um padrão melhor nestes parâmetros para o cultivar BR-08 Caldeirão são: SMS 84, SEMIA 6145, C 516, CM 1527 e CM 1528 estes dois últimos isolados na Seção de Microbiologia do Solo. Estas estirpes acima foram significativamente superiores nestes dois parâmetros analisados, muito embora DOBEREINER et alii (1970) e SAITO (1982) acreditem que nem sempre o peso de nódulos seja bom indicador da eficiência de uma estirpe, muito menos o número de nódulos.

Para o cultivar IPEAN V-69 as melhores estirpes para estes parâmetros foram: C 516, SMS 84, SEMIA 6145, CM 1525, CM 1527 e CM 1528. A estirpe CM 1525 isolada a partir deste cultivar demonstrou especificidade hospedeira, ou seja, não nodulam a contento no cultivar BR-08 Caldeirão, demonstrando que tal fenômeno também ocorre com bactérias do grupo cowpea.

O alto coeficiente de variação nos parâmetros número e peso de nódulo dificulta selecionar a estirpe mais eficiente com base nestes dois parâmetros.

Considerando a Tabela 12, a atividade total da nitrogenase para o cultivar BR-08 Caldeirão, as estirpes CM 1528, SMS 84 e CM 1527, proporcionaram os maiores valores, muito embora tenha ocorrido um alto coeficiente de va-

riação neste parâmetro, fato bastante comum neste tipo de determinação. Para a atividade específica da nitrogenase não se observou diferença entre os tratamentos, apesar da tendência das estirpes SMS 84 e CM 1528 serem as melhores.

Com relação à cultivar IPEAN V-69 a atividade total da nitrogenase foi maior para as estirpes SEMIA 6145, CM 1527, C 516, CM 1525, CM 1528 e SMS 84. Não observou diferença significativa para a atividade específica da nitrogenase. Em ambos os parâmetros o alto coeficiente de variação dificultou numa melhor interpretação dos resultados em face da grande variação dos resultados obtidos.

PESO DA MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA

A Tabela 13 mostra claramente o efeito da inoculação de diversas estirpes nos dois cultivares de caupi no parâmetro peso da matéria seca da parte aérea, o qual foi superior para o tratamento com 100 ppm de N como já era esperado nos dois cultivares estudados. As estirpes que proporcionaram os maiores pesos de matéria seca para o cultivar BR-08 Caldeirão foram CM 1527, CM 1528 e SEMIA 6145, as quais tinham sido citados nos parâmetros observados anteriormente. O cultivar IPEAN V-69 teve uma gama maior de estirpes, proporcionando efeito no peso da matéria seca da

Tabela 13 - Avaliação da eficiência simbiótica estirpes e isolados de dois cultivares de caupi (BR-08 Caldeirão e IPEAN V-69) com base no peso da matéria da parte aérea teor e acúmulo de nitrogênio e eficiência relativa.

Tratamento	Peso parte aérea		N		N total		Eficiência relativa ^a	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
	g/planta		%		mg/planta		%	
SMS 84	2,3 c	2,6 d	3,2 b	3,6ab	74,9 c	91,0 cd	41,91 c	48,4 d
SMS 85	1,5 d	1,1 e	2,2 c	3,6ab	33,3 d	41,5 e	26,31 d	21,4 e
SEMIA 6145	4,1 b	4,0 b	4,1a	4,1a	167,6a	166,6a	74,21ab	75,8 b
C 516	2,7 c	2,4 d	2,6 c	3,2 b	68,7 c	77,8 d	47,65 c	45,8 d
CM 1525	1,2 d	3,1 cd	1,5 d	3,7ab	19,5 de	115,5 bc	21,75 d	58,9 c
CM 1527	4,2 b	3,5 bc	4,2a	3,7ab	173,3a	127,1 b	74,41 b	65,1 c
CM 1528	4,2 b	4,2 b	3,8a	3,9a	160,8a	164,5a	75,35 b	78,9 b
NH ₄ NO ₃	5,6a	5,3a	2,4 c	2,4 c	130,4 b	121,3 b	100 a	100 a
Controle sem N	0,3 e	0,4 f	0,8 f	0,9 d	2,1 e	3,3 f	4,98 e	7,12 f
CV(%)	16,9		12,7		18,2		13,26	
DMS (5%)	0,7		0,5		25,0		10,11	

¹ Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

a - Eficiência Relativa = $\frac{\text{Peso parte aérea planta inoculada}}{\text{Peso parte aérea planta c/NH}_4\text{NO}_3} \times 100$.

parte aérea indicando ser este cultivar mais promíscua. As melhores estirpes para este cultivar foram CM 1528, SEMIA 6145 e CM 1527. Destaque-se o comportamento da CM 1525 em relação aos dois cultivares, enquanto para o cultivar BR-08 Caldeirão não se observa efeito positivo da inoculação, fenômeno contrário ocorreu para o cultivar IPEAN V-69, sendo depois das três estirpes citadas, o que proporcionou maior peso da parte aérea. Resultados semelhantes foram encontrados por MINCHIN (1978), trabalhando com 4 estirpes de *Rhizobium* e 4 cultivares de caupi.

TEOR E ACÚMULO DE NITROGÊNIO

Pela Tabela 13 pode-se observar que os maiores teores de N, para o cultivar BR-08 Caldeirão, foram proporcionados pelas estirpes CM 1527, SEMIA 6145 e CM 1528, as quais tiveram teores maiores que o controle com nitrogênio muito embora se saiba que para o caso do controle com N esteja havendo o efeito de diluído já mencionado diversas vezes anteriormente. Com teores intermediários ter-se-ia as estirpes SMS 84 e C 516 que podem ser utilizadas mas não com a mesma capacidade fixadora de N. Ressalte-se mais uma vez o comportamento da estirpe CM 1525 que das estirpes estudadas neste cultivar foi a que proporcionou a concentração mais

baixa de N sô ganhando para o controle sem N, indicando claramente uma incompatibilidade entre bactéria-hospedeiro.

Quando se parte para observar na Tabela 13 o acúmulo de N no cultivar BR-08 Caldeirão, pode-se constatar sem mais nenhuma dúvida o efeito das diversas estirpes na capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. As melhores estirpes foram SEMIA 6145, CM 1527 e CM 1528, as quais não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, acumulando inclusive mais que o próprio controle nitrogenado.

Para o cultivar IPEAN V-69, observou-se que os teores de N foram relativamente homogêneas para todas as estirpes testados, inclusive a CM 1525 que, no caso, foi uma das melhores. Desta forma, as estirpes melhores com relação a este parâmetro foram SEMIA 6145 e CM 1528. Com comportamento intermediário tem-se as seguintes estirpes: CM 1527 e CM 1525.

Relativo ao acúmulo de N, da mesma forma que o cultivar anterior, observa-se pela Tabela 13 que as estirpes que proporcionaram os maiores acúmulos foram: SEMIA 6145 e CM 1528 que foram superiores estatisticamente às demais estirpes estudadas. As estirpes CM 1527 e CM 1525 podem também ser recomendadas para inoculação, principalmente a CM 1527 que chegou ainda a ter maior acúmulo de N que o controle com N.

Estes dados deixam claro que a busca de estirpes eficientes é possível e que caupi responde à inoculação, concordando com DANSO & OWIREDU (1988), muito embora DREYFUS et alii (1987) e GRAHAM & SCOTT (1984) acreditam não ser necessário se inocular caupi no campo.

SENANAYAKE et alii (1987) estudando o grau de nodulação de algumas estirpes de caupi e sua nodulação com a idade da planta, obteve resposta à inoculação, tendo boa nodulação e fixação de N_2 em vasos de Leonard.

Torna-se essencial verificar se os isolados CM 1525, CM 1527 e CM 1528, em condições de campo, apresentarão a mesma performance que a obtida em casa-de-vegetação a fim de se ter a certeza da eficiência da nodulação e fixação biológica de nitrogênio.

EFICIÊNCIA RELATIVA

A Tabela 13 dá a porcentagem de eficiência relativa calculada segundo BERGENSEN et alii (1971).

Para o cultivar BR-08 Caldeirão, observa-se que o melhor desempenho foram para as estirpes SEMIA 6145, CM 1528 e CM 1527. Com eficiência relativa intermediária tem-se as estirpes SMS 84 e C 516, que tiveram um bom grau de nodulação e peso de nódulo, contudo não teve o melhor desem

penho, concordando com SAITO (1982) e DOBEREINER (1970). As estirpes SMS 85 e CM 1525 tiveram uma eficiência relativa muito pequena, não sendo indicada para inoculação.

Com relação à eficiência relativa das estirpes em estudo para o cultivar IPEAN V-69, resultados semelhantes podem ser observados. As estirpes com melhor performance foram CM 1528 e SEMIA 6145, com eficiência relativa, um de 78,92% e 75,75%, respectivamente. Outras estirpes com boa eficiência, mas inferior às duas já citadas, tem-se a CM 1527 e CM 1525, com 65,14% e 58,87%, respectivamente.

As melhores estirpes, então, devem ser testadas em solo em condições de campo, a fim de verificar a capacidade competitiva e também a potencialidade fixadora de nitrogênio.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados e discussão apresentados, pode-se concluir que:

1. A contribuição da inoculação com fungos micorrízicos vesículo-arbusculares, no crescimento vegetal nos dois cultivares de caupi, foi maior que no solo com fungos nativos;

2. A ocorrência de uma relativa especificidade hospedeira foi observada para os cultivares estudados em relação ao fungo micorrízico, sendo *A. morrowae* e *G. etunicatum* os mais indicados para BR-08 Caldeirão e *G. margarita* e *G. etunicatum* para IPEAN V-69;

3. O melhor estado nutricional de plantas da cultivar BR-08 Caldeirão, relativo a macro- e micronutrientes, de uma forma geral foi proporcionado pelo fungo *A. morrowae*, seguido por *G. etunicatum*; para o cultivar IPEAN V-69 constatou-se que *G. margarita* seguido de *G. etunicatum* foram os que proporcionaram melhor estado nutricional, refletindo assim em uma melhor fixação biológica de nitrogênio e

melhor desenvolvimento do caupi;

4. Em condições controladas, a resposta à inoculação de caupi com *Bradyrhizobium* spp. foi positiva, sendo as estirpes SEMIA 6145, CM 1527 e CM 1528 aquelas que proporcionaram o melhor desempenho para os dois cultivares;

5. A ocorrência de um certo grau de especificidade hospedeira foi observada para o cultivar BR-08 Caldeirão, usando o isolado CM 1525, proporcionando uma eficiência relativa muito baixa para BR-08 Caldeirão e alta para IPEAN V-69.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.F.; T.S. MOORE Jr.; M. CRISTENSEN; N. STANTON.

Growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal and nonmycorrhizal *Bouteloua gracilis* in defined medium. Mycologia, New York, 71: 666-9, 1979.

ALMEIDA, R.T.; VASCONCELOS, I.; SABADIA, F.R.B. Efeito de infecção de fungos micorrízicos VA em feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Ci. Agron., Fortaleza, 16(1): 26-26, 1985.

AMES, R.N. & BETHLENFALVAY, G.J. Localized increase in nodule activity but no competitive interaction of cowpea rhizobia due to pre-establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza. New Phytologist, Oxford, 106(2): 207-215,

ARAÚJO, J.P.P. de & WATT, E.E. O caupi no Brasil. IITA/EMBRAPA. Brasília, 1988. 722p.

- ARAÚJO, R.S. & PEREIRA, P.A.A. Fixação biológica de nitrogênio nas culturas de feijão e caupi. Goiânia, EMBRAPA-CNPAF, 1983. 32. (Projeto de pesquisa. Form.13002.8200470).
- AUGE, R.M. Do VA Mycorrhizae enhance transpiration by affecting host phosphorus content? Journal of Plant Nutrition, New York, 12(6): 743-753, 1989.
- BAREA, J.M. & AZCÓN-AGUILLAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. Advances in Agronomy, New York, 36: 1-54, 1983.
- BARRETO, P.D. Variabilidade e controle genético da nodulação por bactérias do gênero *Rhizobium* em feijão de corda, *Vigna unguiculata* (L.) Savi. Fortaleza, UFC, 1978. 84p. (Tese Mestrado).
- BERGENSEN, F.J.; BROCKWELL, J.; GIBSON, A.H.; SCHWINGHAMER, E.A. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. Plant and Soil, Hague, Special Volume, p.3-16. 1971.
- BONETTI, R. Fixação biológica de nitrogênio em caupi na região amazônica. In: ARAÚJO, J.P.P. de & WATT, E.E. O caupi no Brasil. IITA/EMBRAPA. Brasília, 1988. 722p.

BONETTI, R.; OLIVEIRA, L.A.; COSTA, S.S. Eficiência de populações de *Rhizobium* sp. e *R. phaseoli* em alguns solos do Estado de Rondônia. I. Áreas com atividades agrícolas. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE RHIZOBIUM, 12., Campinas. 1984. Anais. Campinas, Instituto Agrônômico, 1986. p.398-402.

CARLING, D.E.; RIEHLE, W.G.; BROWN, M.F.; JOHNSON, D.R. Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on nitrate reductase and nitrogenase activities in nodulating and non-nodulating soybean. Phytopathology, Lancaster, 68: 1590-1596, 1978.

CHONG, K.; WYNNE, J.C.; ELKAN, G.H.; SCHNEEWEIS, T.J. Effects of soil acidity and aluminium content on *Rhizobium* inoculation, growth and nitrogen fixation of peanuts and other grain legumes. Tropical Agriculture, Trinidad, 64(2): 97-104, 1987.

COOPER, K.M. Physiology of VA mycorrhizal associations. In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.J. VA Mycorrhiza. Boca Raton, CRC, 1984. p.155-180.

- DANSO, S.K.A. & OWIREDU, J.D. Competitiveness of introduced and indigenous cowpea *Bradyrhizobium* strains for nodule formation on cowpeas [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] in three soils. Soil Biol. Biochem., Oxford, 20(3): 305-310, 1988.
- DANTAS, J.P.; BERGAMIN FILHO, H.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a nutrição mineral do feijão macassar (*Vigna sinensis* L.) Endl. II. Efeito de carências de macronutrientes no crescimento, produção e composição mineral. Anais Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz, Piracicaba, 36: 247-57, 1979a.
- DANTAS, J.P.; BERGAMIN FILHO, H.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a nutrição mineral do feijão macassar (*Vigna sinensis* L.) Endl. III. Efeito de carências de micronutrientes no crescimento, produção e composição mineral. Anais Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz, Piracicaba, 36: 259-67, 1979b.
- DART, P.S. & MERCER, F.V. The effect of growth temperature, level of ammonium nitrate and light intensity on the growth and nodulation of cowpea (*Vigna sinensis* Endl. Hank). Austr. J. Agric. Res., Melbourne, 16: 321-45, 1965.

- DAVIS, R.M. & MENGE, J.A. *Phytophthora parasitica* inoculation and intensity vesicular-arbuscular mycorrhizal in citrus. New Phytologist, Oxford, 87: 705-715, 1981.
- DIXON, R.K.; GARRETT, H.E.; COX, G.S. Boron fertilization, vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization and growth of *Citrus jambhiri* Lush. J. Plant. Nutr., New York, 12(6): 687-700, 1989.
- DOBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUZMÁN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, 5: 155-161, 1970.
- DREYFUS, B.L.; DIEM, H.G.; FREIRE, J.; KEYA, S.O.; DOMMERGUES, Y.R. Nitrogen fixation in tropical agriculture and forestry. In: DaSILVA, E.J.; DOMMERGUES, Y.R.; NYNS, E. J.; RATLEDGE, C. Microbial Technology in the developing World. Oxford University Press. p.7-50, 1987.
- EL-HASSANIN, A.S. & LYND, J.Q. Soil fertility effects with tripartite symbiosis for growth, nodulation and nitrigenase activity of *Vicia faba* L. J. Plant Nutr., New York, 8(6): 491-504, 1985.

FAO, Legume inoculants and their use. Niftol Project, USA
x FAO fertilizer and Plant Nutrition Science. Rome,
63p. 1987.

FAO. "1975 Production Yearbook", Vol. 29. Food and Agri-
cultural Organization of the United Nations, Rome. 1976.

GALLI, F. Inoculações cruzadas com bactérias dos nódulos
de leguminosas tropicais. Rev. Agri. Piracicaba, São
Paulo. p.139-151. 1959.

GARGANTINI, H. & WUTKE, A.C.P. Fixação do nitrogênio do
ar pelas bactérias que vivem associadas às raízes do
feijoeiro de porco e de feijão baiano. Bragantia, Cam-
pinas, 19, 639-652, 1960.

GERDEMANN, J.W. Mycorrhizae. In: CARSON, E.W., ed. The
plant root and its environment. Charlottesville, Uni-
versity Press of Virginia, p.205-217. 1974.

GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal
Endogone species extracted from soil by wet surving and
deconting. Trans. Br. Mycol. Soc., London, 46: 235-244,
1963.

- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol., Oxford, 84: 489-500, 1980.
- GRAHAM, R.A. & SCOTT, T.W. Varietal characteristics and nitrogen fixation in cowpea. Tropical Agriculture, Trinidad, 60(4): 269-271, 1983.
- GRAHAM, R.A. & SCOTT, T.W. Response of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] to nitrogen and inoculation in Trinidad. Trop. Agric., Trinidad, 61(1): 56-58, 1984.
- GRAINER, A. Improving the monitoring of deforestation in the humid tropics. In: SUTTON, S.L.; WITMORE, T.C.; CHARDWICK, A.C., ed. Tropical rain forest: ecology and management. Oxford, London. Blackwell Scientific Publ. 1983. p.387-395.
- GRAY, L.E. & GERDEMANN, J.W. Uptake of sulphur-35 by vesicular-arbuscular mycorrhizal. Plant and Soil, Hague, 39: 687, 1973.

- GUSMÃO CAMARA, I. Tropical must forest conservation in Brasil. In: SUTTON, S.L.; WITMORE, T.C.; CHARDWICK, A.C., ed. Tropical rain forest: ecology and management. Oxford, London, Blackwell Scientific Publ. 1983. p.413-421.
- HADLEY, G. Organization and fine structure of orchid mycorrhiza. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B., ed. Endomycorrhizas. London, Academic Press, 335-351. 1975.
- HARDY, W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol., Lancaster, 43: 1185-1207, 1968.
- HARRIS, D. & PAUL, E.A. Carbon requirements of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae. In: SAFIR, G.R. Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants. p.93-105. CRC Press, Boca Raton, Florida, 224p. 1987.
- HOWELER, R.H.; SIEVERDING, E.; SAIF, S. Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. Plant and Soil, Hague, 100: 249-283, 1987.

- HUXLEY, P.A.A. Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). IV. Uptake and distribution of a single dose of early applied nitrogen. Tropical Agriculture, Trinidad, 57(3): 193-202, 1980.
- ISLAM, R. & AYANABA, A. Effects of seed inoculation and pre-infecting cowpea (*Vigna unguiculata*) with *Glomus mosseae* on growth and seed yield of the plants under field conditions. Plant and Soil, Hague, 61(3): 341-350, 1981.
- JARREL, W.M. & BEVERLY, R.B. The dilution effect in plant nutrition studies. Advances in Agronomy, New York, 34: 197-224, 1981.
- LA RUE, T.A. & PATTERSON, T.G. How much nitrogen do legumes fix? Advances in Agronomy, New York, 34: 15-38, 1981.
- LYND, J.Q.; TYRL, R.J.; PURCINO, A.A.C. Mycorrhiza-soil fertility effects on regrowth, nodulation and nitrogenase activity of siratro (*Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb.). J. Plant Nutr., New York, 8(1): 1047-1059, 1985.
- MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo. Editora Agronômica Ceres, 251p. 1980.

MAMO, T. & KILLHAM, K.S. Effects of soil liming and vesicular-arbuscular micorrhizal inoculation on the growth and micronutrient content of the tiff plant. Plant and Soil, Hague, 102: 257-259, 1987.

McKNIGHT, T. Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the cowpea group with proposed additions to this group. Old. J. Agric. Sci., Brisbane, 6: 61-76, 1949.

MENGE, J.A.; DAVIS, R.M.; JOHNSON, E.L.V.; ZENTMYER, Mycorrhizal fungi decrease growth and reduce transplant injury in avocado. California Agriculture, 32: 6-7.

MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; EAGLESHAM, A.R.J. Plant genotype x *Rhizobium* strain interactions in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Tropical Agriculture, Trinidad, 55(2): 107-115, 1978.

MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; NEVES, M.C.P. Nitrogen nutrition of cowpeas (*Vigna unguiculata*): effects of timing of inorganic nitrogen applications on nodulation, plant growth and seed yield. Tropical Agriculture, Trinidad, 58(1): 1-22, 1981.

- MOSSE, B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. An. Rev. Phytopath., Palo Alto, 11: 171-196, 1973.
- MURDOCK, J.A.; JACKOBS, J.A.; GERDEMANN, J.W. Utilization of phosphorus sources of different availability by mycorrhizal and non-mycorrhizal maize. Plant and Soil, Hague, 27: 329-34, 1967.
- NANJIU, D. & WANKI, S.B.C. Estimating leaf areas of cowpea and soybean using dry weights of terminal leaflets. Expl. Agric., 16: 149-151.
- NEVES, M.C.P.; MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. Carbon metabolism, nitrogen assimilation and seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) plants dependent on nitrate-nitrogen or on one of two strains of *Rhizobium*. Tropical Agriculture, Trinidad, 58(2): 115-131, 1981.
- OJALA, J.C.; JARREL, W.M.; MENGE, J.A.; JOHNSON, E.L.V. Influence of mycorrhizal fungi on mineral nutrition and yield of onion in saline soil. Agron. J., Madison, 75: 255-259, 1983.

- OLIVEIRA, A.A.R. & ZAMBOLIM, L. Interação entre o fungo endomicorrízico *Glomus etunicatum* e o nematóide das galhas *Meloidogyne javanica* sob diferentes níveis de fósforo em feijão. Fitopatologia Brasileira, 11: 217-226, 1986.
- OLIVEIRA, L.A. & BONETTI, R. Fatores químicos limitantes do solo da nodulação, infecção por micorrizas VA e rendimento do feijão caupi num solo da região de Manaus. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DA AMAZÔNIA, 4., Porto Velho. Rondônia. 1983. 16p.
- OLIVEIRA, L.A. & SILVESTER-BRADLEY, R. Effect of different Central Amazonian soils on growth, nodulation and occurrence of N₂-fixing *Azospirillum* spp. in roots of some crops plants. Turrialba, 32(4): 463-469, 1982.
- OLLIVIER, B.; BERTHEAU, Y.; DIEM, H.G.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Influence de la variété de *Vigna unguiculata* dans l'expression de trois associations endomycorhiziennes à vésicules et arbuscules. Can. J. Botany, Ottawa, 61(1): 354-358, 1983.

OSEI-YEBOAH, S.; LINDSAY, J.I.; GUMBS, F.A. Estimating leaf area of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) from linear measurements of terminal leaflets. Trop. Agric., Trinidad, 60(2): 149-150, 1983.

PACOVSKY, R.S. Micronutrient uptake and distribution in mycorrhizal or phosphorus-fertilized soybeans. Plant and Soil, Hague, 95(3): 379-388,

PAQUIN, R. & COULOMBE, L.J. A simple method for measuring the area of leaves of potted plants. Can. J. Bot., Ottawa, 37: 167, 1959.

PARADA, A. Efeito de fósforo e de micorriza vesículo-arbuscular no feijoeiro. Piracicaba, ESALQ/USP, 139p. 1984. [Dissertação de Mestrado].

PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc., London, 55(1): 158-161, 1970.

PLENCHETTE, C.; FURLAN, V.; FORTIN, A. Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. J. Amer. Soc. Hort. Sci., New York, 107(4): 535-538, 1982.

POSS, J.A.; POND, E.; MENGE, J.A.; JARREL, W.M. Effect of salinity on mycorrhizal onion and tomato in soil with and without additional phosphate. Plant and Soil, Hague, 88: 301-319, 1985.

POWELL, C.L. Potassium uptake by mycorrhizas. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (ed.). Endomycorrhizas. Academic Press Inc., London, Great Britain, 1975.

POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.J. VA Mycorrhizae: Why all the interest? In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, J., ed. VA Mycorrhiza. Boca Raton, CRC Press, Inc., Cap. 1. p.1-3. 1984.

PURCINO, A.A.C. & LYND, J.Q. Tripartite symbiosis of *Stylosanthes scabra* Vog. influenced by soil fertility treatments of a Typic Eutruxox. Agron. J., Madison, 77: 455-458, 1985.

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, Hague, 114: 45-52, 1989.

- READ, D.J. & STRIBLEY, D.P. Some mycological aspects of the biology of mycorrhiza in the Ericaceae. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B., ed. Endomycorrhizas. London, Academic Press. p.105-117, 1975.
- RHODES, L.H. & GERDEMANN, J.W. Nutrient translocation in vesicular-arbuscular mycorrhizal. In: COOK, C.B.; PAPAAS, W.; RUDOLPH, E.D. (ed.). Cellular interactions in symbiosis and parasitism. The Ohio State University Press, Columbus, Ohio, p.173-195. 1980.
- SAFIR, G.R.; BOYER, J.S.; GERDEMANN, J.W. Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. Science, Lancaster, 172: 581-583, 1971.
- SAFIR, G.R. & NELSEN, C.E. VA mycorrhizas: plant and fungal water relations. pp.161-164. In: MOLINA, R. (ed.). Proceedings of the Sixth North American Conference on Mycorrhizal. Forest Research Laboratory, Cowallis, OR.
- SAIF, S.R. Growth responses of tropical forage plant species to vesicular-arbuscular mycorrhizae. Plant and Soil, Hague, 97: 25-35, 1987.

- SAITO, S.M.T. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli*. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, 17(7): 999-1006, 1982.
- SAITO, S.M.T. Relações entre fixação de $^{15}\text{N}_2$, evolução de H_2 e redução de C_2H_2 em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, ESALQ/USP, 98p. [Tese de Doutoramemto].
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. Análises químicas em plantas. Piracicaba, ESALQ/USP, 27p. Mimeografado. 1979.
- SCHENCK, N.C. & KELLAM, M.K. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on disease development. Florida Agric. Exp. Sta., Gainesville. 16p. 1978.
- SCHUBART, H. Critérios ecológicos para o desenvolvimento agrícola das terras firmes da Amazônia. Mimeografado. INPA/Manaus. 24p. 1977.
- SENANAYAKE, L.; KNIEVEL, D.P.; STEVENS Jr., S.E. Nodulation and symbiotic nitrogen fixation of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Plant and Soil, Hague, 99: 435-439, 1987.

SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. NifTAL Project. University of Hawaii, Paia, 367p.

STAMFORD, N.P. Efeito de estirpes de *Rhizobium* sp. de nitrogênio, fósforo e enxofre, na avaliação de fixação de N_2 , crescimento e absorção de nutrientes em cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Piracicaba, 1978. 151p. [Tese de Doutorado - ESALQ/USP].

STAMFORD, N.P. & NEPTUNE, A.M.L. Especialidade hospedeira e competição entre estirpes de *Rhizobium* em inoculação cruzada com quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Cad. Ômega, Recife, 3(1/2): 25-34, 1979.

STAMFORD, N.P. & SANTOS, C.E.R.S. Efeito do composto urbano e adubação fosfatada na fixação do N_2 e no rendimento de caupi. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE RHIZOBIUM, 12., Campinas, 1984. Anais, Campinas, Instituto Agrônomico, 1986. p.570.

STAMFÓRD, N.P.; VASCONCELOS, I.; ALMEIDA, R.T. Fixação biológica de nitrogênio em caupi na região amazônica. In: ARAÚJO, J.P.P. de & WATT, E.E. O caupi no Brasil. Brasília, IITA/EMBRAPA, 1988. 722p.

SWAMINATHAN, K. & VERMA, B.C. Responses of three crop species to vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and zinc deficient Indian soils. New Phytologist, Oxford, 82: 481-487, 1979.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; OLIVEIRA, L.A.; PODESTA FILHO, J.A.; St. JOHN, T.V. Nodulation of legumes, nitrogenase activity of roots and occurrence of nitrogen fixing *Azospirillum* spp. in representative soils of Central Amazonica. Agro-Ecosystems, 6: 249-266, 1980.

TIMMER, L.W. & LEYDEN, R.G. The relationship of mycorrhizal infection to phosphorus-induced copper deficiency in sour orange seedlings. New Phytologist, Oxford, 85: 15-23, 1980.

- TRAPPE, J.M. & N.C. SCHENCK. Taxonomy of the fungi forming Endomycorrhizal. A. Vesicular-Arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonales). In: SCHENCK, N.C. (ed.). Methods and Principles of Mycorrhizal Research. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, p.1-9. 1982.
- VASCONCELOS, I.; LANDIM, C.M.V.; MENDES FILHO, P.F. Comportamento de estirpes de *Rhizobium* sp. em simbiose com feijão de corda, *Vigna sinensis* (L.) Savi. In: CEARÁ. Universidade Federal - Centro de Ciências Agrárias. Relatório de Pesquisa 1978; Programa de Pesquisa com a cultura do feijoeiro. Fortaleza, 1979. p.120-6.
- VASCONCELOS, I.; LIMA, I.T.; ALVES, J.F. Desempenho de nove estirpes de *Rhizobium* sp. em simbiose com feijão-de-corda, *Vigna sinensis* (L.) Savi. Ci. Agron., 5(1-2): 1-6, 1975.
- VINCENT, J.M. Manual of the practical study of root nodule bacteria. Intern. Biol. Program. Handbook nº 15. Oxford. Blackwell. 163p. 1970.

- WALKER, C. & SANDERS, F.E. Taxonomies concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. Mycotoxon, 27: 169-182. In: SCHENCK, N.C. & PÉREZ, Y. Manual for the identification of VA Mycorrhizal fungi, St. Paul, 2ed. 241p. 1988.
- WILLIAM, R.F. Estimation of leaf area for agronomic and plant physiological studies. Aust. J. Agric. Res., 5: 235-246, 1954.
- YOST, R.S. & FOX, R.L. Influence of mycorrhizae on the mineral contents of cowpea and soybean grown in an oxisol. Agronomy Journal, Madison, 74(3): 475-481, 1982.
- YOUNG, C.C.; JUANG, T.C.; CHAO, C.C. Effects of *Rhizobium* and vesicular-arbuscular mycorrhiza inoculations on nodulation, symbiotic nitrogen fixation and soybean yield in subtropical-tropical fields. Biol. Fertil. Soils, Berlin, 6(2): 165-169, 1988.
- ZARY, K.W.; MILLER Jr., J.C.; WEAVER, R.W.; BARNES, L.W. Intraspecific variability for nitrogen fixation in Southern-pea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). J. Amer. Soc. Hort. New York, 103(6): 806-808, 1978.