

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PARA FEIJÃO-
CAUPI EM FUNÇÃO DA DESFOLHA ARTIFICIAL**

LEONARDO FRANKLIN LIMA DA SILVA

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

ABRIL - 2018

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PARA FEIJÃO- CAUPI EM FUNÇÃO DA DESFOLHA ARTIFICIAL

LEONARDO FRANKLIN LIMA DA SILVA

Agrônomo (Bacharelado)

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr^a. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega

Co-orientadora: Dr^a. Jaqueline Zanon de Moura

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

ABRIL – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Leonardo Franklin Lima da Silva



Prof.ª Dr.ª Rafaela Simão Abrahão Nóbrega

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

(Orientadora)



Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

Embrapa Semiárido



Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola em _____.”

À Deus, por sempre me abençoar e iluminar meus caminhos, aos meus pais Antenor e Tânia, irmãos Leandro, Luiz e Verona, minha noiva Thaís por serem a razão da minha vida e por me incentivar a não desistir em momentos que me deparei em grandes dificuldades.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

À professora Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega pela forma humana como conduziu minha orientação, pela oportunidade e ensinamento que foram de fundamental importância ao contínuo aprendizado e amadurecimento pessoal e profissional.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa no primeiro ano de curso e as agências de fomento e pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Universidade Federal de Lavras (UFLA), que embora não tenham financiado diretamente o presente estudo, contribuíram para aquisições de equipamentos e materiais utilizados neste estudo.

Ao laboratório de Biologia do Solo pelas instalações, e aos colegas, em especial, João, Adélia, Caeline, Manoela, Reginaldo e Joice pela amizade e total apoio concedido.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Aos meus pais Antenor João e Tânia Regina pelos exemplos de vida e trabalho, pelo carinho, compreensão e dedicação, por estarem sempre ao meu lado. Aos meus irmãos Leandro, Luiz e Verona pelo apoio e amor incondicional. À minha noiva Thais Martins pelo carinho e apoio cedidos em todos os momentos que precisei. Amo vocês.

Aos meus familiares e amigos por acreditarem na minha vitória.

Enfim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram do processo de construção deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Tabela 1.** Valores médios do número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS), massa de raiz seca (MRS), massa de parte aérea seca (MPAS), massa total seca (MTS), eficiência relativa (EFCN) e clorofila a (CLA) do cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EPACE 10 aos 25 dias após o plantio em função das fontes de nitrogênio..... 28
- Tabela 2.** Variáveis da fase vegetativa em função dos níveis desfolha artificial realizada no cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EPACE 10 aos 25 dias após o plantio.....30
- Tabela 3.** Clorofila total e clorofila b do cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EPACE 10 em função dos níveis de desfolha realizada aos 25 dias após o plantio.31
- Tabela 4.** Variáveis de produção em função dos níveis desfolha artificial do cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EPACE 10 realizada aos 45 dias após o plantio..... 31
- Tabela 5.** Número de grãos do cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EPACE 10 em função dos níveis de desfolha realizada aos 45 dias após o plantio.....32

ÍNDICE

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL	10
CAPÍTULO 1	11
REVISÃO DE LITERATURA	11
1. Descrição botânica, origem, aspectos culturais e sócio econômico do feijão-caupi [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp]	12
2. Fixação biológica de nitrogênio e inoculação na cultura do feijão-caupi [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp]	13
3. Pragas desfolhadoras e desfolha artificial	15
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2	22
Abstract	24
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADO E DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

RESUMO

SILVA, L. F. L. **Seleção de bactérias diazotróficas para feijão-caupi em função da desfolha artificial.** Cruz das Almas - Bahia, 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

As pragas promovem grandes prejuízos para as culturas, reduzindo drasticamente sua capacidade fotossintética. Dentre as leguminosas, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], durante o seu ciclo, pode ser bastante afetado pelas pragas desfolhadoras. O feijão-caupi quando inoculado com estirpes de bactérias diazotróficas pode ser beneficiado amplamente com a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Como o feijão-caupi apresenta certa tolerância à desfolha e responde bem a inoculação com bactérias diazotrófica, objetivou-se avaliar o efeito da desfolha artificial nesta cultura quando inoculado com bactérias diazotróficas, assim como verificar o percentual de desfolha tolerado em ambiente protegido e selecionar estirpes para realização de ensaios de campo. A desfolha artificial foi realizada em dois estádios de crescimento da planta. A primeira desfolha artificial foi realizada aos 25 dias após o plantio, compreendendo o período vegetativo da planta e a segunda foi realizada aos 45 dias após o plantio, período do início do florescimento da planta. Na fase vegetativa houve efeito individual das fontes de nitrogênio e da desfolha artificial nos componentes de produção do feijão caupi (cultivar Epace 10). Na fase vegetativa o cultivar apresenta maior índice de clorofilas B e total em 40 e 36 % de desfolha, quando inoculado com o isolado em fase de seleção UFRB FA51B. O feijão-caupi quando inoculado com bactérias diazotróficas apresentou até 30% de tolerância a desfolha artificial na fase reprodutiva em ambiente protegido quando inoculado com a estirpe em fase de seleção UFRB FA51B1.

Palavras-chave: Rizóbio, desfolhamento, fixação biológica de nitrogênio

ABSTRACT

SILVA, L. F. L. Selection of diazotrophic bacteria for cowpea in function of artificial leaf remotion. Cruz das Almas - Bahia, 2018. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Pests promote great damage to crops, drastically reducing their photosynthetic capacity. Among legumes, cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], during its cycle, can be quite affected by the defoliation pests. Cowpea when inoculated with strains of diazotrophic bacteria can be widely benefited with the Biological Fixation of Nitrogen (BNF). As the cowpea presents some tolerance to defoliation and responds well to inoculation with diazotrophic bacteria. The objective of this study was to evaluate the effect of artificial defoliation in this culture when inoculated with diazotrophic bacteria, as well as to verify the percentage of defoliation tolerated in protected environment and to select strains for field trials. The artificial defoliation was carried out in two stages of plant growth. The first artificial defoliation was carried out at 25 days after planting, including the vegetative period of the plant and the second was performed at 45 days after planting, period of beginning of flowering of the plant. Cowpea when inoculated with diazotrophic bacteria presented up to 30% tolerance to the artificial defoliation in the reproductive phase in protected environment when inoculated with the strain in the selection phase UFRB FA51B1.

Key words: Rhizobia, defoliation, biological nitrogen fixation

INTRODUÇÃO GERAL

Danos ocasionados por ataques de pragas podem promover perdas significativas na produção das culturas, pois reduzem a capacidade fotossintética das plantas, afetando os componentes do rendimento, em decorrência das alterações provocadas na atividade fisiológica, como por exemplo, na translocação de fotoassimilados. Entre as leguminosas, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], durante seu ciclo, é bastante atacado por pragas, principalmente as desfolhadoras. Nesse contexto, estudos relacionados à desfolha artificial são de extrema importância para entendermos a relação entre a infestação da praga e o seu rendimento para a implantação de um manejo integrado. Há relato que o feijão-caupi apresenta uma tolerância de 60% de desfolha na fase vegetativa e de até 47% na fase reprodutiva (MOURA et al., 2014).

Plantas sem deficiência nutricional podem ser mais tolerantes às pragas, pois seu equilíbrio nutricional é importante. O nitrogênio (N), por ser um constituinte dos ácidos nucleicos e de proteínas, moléculas fundamentais para todos os processos biológicos, é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas e o elemento mais abundante na atmosfera terrestre, presente principalmente na forma diatômica (N₂), sendo considerado um macronutriente essencial para as espécies vegetais.

A inoculação de estirpes eficientes no feijão-caupi pode fazer com que a cultura dispense adubação nitrogenada, mantendo uma produtividade compatível com a fertilização nitrogenada. Reconhecidamente, há inoculantes autorizados pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para substituição parcial ou total do insumo químico (BRASIL, 2011). Nesse contexto, espera-se que plantas inoculadas com estirpes de bactérias diazotróficas podem produzir similarmente como uma planta adubada com nitrogênio mineral e tolerar um percentual de desfolha em ambiente protegido.

Este trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira, será visto uma revisão de literatura, em que foram enfatizados os aspectos culturais e econômicos do feijão-caupi, fixação biológica de nitrogênio (FBN) e inoculação na cultura do feijão caupi, pragas desfolhadoras e desfolha artificial. Na segunda parte consta o trabalho que objetivou a seleção de bactérias diazotróficas para a o feijão-caupi em função da desfolha artificial. em ambiente protegido.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Descrição botânica, origem, aspectos culturais e sócio econômico do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]

O feijão-caupi é uma planta dicotiledônea, pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboidea*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna* e espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. No Brasil, é comumente conhecido como feijão fradinho, feijão-de-corda, feijão macassar e feijão-caupi em que o cultivo é destinado à produção de grãos secos e verdes (FREIRE FILHO et al., 2005).

No período entre 1973 a 2010 foram lançadas 71 cultivares de feijão-caupi no Brasil, apresentando diversas características superiores em relação às variedades crioulas. Quando comparado a outras culturas, esse número ainda é inferior, demonstrando que o melhoramento genético desta cultura é recente (FREIRE FILHO et al., 2011). O gênero *Vigna* é amplamente difundido nas regiões tropicais. Grande parte das espécies se encontra na África, e dessas, 66 são endêmicas. Grande parte das espécies são encontradas na África e entre elas, está a *V. unguiculata* (L.) Walp (FREIRE FILHO, 1988).

O feijão-caupi é uma cultura anual, herbácea, produz frutos do tipo vagem, apresenta germinação epígea, com seus cotilédones inseridos no primeiro nó do ramo principal. Possui sistema radicular axial, com raízes superficiais, sendo comum encontrar estruturas especializadas, os nódulos, onde auxiliam na absorção de nitrogênio através do processo chamado de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) realizada por bactérias diazotróficas simbióticas conhecidas popularmente como rizóbios.

O ciclo fenológico do feijão-caupi é dividido em duas fases segundo Campos et al. (2000): - Fase vegetativa e fase reprodutiva. A fase vegetativa pode ser assim subdividida: V0 - semeadura; V1 – cotilédones emergidos na superfície do solo; V2 – folhas unifolioladas completamente abertas, suas duas margens estão completamente separadas; V3 – 1º folha trifoliolada encontra-se com os folíolos separados e completamente abertos; V4 - 2º folha trifoliolada encontra se com os folíolos separados e completamente abertos; V5 - 3º folha trifoliolada encontra-se com os folíolos separados e completamente abertos; V6 – os primórdios do ramo secundário surgem nas axilas das folhas unifolioladas, podendo também ser observados nas axilas das primeiras folhas trifólio ladas; V7 – 1º folha do ramo secundário encontra-se completamente aberta; V8 – 2º folha do ramo secundário encontra-se completamente aberta; V9 – 3º folha do ramo

secundário encontra-se completamente aberta. Já a fase reprodutiva caracteriza-se por: R1 – surgimento dos primórdios do primeiro botão floral no ramo principal; R2 – antese da primeira flor, geralmente oriunda do primeiro botão floral; R3 – início da maturidade da primeira vagem, geralmente oriunda da primeira flor. R4 – maturidade de 50% das vagens da planta; e R5 – maturidade de 90% das vagens da planta.

O plantio do feijão-caupi pode ser realizado em duas épocas: na primeira época ou primeira safra, é plantado no início da estação chuvosa (novembro a março) e corresponde por cerca de 71% da produção média anual; e a segunda época ou segunda safra, ocorre no final da estação chuvosa (abril a agosto) e corresponde por 29% da produção média anual, sendo como uma cultura de safrinha. Vale ressaltar que os principais sistemas de produção são: cultivo de sequeiro e em consórcio com as culturas do milho e da mandioca e cultivo irrigado (FREITAS et al., 2009).

As exigências hídricas para o feijão-caupi são consideradas satisfeitas com, no mínimo, 300 mm de precipitação pluvial que bem distribuídos durante o período de desenvolvimento da cultura, proporciona colheitas consideráveis (CAMPOS et al., 2010).

De acordo com os dados disponibilizados pela Companhia Nacional de Abastecimento, a produção nacional de feijão-caupi, no ano de 2016/2017 foi de 157,7 milhões de toneladas, numa área de 458 mil hectares, tendo uma produtividade de 461 kg ha⁻¹ (CONAB, 2017). A produção de feijão-caupi concentra-se nas regiões Nordeste (NE), Norte e Centro-Oeste, apresentando uma produtividade média de 400, 750-800 e 1200 kg ha⁻¹, respectivamente (FREIRE FILHO et al., 2011). Então, essa diferença de produtividade entre as regiões Norte e Nordeste, ocorre em função do NE apresentar baixo emprego de tecnologia em termo de base familiar, como também, as condições climáticas da região N favorecer o desenvolvimento da cultura. Quanto ao Centro-Oeste, à alta produtividade desta região deve-se às boas condições climáticas, alto emprego de tecnologia, solo de alta fertilidade e manejo adequado.

2. Fixação biológica de nitrogênio e inoculação na cultura do feijão-caupi [Vigna unguiculata (L.) Walp]

A cultura do feijão-caupi é nodulada por bactérias diazotróficas em que estas são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico (N₂) e transferi-lo para a planta na forma de amônia. Este processo é conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e ocorre

no interior de estruturas especializadas, denominadas nódulos, formados por meio da simbiose entre a bactéria diazotrófica e a planta (hospedeiro).

Além dos fatores relacionados à comunicação entre os simbioses (bactéria-planta), a nodulação é influenciada também por fatores abióticos, tais como: umidade, salinidade, temperatura, e toxidez de alumínio. Nódulos de crescimento indeterminado, após estresse hídrico, podem reiniciar o crescimento e a atividade, enquanto nódulos de crescimento determinado, dependendo da intensidade do estresse, podem senescer (ARAÚJO et al., 2006). Durante os meses de seca, a população de rizóbio capaz de nodular o feijão-caupi era bastante baixa e que tendia a reduzir à medida que o déficit hídrico aumentava (MARTINS et al., 2003). Temperaturas elevadas do solo representam um dos principais fatores limitantes à FBN em regiões tropicais, em que afetam todas as etapas de crescimento do rizóbio e da planta hospedeira. A faixa de temperatura ideal para a nodulação encontra-se entre 25 e 32 °C, podendo apresentar uma maior variação entre as diferentes espécies cultivadas (ARAÚJO et al., 2006).

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é importante para solos tropicais em que naturalmente são deficientes em nitrogênio e pode representar uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos nitrogenados, com a vantagem de ser economicamente viável e não causar poluição ao meio ambiente (FIGUEIREDO et al., 2008).

Dentre as leguminosas, o feijão-caupi possui uma grande capacidade de nodular com diversos gêneros de bactérias, sendo 14 gêneros atualmente, e devido a isto, é considerada uma planta promícuo muito utilizada para estudos de diversidade de bactérias diazotróficas simbióticas (LIRA JÚNIOR et al., 2017). Porém, o simbiote preferencial do feijão-caupi é o gênero *Bradyrhizobium*. Por isso, para essa cultura, existem quatro estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium* autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA como inoculante, são elas: BR 3267 (SEMIA 6463) (*Bradyrhizobium japonicum*) (MARTINS et al., 2003), INPA 3-11B (SEMIA 6462) (*Bradyrhizobium elkanii*) e UFLA 3-84 (SEMIA 6461) (*Bradyrhizobium sp.*) (LACERDA et al., 2004) e BR 3262 (SEMIA 6464) (ZILLI et al., 2009) (Brasil, 2011).

Estas bactérias fazem parte do produto comercial denominado inoculantes. A utilização de inoculantes é uma forma ambientalmente correta de fornecer nitrogênio para as leguminosas e outras culturas que se associam com microrganismos diazotróficos. É

também uma forma mais econômica, em que pode ser utilizada tanto por pequenos agricultores que cultivam para sua subsistência, como por grandes produtores (ZILLI et al., 2009). Na busca em novos inoculantes eficientes na fixação de nitrogênio com leguminosas, estudos em ambiente protegido e de laboratórios devem ter continuidade em campo, pois as estirpes selecionadas devem ser boas competidoras por sítios de infecção em campo e expressar adaptação aos locais onde serão utilizadas, sobrevivendo às condições edafoclimáticas locais e competindo com rizóbios nativos do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Resultados de pesquisa indicam que cultivares de feijão-caupi respondem positivamente à inoculação com bactérias simbióticas selecionadas e eficientes. Plantas de feijão-caupi quando inoculadas com estirpes de bactérias diazotróficas apresentaram um aumento de 30 a 45% na produtividade de grãos quando comparada à que recebeu adubação mineral (RUMJANEK et al., 2005; ZILLI et al., 2009; GUALTER et al., 2011). O feijão-caupi cultivar BRS Guariba inoculado com estirpes de rizóbio apresenta melhores rendimentos em relação aos tratamentos sem inoculação (COSTA et al., 2014). Os cultivares de feijão-caupi BRS Pujante e BRS Tapaihum, quando inoculados, destacaram-se quanto à produtividade e ao teor de proteínas nos grãos, quando cultivados na região do submédio do vale do São Francisco (MARINHO et al., 2014). A inoculação de plantas de feijão-caupi cultivar BR Mulato com a estirpe INPA 03-11B, em ensaio de campo, promoveu um incremento de mais de 35%, comparada à produtividade da testemunha sem N-mineral e sem inoculante, apresentando-se como alternativa de baixo custo (SOARES et al., 2006).

3. Pragas desfolhadoras e desfolha artificial

Um dos principais fatores limitantes da produtividade das culturas no Brasil é representado pelas pragas, que podem causar danos econômicos em intensidades variadas, sendo capazes de ocasionar até perdas totais. O interesse no estudo da desfolha artificial é uma ferramenta para determinar não somente a aplicação, mas também para o manejo agroecológico de pragas. O desfolhamento influencia nos componentes de produção, repercutindo na produtividade, qualidade e rentabilidade. Os estudos sobre níveis de desfolha nos diferentes estádios fenológicos das culturas fornecem subsídios sobre o

comportamento da planta no que diz respeito à capacidade de suportar desfolhas, como daquelas decorrentes do ataque de pragas, doenças, ou qualquer outro fator que venha a reduzir o índice de área foliar (SILVA et al., 2012).

Pesquisas que simulam a redução de área foliar através da desfolha artificial permitiram demonstrar que o feijão-comum expressa diferentes respostas em relação ao ciclo, nível de dano, hábito de crescimento e o estágio em que é aplicada a desfolha. Independente do estágio de desenvolvimento da cultura e hábito de crescimento, pode ocorrer influências negativas e significativas sobre os seus componentes de produção e no rendimento com 66 a 100% de dano foliar (DAROS et al., 2000).

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola pode tolerar níveis consideráveis de desfolha (20-66%) sem que ocorra perda na produção (QUINTELA e BARRIGOSI, 2001). Com a desfolha artificial realizada no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. CV. xamego), houve redução na produtividade com o aumento dos níveis de desfolha em cinco estádios de desenvolvimento, com exceção ao R9 (vagem seca), em que o maior decréscimo foi no estágio de formação das vagens (SCHMILDT et al., 2010). Com níveis de desfolha a partir de 33% de dano, o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola nos estádios de desenvolvimento V3, V4 e R7, apresentou decréscimo no número de vagens por planta, porém o número de grãos por vagens não sofreu influência dos níveis de desfolha (FAZOLIN e ESTRELA, 2003).

Os componentes do rendimento são afetados pela perda da área foliar em feijão comum, em decorrência das alterações provocadas na atividade fisiológica (fonte-dreno) das plantas, repercutindo-se na produtividade da cultura (MOURA, 1999). Não existe época mais crítica ao desfolhamento no feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), evidenciando que o feijoeiro é sensível à perda de área foliar independente do estágio, e que o peso de grãos é o menos afetado, enquanto o número de vagens por planta é o componente de rendimento mais prejudicado.

Dentre os métodos de controle de pragas, tem-se a resistência de plantas a insetos, em que diminui a população do inseto-praga sem interferir no ecossistema. O cultivar de feijão-caupi BR17 Gurguéia apresentou como a menos preferida para alimentação de *Spodoptera eridania* (SOUZA et al., 2012). Os cultivares de feijão-caupi BRS Cauamé, BRS Guariba e Pretinho precoce 1 foram os menos preferidos pelo pulgão-preto. Já o cultivar BR17 Gurguéia apresentou resistência do tipo tolerância ao ataque do pulgão-preto (BANDEIRA et al., 2015). Também foi relatado que a menor atividade da enzima

lipase de homogenato de *Callosobruchus maculatus* foi observada quando os insetos se alimentaram de grãos do cultivar Tapaihum inoculado com a estirpe BR 3262 (SILVA et al., 2017).

O feijão-caupi durante o seu ciclo sofre por diversos danos causados por insetos, refletindo na produção e na qualidade de seus grãos. Entre os fatores bióticos, os insetos-praga são os que mais limitam o rendimento agrônomico da cultura, em que depende amplamente da eficiência fotossintética da folha e da intensa translocação dos assimilados para as estruturas reprodutivas (dreno). Desfolhas controladas (33 e 50%) no estágio de pré-florescimento não reduzem a produção de grãos de feijão-caupi, porém, desfolhas severas, em qualquer estágio, anterior a maturidade, reduzem drasticamente a produção e que a manutenção de metade a dois terços do potencial da área foliar das plantas, poderiam ocasionar produções satisfatórias de feijão-caupi (EZEDINMA, 1973). Plantas de feijão-caupi com 25 e 50 dias após a emergência quando recebem desfolhas de até 50% de dano, não alteram a produção de grãos (MENDES, 1995). Para o cultivar de feijão-caupi BR 17 Gurguéia é relatado uma tolerância de 60% de desfolha na fase vegetativa e até 47% na fase reprodutiva em condições de campo (MOURA et al., 2014).

A desfolha artificial é um mecanismo utilizado para simular um ataque brando, médio e severo de pragas desfolhadoras às plantas, que possibilita conhecer técnicas seguras à respeito da capacidade da cultura tolerar perdas de área foliar em diferentes estádios fenológicos. Contudo, ainda não há relatos sobre o comportamento da cultura do feijão-caupi sob efeito da desfolha artificial em função da inoculação com bactérias diazotróficas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S. A.; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L.; NÓBREGA, J. C. A. Produtividade do feijão-caupi cv BR Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 3, p. 364-366, 2010.
- ARAÚJO, A. S. F.; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a

nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Revista Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 182-185, 2010.

BANDEIRA, H. F. S.; LIMA, A. C. S.; STRUCKER, TRASSATO, L. B.; DIONISIO, L. F. S. Preferência do pulgão-preto e da cigarrinha-verde em diferentes genótipos de feijão-caupi em Roraima. **Revista Agroambiente On-line**, v. 9, n. 1, p. 79-85, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 13, de 24 de março de 2011. **Aprovar as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos microrganismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil, na forma de anexo I, II e III, desta Instrução**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 25 de mar. 2011. Seção 1. p. 3-7.

CAMPOS, F. L.; FREIRE FILHO, F. R.; LOPES, A. C.; RIBEIRO, V. Q.; SILVA, R. Q. B.; ROCHA, M. M. Ciclo fenológico em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp): uma proposta de escala de desenvolvimento. **Revista Científica Rural**, v. 5, n. 2, p. 110116, 2000.

CAMPOS, J. H. B. C.; SILVA, M. T.; SILVA, V. P. R. da. Impacto do aquecimento global no cultivo do feijão-caupi no Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 4, p. 396-404, 2010.

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

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2017/2018: Sétimo levantamento**. Brasília: CONAB, 2017.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A; SILVA, A. F. T.; FERREIRA, L. V. M.; NÓBREGA, J. C. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 4, p. 489-494, 2014.

DAROS, E.; RONZELLI JÚNIOR, P.; COSTA, J. A.; KOEHLER, H. S. Estresses por sombreamento e desfolhamento no rendimento e seus componentes da variedade de feijão "Carioca". **Scientia Agrária**, v. 1, n. 1-2, p. 55-61, 2000.

EZEDINMA, F. O. C. Effects of defoliation and topping on semi-upright cowpeas *Vigna unguiculata* (L) Walp. In a humid tropical environment. **Experimental Agriculture**, v. 9, n. 3, p. 203-207, 1973.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V. Comportamento da cv. pérola (*Phaseolus vulgaris* L.) submetida a diferentes níveis de desfolha artificial. **Ciência Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 978-984, 2003.

FERREIRA, L. de V. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; AGUIAR, F. L. de; MOREIRA, F. M. de S.; PACHECO, L. P. Biological nitrogen fixation in production of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, family farming in Piauí, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, p. 153-160, 2013.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STMORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba, p. 568, 2008.

FREIRE FILHO, F. R. Genética do caupi. In: ARAUJO, J. P. P. de & WATT, E.E. (Org.) **O caupi no Brasil**, 1988. p. 194-222.

FREIRE FILHO, F. R., RIBEIRO, V. Q., ROCHA, D. M., SILVA, K, J. D., NOGUEIRA, M. S. R., ROGRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011, 84 p.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ALCÂNTARA, J. P.; BELARMINO FILHO, J.; ROCHA, M. M. BRS Marataoã: nova cultivar de feijão-cupi com grão tipo sempreverde. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 771-777, 2005.

FREITAS, F. C. L.; MEDEIROS, V. F. L. P.; GRANGEIRO, L. C.; SILVA, M. G. O.; NASCIMENTO, P. G. M. L.; NUNES, G. H. Interferência de plantas daninhas na cultura do feijão-caupi. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 241-247, 2009.

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

- LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; MAGALHÃES, F. M. M.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, v.51, n. 293, p. 67-82, 2004.
- LIRA JÚNIOR, M. A.; FRACETTO, G. G. M.; ARAÚJO, A. S. F.; FRACETTO, F. J. C.; NÓBREGA, R. S. A.; SILVA, K.; GALDINO, A. C. Rhizobial diversity for tropical pulses and forage and tree legumes in Brazil. In: ZAIDI, A.; KHAN, M. S.; MUSARRAT, J. (Org.). **Microbes for legumes improvement**. Springer, 2017. p. 135-151.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº7.127, de 4 de março de 2010.
- MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; AIDAR, S. T.; MARTINS, L. M. V.; JÚNIOR, P. I. F. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 395-402, 2014.
- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the Semi-Arid Region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, p. 333-339, 2003.
- MENDES, S. P. **Efeito da desfolha sobre a distribuição de matéria-seca em *Vigna unguiculata* (L.) Walp; um enfoque na perspectiva das pragas desfolhadoras**.
Dissertação (Mestrado em Agronomia), p. 34, 1995.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras, p. 729, 2006.
- MOURA, G. de M. Efeito do desfolhamento no rendimento do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 34, n. 1, p. 57-62, 1999.
- MOURA, J. Z. PÁDUA, L. E. M.; MOURA, S. G.; RIBEIRO, N. W. S. M.; SILVA, P. R.R. Nível de dano econômico para insetos desfolhadores em feijão-caupi. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 239-246, 2014.
- QUINTELA, E. D.; BARRIGOSI, J. A. F. **Resposta do feijoeiro a diferentes níveis de desfolha artificial**. EMBRAPA Arroz e Feijão. ISSN 1678-9628. Pesquisa em foco, n. 49, 2001.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J. A. DE a.; RIBEIRO, V. Q. (Ed). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**: Embrapa Informação Tecnológica. 2005. p. 280-335.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; PRATISSOLI, D.; REIS, E. F. Influência de desfolhas artificiais para simular perdas na produção de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Chamego). **Arquivos do Instituto Biológico**, n. 77, p. 457-463, 2010.

SILVA, S. D.; ALVES, J. M.; MESQUITA, G. M.; LEANDRO, W. M. Efeito da compactação do solo no desenvolvimento aéreo e radicular do pinhão manso (*Jatropha curcas*) e crambe (*Crambe abyssinica* Hoschst). **Global Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 87-97, 2012.

SILVA, L. B.; TORRES, E. B.; NÓBREGA, R. A. S.; LOPES, G. N.; VOGADO, R. F.; PAVAN, B. E.; FERMANDES JÚNIOR, P. I. Biochemical studies of amylase, lipase and protease in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations fed with *Vigna unguiculata* grain cultivated with diazotrophic bacteria strains. **Bulletin of entomological research**, v. 107, n. 6, p. 820-827, 2017.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A.A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 795-802, 2006.

SOUZA, B. H. S; JÚNIOR, A. L. B.; SILVA, A. G.; RIDRIGUES, N. E. L. Não preferência para alimentação e aspectos biológicos de *Spodoptera eridania* em cultivares de feijão-caupi. **Revista Caatinga**, v. 25, n.3, p. 31-37, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004.

ZILLI, J. É; MARSON, L. C.; MARSON, B. F; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Revista ACTA Amazônica**, v.39, n.4, p.749-758, 2009.

CAPÍTULO 2

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PARA FEIJÃO-
CAUPI EM FUNÇÃO DA DESFOLHA ARTIFICIAL**

Artigo formatado nas normas e a ser submetido à Revista Brasileira de Ciências Agrárias

Seleção de bactérias diazotróficas para feijão-caupi em função da desfolha artificial

Leonardo F. L. da Silva¹, Rafaela S. A. Nóbrega¹, Jaqueline Z. de Moura², João M. da S. Rabelo¹, Caeline C. da Silva¹, Adélia L. Santana¹, Manoela G. F. da Paz¹

¹ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, CEP 44380-000, Cruz das Almas-BA, Brasil. E-mail: falconblack18@hotmail.com; rafaella.nobrega@ufrb.edu.br; joaomarcosrabelo@outlook.com; kaeline01@hotmail.com; deulima2008@hotmail.com; manoelagfpaz@gmail.com² Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, BR 135, Km 03, Planalto Horizonte, CEP 64900-000, Bom Jesus-PI, Brasil. E-mail: jaqueline.zanon.m@hotmail.com

Resumo

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] apresenta certa tolerância à desfolha ocasionada por pragas e responde bem a inoculação. Este trabalho propôs selecionar estirpes de bactérias diazotróficas em função da desfolha artificial em ambiente protegido. Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado sob arranjo fatorial (5x6): cinco níveis de desfolha (0, 25, 50, 75 e 100%) e seis fontes de nitrogênio constituído por duas estirpes autorizadas pelo Ministério Agricultura, Pecuária e abastecimento (INPA 3-11B e UFLA 3-84), dois isolados em fase de teste (UFLA 3-164 e UFRB FA51B1) e dois controles, um com nitrogênio mineral (70 kg ha⁻¹) e outro não inoculado e sem adição de nitrogênio mineral. No primeiro experimento, a desfolha artificial foi realizada aos 25 dias após o plantio, sendo avaliados a massa da parte aérea, raiz e nódulo secos, eficiência relativa, clorofila a, b e total. No segundo experimento, a desfolha foi realizada aos 45 dias após o plantio, avaliando-se os componentes de produção, número de nódulos e vagem, massa de vagem seca, comprimento de vagem e número de grãos por vagem. Na fase vegetativa houve efeito individual das fontes de nitrogênio e da desfolha artificial nos componentes de produção do feijão caupi (cultivar Epace 10). Na fase vegetativa o cultivar apresenta maior índice de clorofilas B e total em 40 e 36 % de desfolha, quando inoculado com o isolado em fase de seleção UFRB FA51B. O feijão-caupi quando inoculado com bactérias diazotróficas apresentou até 30% de tolerância a desfolha artificial na fase reprodutiva em ambiente protegido quando inoculado com a estirpe em fase de seleção UFRB FA51B1.

Palavras-chave: Simbiose, ataque de pragas, *Vigna unguiculata*

Selection of diazotrophic bacteria for cowpea in function of artificial leaf remotion

Abstract

The cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) presents a certain resistance to the defoliation caused by pests and responds well to inoculation. This work proposed to select and evaluate diazotrophic bacteria strains as a function of the artificial defoliation in protected environment. The treatments were arranged in a completely randomized design under a factorial arrangement (5x6): five levels of defoliation (0, 25, 50, 75 and 100%) and six nitrogen sources consisting of two strains authorized by the Ministry by the of Agriculture, Livestock and Supply (INPA 3-11B and UFLA 3-84), two isolates in the test phase (UFLA 3-164 and UFRB FA51B1) and two controls, one with mineral nitrogen (70 kg ha⁻¹) and the other uninoculated and without nitrogen addition mineral. In the first experiment, the artificial defoliation was performed 25 days after planting, and evaluated the mass of the aerial part, root and dry nodule, relative efficiency, chlorophyll a, b and total. In the second experiment, the defoliation was carried out at 45 days after planting, and evaluated the production components, number of nodules and pods, dry pod mass, pod length and number of grains per pod. Cowpea inoculated with diazotrophic bacteria presented 30% tolerance to artificial defoliation in the reproductive phase in a protected environment. In order to carry out a field trial, it is recommended to select the authorized strain UFRB FA51B1, as it was highlighted the production of grains as a function of the levels of artificial defoliation.

Key words: Symbiosis, pest attack, *Vigna unguiculata*

INTRODUÇÃO

Danos ocasionados por ataques de pragas podem promover perdas significativas na produção das culturas, pois reduzem a capacidade fotossintética das plantas, afetando os componentes do rendimento. Entre as leguminosas, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], durante seu ciclo, pode ser atacado por pragas, principalmente as desfolhadoras. Assim, estudos relacionados a desfolha artificial são de extrema importância para compreender a relação entre a infestação da praga e o seu rendimento para a implantação de um manejo integrado.

O feijão-caupi cultivar BR 17 Gurguéia pode tolerar 60% de desfolha na fase vegetativa e até 47% na fase reprodutiva em condições de campo (Moura et al., 2014). Plantas de feijão-caupi cultivar Pérola (*Phaseolus vulgaris* L.) com 10 e 17 dias após a plantio submetidas a desfolha artificial toleram uma desfolha de 25%, sem que haja

redução da produtividade, porém, todos os níveis de desfolha (25, 50 e 75%) em plantas com mais de 24 dias após o plantio reduziram sua produtividade (Silva et al., 2003).

O feijão caupi é capaz de beneficiar-se amplamente da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), principalmente por permitir o uso mais eficiente do nitrogênio, minimizar os impactos ambientais e os custos de produção. Reconhecidamente, há inoculantes autorizados pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para substituição parcial ou total do insumo químico, através da instrução normativa MAPA nº13, de 25 de março de 2011 (BRASIL, 2011).

Trabalhos com o objetivo de avaliar a contribuição da FBN promovida por estirpes na nodulação, rendimento de grãos e desenvolvimento das plantas de feijão-caupi têm relatado resultados superiores ou iguais à adubação nitrogenada com aumento de 30 a 45% na produtividade de grãos (Zilli et al., 2009; Gualter et al., 2011). O crescimento e produtividade de feijão-caupi BRS Guariba inoculado constataram que estirpes de rizóbio apresentaram melhores rendimentos de grãos quando comparados às cepas autorizadas e aprovadas como inoculantes para a cultura do feijão-caupi, demonstrando a importância da seleção de rizóbios para obtenção de uma interação mais eficiente com o hospedeiro (Costa et al., 2014). O cultivar BR 17 Gurguéia quando inoculado com a estirpe BR 3262 demonstrou um acréscimo significativo na produtividade de grãos de 50,17%, quando comparado ao tratamento com nitrogênio mineral sem inoculação (Ferreira et al., 2013). Por sua vez, em condições de campo, plantas inoculadas com as estirpes UFLA 03-84 e a INPA 3-11B contribuíram para o aumento no rendimento de grãos, semelhante ao tratamento testemunha que recebeu somente nitrogênio mineral (70 kg ha⁻¹) (Soares et al., 2006).

Como o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] pode apresentar diferentes tolerâncias a desfolha e responder a inoculação com bactérias diazotróficas, espera-se que plantas inoculadas possam produzir similarmente como uma planta adubada com nitrogênio mineral e tolerar maiores porcentagens de desfolha artificial, que não comprometa a produção. Assim, objetivou-se selecionar e avaliar estirpes de bactérias diazotróficas em função da desfolha artificial em ambiente protegido.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), no Campus de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB), no município de Cruz das Almas- BA.

A análise química da amostra de solo retirada na profundidade de 0 a 0,2 m, antes da instalação do experimento, apresentaram as seguintes características: pH (H₂O): 6,0; MO: 12,8 g dm⁻³, P (Mehlich 1): 10,5 mg dm⁻³, K⁺: 67,7 mg dm⁻³, Ca²⁺: 0,7 cmol_c dm⁻³, Mg²⁺: 0,3 cmol_c dm⁻³, (H+Al): 2,0 cmol_c dm⁻³, SB: 1,2 cmol_c dm⁻³, CTC efetiva: 1,4 cmol_c dm⁻³, CTC potencial: 3,2 cmol_c dm⁻³, V: 37,5%, Zn²⁺: 5,05 mg dm⁻³, Fe²⁺: 49,05 mg dm⁻³, Mn²⁺: 9,1 mg dm⁻³, Cu²⁺: 1,6 mg dm⁻³ e B: 0,28 mg dm⁻³. O solo foi seco ao ar, destorroado, passado em peneira de malha de 4 mm e acondicionados em vasos de mudas com capacidade de 2,5 Kg.

O experimento foi realizado em dois ensaios em casa de vegetação, em que no primeiro avaliou-se o efeito da desfolha artificial no feijão-caupi inoculado com bactérias diazotróficas no período vegetativo no segundo ensaio avaliou-se no período reprodutivo da planta.

O primeiro ensaio foi arranjado em esquema fatorial 5 x 6 (cinco níveis de desfolha e seis fontes de nitrogênio), com cinco repetições, totalizando 150 unidades experimentais e dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os níveis de desfolha utilizados foram: 0, 25, 50, 75 e 100%. Os moldes foram confeccionados conforme Moura et al. (2014). Esses níveis se referem ao percentual de dano causado na folha pela praga. As fontes de nitrogênio foram constituídas de duas estirpes autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2011) como inoculantes para feijão-caupi, a INPA 03-11B - SEMIA 6462 (*Bradyrhizobium elkanni*) e UFLA 3-84 – SEMIA 6461 (*Bradyrhizobium* sp.), dois isolados em fase de teste, a UFLA 03-164, identificada como *Bradyrhizobium* sp. (Soares et al., 2014) e UFRB FA51B1 (Sousa, 2017), e duas testemunhas: uma com adubação nitrogenada (70 kg ha⁻¹) (Ribeiro et al., 1999) e outra sem adição de inoculante e N mineral.

Antes do plantio, as sementes foram submetidas a desinfestação superficial com álcool etílico a 98% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos e, em seguida, três sucessivas lavagens com água destilada estéril, método também utilizado por Costa et al. (2016).

O plantio foi em vasos com capacidade de 2,5 kg, utilizando-se cinco sementes por vasos. Para os tratamentos que receberam inoculação, as sementes foram inoculadas

com 1 mL por semente de cultura crescida em meio 79 semissólido após cinco dias de crescimento na temperatura de 28°C (Fred & Waksman, 1928).

O desbaste foi realizado com cinco dias após a emergência, deixando-se apenas uma planta por vaso. Os vasos foram irrigados diariamente para manter a umidade do solo a 60% da capacidade de campo. A primeira desfolha artificial foi realizada aos 25 dias após o plantio, correspondendo ao período vegetativo da planta, sendo o estágio V9 (Campos et al., 2000).

As plantas foram coletadas aos 50 dias após o plantio no estágio fenológico R2. Posteriormente, foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa de circulação de ar forçado por 72 horas a 60° C. Após esse período, foram determinadas as variáveis massa dos nódulos seca (MNS), massa da raiz seca (MRS), massa da parte aérea seca (MPAS), Clorofilas a (CLA), b (CLB) e total (CLT) e a eficiência relativa (EFCN).

A EFCN foi calculada pela divisão da massa da parte aérea seca do tratamento inoculado pela massa da parte aérea seca do tratamento com N, multiplicado por 100. Determinaram também o número de nódulos por planta (NN) e os índices de pigmentos fotossintéticos utilizando o clorofilômetro modelo CFL 1030 (Falker®).

O segundo ensaio com o cultivar foi em vaso e instalado com o mesmo delineamento experimental utilizado no primeiro ensaio em casa-de-vegetação. O que diferenciou do mesmo, foi que a segunda desfolha artificial foi realizada aos 45 dias após o plantio, período do início do florescimento da planta, compreendendo o estágio fenológico R2 (Campos et al., 2000) e foi conduzido até a produção. As variáveis avaliadas foram: número de vagens produzidas por planta (NV), massa de vagem seca (MVS), comprimento médio de vagens (CV) e número de grãos produzidos por vagem (NG).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, a 5% de probabilidade. O teste de Tukey, a 5%, foi utilizado na comparação de médias para o fator fontes de nitrogênio. Realizou-se a análise de regressão para o efeito significativo dos níveis de desfolha. A escolha do modelo selecionado para cada variável baseou-se na significância dos parâmetros e nos valores do R². Empregou-se para análise dos dados o programa estatístico SISVAR 5.3 (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio em que a desfolha foi realizada aos 25 dias após o plantio, houve efeito individual das fontes de nitrogênio ($p < 0,05$) para as variáveis: número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS), massa de raiz seca (MRS), massa de parte aérea seca (MPAS), eficiência relativa (EFCN) e clorofila a (CLA) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios do número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS), massa de raiz seca (MRS), massa de parte aérea seca (MPAS), massa total seca (MTS), eficiência relativa (EFCN) e clorofila a (CLA) do cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EPACE 10 aos 25 dias após a semeadura em função das fontes de nitrogênio

Fonte de nitrogênio	NN planta ⁻¹	MNS mg planta ⁻¹	MRS g planta ⁻¹	MPAS g planta ⁻¹	MTS g planta ⁻¹	EFCN %	CLA -
INPA 3-11B	34,80 a*	22,90 a	0,46 b	3,55 b	4,01 b	77,66 b	40,84 a
UFLA 3-84	39,95 a	25,80 a	0,45 b	3,87 b	4,31 b	83,70 b	41,44 a
UFLA 3-164	34,50 a	38,65 a	0,56 a	3,50 b	4,06 b	76,24 b	41,64 a
UFRB FA51B1	17,00 b	19,38 a	0,51 a	3,46 b	3,98 b	75,85 b	41,71 a
SN ¹	14,35 b	29,74 a	0,51 a	3,75 b	4,26 b	80,89 ab	42,28 a
CN ²	8,70 b	5,85 b	0,51 a	4,75 a	5,26 a	100,0 a	42,03 a
CV (%)	31,56	37,32	21,78	20,04	17,90	24,70	3,39

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹ SN-sem nitrogênio, ² CN-com nitrogênio.

Para o NN, os tratamentos inoculados com as estirpes UFLA 3-84, UFLA 3-164 e o INPA 3-11B apresentaram as maiores médias, indicando que estas estirpes apresentam boa competitividade com a população nativa de rizóbios. Tal comportamento também verificado por Sousa (2017) que cultivou feijão-caupi em solos de Cruz das Almas e de Maragogipe, BA. Plantas de feijão-caupi cultivar BR Mulato inoculado com as estirpes UFLA 3-84 e INPA 3-11B apresentaram valores de NN e MNS superiores ($p < 0,05$) a testemunha adubada com N mineral (70 kg ha⁻¹) (Soares et al., 2006). O NN e MNS produzidos em feijão-caupi cultivar BR 17 Gurguéia inoculado com as estirpes de INPA 3-11B, UFLA 3-84, BR 3267, UFLA 3-154 e UFLA 3-164 em Bom Jesus, PI, foram similares ($p < 0,05$) a testemunha sem N e superior a testemunha com N mineral (70 kg ha⁻¹) (Costa et al., 2011). Porém no trabalho de Guedes et al. (2010), os resultados diferem aos encontrados neste estudo, uma vez que o efeito da inoculação no cultivar NOVA ERA e verificaram uma semelhança entre os tratamentos inoculados (BR3267, INPA 3-11B e UFLA 3-84) e a testemunha com N mineral (70 kg ha⁻¹) não somente para o NN, como também para a MNS. Isto ocorre devido a presença de populações nativas de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio eficientes, características genéticas, condições edafoclimáticas e interação entre cultivares e estirpes de bactérias.

Quanto a MNS (Tabela 1) foi verificado que o tratamento testemunha com N mineral apresentou a menor média entre os tratamentos. Isto comprova a inibição da adubação nitrogenada sobre a nodulação de feijão-caupi, fato relatado em outros estudos com feijão-caupi em condições de campo (Martins et al., 2013).

Em relação a MRS (Tabela 1), as maiores médias foram obtidas com os tratamentos inoculados com as estirpes UFLA 3164 e UFRB FA51B1 e o controle sem fonte de N, os quais não diferiram do tratamento com N mineral. O aumento da massa de raízes das plantas é de grande importância, pois proporcionam também maiores sítios de nodulação. Para a massa de parte aérea (MPAS) e total (MTS) seca (Tabela 1), não houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos inoculados e a testemunha sem N mineral e inoculação. O controle com N mineral foi superior aos demais tratamentos, seguidos das estirpes, UFLA 3-84 e INPA 3-11B, da estirpe em fase de seleção, UFLA 3-164, da nova estirpe UFRB FA51B1 e do tratamento sem nenhuma fonte de N. Plantas de feijão-caupi, cultivar EPACE 10, cultivadas em vasos com solo, adubadas com N, apresentaram um valor médio de 4,2 e 5,9 g planta⁻¹ para a MPAS e MTS, respectivamente (Sousa, 2017). Para os cultivares BR 17 Gurguéia e BRS Guariba também cultivados em solos com adubação nitrogenada obtiveram um valor médio de MPAS de 5,14 e 5,70 g planta⁻¹, respectivamente (Costa et al., 2014). Assim, infere-se que o feijão-caupi quando inoculado com bactérias diazotróficas pode apresentar valor de massa da parte aérea seca menor ou semelhante ao tratamento que recebeu adubação nitrogenada.

Para a EFCN (Tabela 1), o tratamento UFLA 3-84 foi a que mais induziu eficiência. O controle com N mineral foi superior aos demais tratamentos e não houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos inoculados e a testemunha sem N, isso infere que a simbiose do feijão-caupi com as estirpes utilizadas e com a população nativa de rizóbios foram eficientes no fornecimento de nitrogênio à cultura. A falta de diferença entre os tratamentos inoculados e o tratamento sem N mineral demonstra a capacidade da população nativa em estabelecer simbiose com feijão-caupi, leguminosa considerada promíscua (Lira Júnior et al., 2017).

A massa de raiz e parte aérea seca reduziram linearmente em resposta ao acréscimo dos níveis de desfolha (Tabela 2). Obteve-se em média 0,7 e 4,4 g planta⁻¹ na ausência de desfolhas 0,4 e 3,3 g planta⁻¹ para o nível de 100% de desfolha, o que corresponde a 41,26 e 24,43% de redução, respectivamente. Desfolhas acima de 75% de dano reduz drasticamente a massa seca de raiz no cultivar EPACE 10, afetando o sistema

radicular das plantas (Santos & Mendes, 1997). O baixo valor para estas variáveis nos níveis mais drásticos de desfolha, deve-se possivelmente ao maior gasto das reservas armazenadas nas raízes para o estabelecimento da área foliar para voltar a produzir fotossimilados para a manutenção da planta.

Tabela 2. Variáveis da fase vegetativa em função dos níveis desfolha artificial realizada no cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EPACE 10 aos 25 dias após a semeadura

Variável	Desfolha (%)					Equação	R ²	Nível Ótimo (%)	Valor estimado
	0	25	50	75	100				
MPAS* (g planta ⁻¹)	4,4	3,8	3,7	3,6	3,3	y= -0,006x + 4,152**	0,63	0,0	4,1
MSR (g planta ⁻¹)	0,7	0,5	0,5	0,4	0,4	y= -0,0027x + 0,635**	0,89	0,0	0,6
EFCN (%)	108,9	76,8	70,7	79,9	75,6	y= 0,008x ² -1,063x + 105,211**	0,82	66,4	69,9
CLA	42,1	41,9	42,2	42,1	40,0	y= -0,0004x ² +0,029x + 41,89**	0,82	36,2	42,4

*MPAS: massa de parte aérea seca; MRS: massa de raiz seca; EFCN: eficiência relativa; CLA: clorofila a

Houve efeito ($p < 0,05$) da interação entre os tratamentos nitrogenados e os níveis de desfolha artificial para a variável clorofila total e clorofila b (Tabela 3), em que os tratamentos inoculados apresentaram comportamento semelhante. Quando a planta foi inoculada com as estirpes UFLA 3-164 e UFRB FA51B1 apresentaram tolerância quando submetido aos níveis de desfolha artificial de 26 e 40%, tendo um valor estimado de 68,5 e 70,5 para a variável clorofila total. Já para a clorofila b, a UFLA 3-164 e UFRB FA51B1 demonstraram uma tolerância de 27 e 36% de desfolha, tendo um valor estimado de 28,7 e 27,7, respectivamente. Valores inferiores foram encontrados por Sousa (2017) ao avaliar a eficiência de estirpes de bactérias diazotróficas, contudo sem a interferência do desfolhamento.

Assim, na fase vegetativa houve efeito individual das fontes de nitrogênio nos componentes de produção do feijão caupi conforme relatado na literatura (Costa et al., 2011; Costa et al., 2014; Souza, 2017) assim como da desfolha artificial. As interações entre os tratamentos estudados ocorreram para as variáveis clorofila B e total em que em maiores desfolhas (30%) o isolado em fase de seleção UFRB FA51B proporcionou maiores médias para estas variáveis.

No segundo ensaio em que a desfolha artificial foi realizada aos 45 dias após o plantio, houve uma redução significativa e linear em função do aumento do nível de desfolha para a variável número de vagem (NV) (Tabela 4). Tal comportamento já foi relatado para o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) verificou-se que a perda da área foliar

afeta os componentes de rendimento, tendo o número de vagens por planta o mais influenciado (Moura, 1999).

Tabela 3. Clorofila total e clorofila b do cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EPACE 10 em função dos níveis de desfolha realizada aos 25 dias após o plantio SN¹- sem nitrogênio; * e** - coeficiente significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente

Clorofila total (CLT)										
Fonte de nitrogênio	Nível de Desfolha (%)					Equação	R ²	Nível ótimo (%)	Valor estimado	
	0	25	50	75	100					
UFLA 3-164	69,9	70,6	71,9	64,2	58,8	$y = -0,0022x^2 + 0,1154x + 69,844^{**}$	0,92	26,2	68,5	
UFLA 3-84	70,1	67,8	67,8	65,9	59,1	$y = 0,0957x + 70,940^{**}$	0,80	0,0	70,9	
UFRB FA51B1	65,0	72,4	70,0	65,9	62,4	$y = -0,0026x^2 + 0,2110x + 66,22^{**}$	0,79	40,6	70,5	
Clorofila b (CLB)										
Fonte de nitrogênio	Nível de Desfolha (%)					Equação	R ²	Nível ótimo (%)	Valor estimado	
	0	25	50	75	100					
SN ¹	24,4	27,6	25,4	26,6	22,6	$y = -0,0012x^2 + 0,1069x + 24,694^*$	0,71	44,5	27,0	
UFLA 3-84	27,2	25,9	26,1	24,2	20,1	$y = -0,063x + 27,88^{**}$	0,80	0,0	27,9	
UFLA 3-164	27,3	28,5	29,11	23,0	20,25	$y = -0,0016x^2 + 0,0875x + 27,503^{**}$	0,91	27,3	28,7	
UFRB FA51B1	24,7	29,5	27,3	23,02	22,0	$y = -0,0015x^2 + 0,1087x + 25,710^{**}$	0,71	36,2	27,7	

Já as variáveis número de vagens e peso de grãos recebem influência apenas de desfolhas severas (100%) em feijão-caupi cultivar BR 17 Gurguéia (Moura et al., 2014).

Tabela 4. Variáveis de produção em função dos níveis desfolha artificial do cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EPACE 10 realizada aos 45 dias após o plantio

Variável	Desfolha (%)					Equação	R ²	Nível Ótimo (%)	Valor estimado
	0	25	50	75	100				
NV* (número g planta ⁻¹)	1,7	1,5	1,4	1,3	1,3	$y = -0,0040x + 1,641^{**}$	0,88	0,0	1,6
MVS (g planta ⁻¹)	1,6	1,9	1,6	1,6	1,1	$y = -0,0001x^2 + 0,0073x + 1,689^{**}$	0,94	36,5	1,8
CV (cm planta ⁻¹)	14,8	16,6	15,9	14,9	13,7	$y = -0,0007x^2 + 0,0574x + 15,063^{**}$	0,87	41,1	16,2

*NV: número de vagem; MSV: massa seca de vagem; CV: comprimento de vagem

Houve efeito individual dos níveis de desfolha para as variáveis massa de vagem seca (MVS) e comprimento de vagem (CV) (Tabela 4). Quanto à MVS, o nível máximo de

desfolha foi de 36,5% que possibilitou uma produção de 1,8 g planta⁻¹. Para o CV, o valor máximo estimado foi de 16,2 cm planta⁻¹ para o nível de 41,1 % de desfolha.

Tabela 5. Número de grãos do cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EPACE 10 em função dos níveis de desfolha realizada aos 45 dias após plantio. CN- com nitrogênio; ** - coeficiente significativo a 1% de probabilidade

Fonte de nitrogênio	Nível de Desfolha (%)					Equação	R ²	Nível ótimo (%)	Valor estimado
	0	25	50	75	100				
CN	10,0	10,2	10,7	6,5	5,2	y= -0,045x+11,00**	0,66	0,0	11,0
UFLA 3-84	9,5	8,2	9,5	7,5	5,5	y= -0,035x + 9,800**	0,69	0,0	9,8
UFRB FA51B1	8,2	10,7	7,7	8,2	3,7	y= -0,0012x ² + 0,0740x + 8,550**	0,82	30,8	9,7

Houve efeito ($p < 0,05$) da interação entre os tratamentos nitrogenados e os níveis de desfolha artificial para a variável número de grãos (NG) (Tabela 5). Os tratamentos inoculados com estirpes de bactérias diazotróficas apresentaram comportamento distinto quanto ao NG, sendo que os tratamentos testemunha sem N mineral e inoculação e UFLA 3-164 não apresentaram diferença ($p < 0,01$). Quando a planta foi inoculada com a estirpe UFRB FA51B1 apresentou o valor máximo de NG de 9,7 grãos vagem⁻¹ para o nível de 30,8% de dano. Para os tratamentos CN e o inoculado com a estirpe UFLA 3-84 foram verificadas respostas lineares em função do aumento do nível de desfolha. Plantas de feijão-caupi, cultivar BR Gurguéia, quando submetidos aos níveis de desfolha artificial (0, 25, 50, 75 e 100%), não apresentaram diferença ($p < 0,05$) na variável número de grãos produzidos por vagem (Moura et al., 2014). Dessa forma, nota-se que o feijão-caupi inoculado com estirpes de bactérias diazotróficas apresentou tolerância na fase reprodutiva em ambiente protegido, podendo ser realizados ensaios de campo para avaliar o comportamento das estirpes em destaque.

CONCLUSÃO

1. Na fase vegetativa houve efeito individual das fontes de nitrogênio e da desfolha artificial nos componentes de produção do feijão caupi (cultivar Epace 10).
2. Na fase vegetativa o cultivar apresenta maior índice de clorofilas B e total em 40 e 36 % de desfolha, quando inoculado com o isolado em fase de seleção UFRB FA51B.

3. Na fase reprodutiva o cultivar de feijão-caupi apresenta até 30% de tolerância a desfolha artificial em ambiente protegido, quando inoculado com o isolado em fase de seleção UFRB FA51B1.

REFERÊNCIAS

- Brasil. Instrução Normativa n. 13 de 24 de marco de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.58, 25 mar.2011. <http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?>. 29 de nov. 2017.
- Campos, F. L.; Freire, F. F. R.; Lopes, A. C. de A.; Ribeiro, V. Q.; Silva, R. Q. B.; Rocha, de M. R. Ciclo fenológico em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp): uma proposta de escala de desenvolvimento. **Revista Científica Rural**. v.5, n.2, p.110-116, 2000.
- Costa, E. M.; Nóbrega, R. S. A.; Martins, L. V.; Amaral, F. H. C.; Moreira, F. M. S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.1, p.17, 2011.
- Costa, E. M.; Nóbrega, R. S. A.; Silva, A. F. T.; Ferreira, L. V. M.; Nóbrega, J. C. A.; Moreira, F. M. S. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.9, n.4, 2014.
- Costa, E. M. D.; Carvalho, F. D.; Nóbrega, R. S. A.; Silva, J. S.; Moreira, F. M. D. S. Bacterial strains from floodplain soils perform diferente plant-growth promoting processes and enhance cowpea groth. **Scientia Agrícola**, v.73, n.4, p.301-310, 2016.
- Ferreira, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- Ferreira, L. de V. M.; Nóbrega, R. S. A.; Nóbrega, J. C. A.; Aguiar, F. L. de; Moreira, F. M. de S.; Pacheco, L. P. Biological nitrogen fixation in production of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, family farming in Piauí, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v.5, p.153-160, 2013.
- Fred, E. B.; Wakman, S.A. Laboratory manual of general microbiology. **New York:** McGraw-Hill Book Company, p.143, 1928.

Gualter, R. M. R.; Boddey, R. M.; Rumjanek, N. G.; Freitas, A. C. R.; Xavier, G. R. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré Amazônia maranhense. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.46, n.3, p.303-308, 2011.

Guedes, G. N.; Souza, A. S.; Lima, A. S.; Alves, L. S. Eficiência agrônômica de inoculantes em feijão-caupi no Município de Pombal-PB. **Revista Verde**, v.5, n.4, p. 82-89, 2010.

Lira Júnior, M. A. L.; Fracetto, G. G. M.; Araújo, A. S. F.; Fracetto, F. J. C.; Nóbrega, R. S. A.; Silva, K.; Galdino, A. C. Rhizobial diversity for tropical pulses and forage and tree legumes in Brazil. In: Zaidi, A.; Khan, M. S.; Musarrat, J. (Org.). **Microbes for legumes improvement**. Springer, 2017. p. 135-151.

Moura, G. de M. Efeito do desfolhamento no rendimento do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.1, p.57-62,1999.

Moura, J. Z. Pádua, L. E. M.; Moura, S. G; Ribeiro, N. W. S. M.; Silva, P. R. R. Nível de dano econômico para insetos desfolhadores em feijão-caupi. **Revista Caatinga**, v.27, n.3, p.239-246, 2014.

Martins, R. N. L.; Nóbrega, R. S. A.; Silva, A. F. T.; Nóbrega, J. C. A.; Amaral, F. E. C.; Costa, E. M.; Lustosa Filho, J. F. L.; Martins, L. V. Nitrogênio e micronutrientes na produção de grãos de feijão-caupi inoculado. **Revista Semina**, v.34, n.4, p.1577-1586, 2013.

Ribeiro, A. T.; Guimarães, P. T. G.; Alvarez, V. H. **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5ª Aproximação. Viçosa: CFSEMG, 1999. 359p.

Santos, J. H. R.; Mendes S. P. Efeito da desfolha sobre a distribuição de matéria seca em *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Epace 10: Um enfoque na perspectiva das pragas desfolhadoras. **Revista Caatinga**, v.10, n.1-2, p.7-21, 1997.

Silva, A. L.; Veloso, V. R. S.; Crispim, C. M. P.; Braz, V. C.; Santos, Carvalho, M. P. Avaliação do efeito da desfolha na cultura do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.32, n.2, p.83-87, 2003.

Soares, A. L. L.; Ferreira, P. A. A.; Pereira, J. A. R.; Vale, H. M. M. D.; Andrade, M. J. B. D.; Moreira, F. M. D. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade

de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v.30, p.795-802, 2006.

Soares, B.L.; Ferreira, P.A.A.; Oliveira, L.S.M.D.; Marra, L.M.; Rufini, M.; Andrade, M.J.B.D.; Moreira, F.M.D.S. Cowpea sybiotic efficiency, pH and aluminium tolerance in nitrogen-fixing bacteria. **Scientia Agrícola**, v.71, n.3, p.171-180, 2014.

Sousa, J.X. **Promoção do crescimento vegetal por bactérias oriundas de solos com histórico de deposição de manipueira**. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017. 61p. Dissertação Mestrado.

Zilli, J. É.; Marson, L. C.; Marson, B. F.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Revista ACTA Amazônica**, v.39, n.4, p.749-758, 2009.