



Ciências Agrária

Eficiência Simbiótica de Rizóbios em Feijão Guandu em Casa de Vegetação

Luíz de Moura Neto¹, Enilson Luiz Saccol de Sá², José Renato Pereira Cavallazzi³,
Cláudia Majolo⁴, Everton Rabelo Cordeiro⁵, Aleksander Westphal Muniz⁶

Resumo

O feijão-guandu é uma leguminosa importante tanto no uso de alimentação animal quanto para recuperação de áreas degradadas. Em alguns países também é usada como alimento humano. Essa leguminosa faz simbiose com rizóbios, que fixam biologicamente o nitrogênio. Dessa forma, a seleção de rizóbios eficientes permite a maximização da fixação biológica de nitrogênio. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica de diferentes rizóbios para feijão-guandu em casa de vegetação. Para isso, foram utilizadas culturas-armadilha com diferentes tipos de solo e usando feijão-guandu como planta hospedeira. Em seguida, os nódulos obtidos das culturas-armadilha foram utilizados no isolamento de rizóbios em meio ágar-manitol-levedura. Os rizóbios isolados foram incubados em estufa bacteriológica para caracterização morfológica (forma, elevação, consistência, modificação de pH) e bioquímica (gram, catalase, oxidase, solubilização de fosfato, produção de ácido indolacético). A avaliação da eficiência simbiótica foi realizada em casa-de-vegetação em um experimento completamente casualizado com quatro repetições. Nesse experimento também foram utilizadas duas testemunhas com e sem nitrogênio mineral. Os resultados demonstraram que a maioria dos isolados foram oxidase negativa, catalase positiva, acidificam o meio de cultura, solubilizaram fosfato e apresentaram crescimento rápido. Todos os isolados apresentaram forma circular, elevação plana, borda inteira superfície lisa e cor opaca. E ainda, os isolados E11919, E11819, E10119, E11519 promoveram uma maior nodulação (número e massa de nódulos), produção de massa seca da parte aérea em feijão-guandu. Conclui-se que os isolados E11919, E11819, E10119, E11519 apresentam maior eficiência e eficácia simbiótica.

Palavras-Chave: Fixação biológica de N, auxinas, solubilização de fosfato.

Rhizobia symbiotic efficiency in Pigeonpea in greenhouse. Pigeonpea is an important legume both in the use of animal feed and for the recovery of degraded areas. This legume is symbiotic with rhizobia, which biologically fix nitrogen (BNF). Thus, the selection of efficient rhizobia allows the maximization

¹ Engenheiro Florestal, Mestrando INPA, luizmouraneto@yahoo.com.br

² Prof Titular, Engenheiro Agrônomo, Depto de Solos da UFRGS, enilson.sa@ufrgs.br

³ - Professor Adjunto, UFAM, jrpcavallazzi@yahoo.com.br

⁴ Analista A, Química, Embrapa, claudia.majolo@embrapa.br

⁵ Pesquisador, Engenheiro Agrônomo, Embrapa, everton.rabelo@embrapa.br

⁶ Pesquisador, Engenheiro Agrônomo, Embrapa, aleksander.muniz@embrapa.br



of this BNF. Thus, the objective of this work was to evaluate the symbiotic efficiency of different rhizobia strains for pigeonpea in the green house. For this purpose, trap crops with different types of soil were used and pigeonpea were used as host plants. Then the nodules obtained from the trap cultures were used in the strain isolation in Yeast-Mannitol-Agar. The strains were incubated in a bacteriological incubator for morphological (shape, elevation, consistency, pH modification) and biochemical (GRAM, catalase, oxidase, phosphate solubilization, indolactic acid production) characterization. The symbiotic efficiency's evaluation was performed in a completely randomized experiment with four repetitions. Two controls with and without mineral nitrogen were also used in this experiment. The results showed that most strains were oxidase negative, catalase positive, acidify the culture medium, solubilize phosphate and show rapid growth. All strains were circular in shape, flat on the surface, smooth on the entire edge and opaque in colour. Furthermore, E11919, E11819, E10119, E11519 strains promoted greater nodulation (number and mass of nodules), the production of dry mass from the aerial part in water beans. It is concluded that the strains E11919, E11819, E10119, E11519 are more efficient and symbiotic.

Keywords: Biological N fixation, auxins, phosphate solubilization

1. Introdução

A preocupação com as questões ambientais gerou muita discussão no setor agrícola (Guimarães et al., 2016). A falta de práticas de preservação e manejo inadequado do solo estão causando problemas de fertilidade, levando à degradação das áreas existentes e à abertura de novas áreas, causando impactos ambientais negativos (Pott et al., 2007).

A perda de fertilidade do solo leva à deficiência de nutrientes, incluindo a de nitrogênio, que é essencial para o desenvolvimento das culturas (Guareschi et al., 2011). O nitrogênio mineral é um importante nutriente, quando usado de maneira inadequada, pode causar diversos danos ambientais. Seu uso adequado é importante para reduzir os custos de produção e os níveis de poluição ambiental (Guimarães et al., 2010).

Uma vez que os fertilizantes constituem um dos principais insumos de produção e são dispendiosos, a

exploração da potencialidade de rendimento dessa cultura depende de quão eficaz e eficiente esse insumo é gerenciado. Além disso, os altos níveis de fertilidade não apenas causam um pesado ônus financeiro aos produtores, como também tem menor eficiência de uso, além de teores baixos, variáveis e geralmente desequilibrados de nutrientes. (Kumar e Rana, 2007). Por outro lado, o uso contínuo de orgânicos ajuda a acumular húmus do solo e micróbios benéficos, além de melhorar as propriedades físicas do solo. (Singh, 2007).

O governo brasileiro prometeu reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) entre 36,1 e 38,9%, com base nas emissões projetadas para 2020 (3.236 milhões de toneladas de CO₂ equivalente) (Mendonça et al., 2016). No que diz respeito ao setor agrícola, a expectativa é reduzir as emissões em 730 milhões de toneladas de CO₂ equivalente até 2020. Uma das ações envolvidas é a expansão da



fixação biológica de N (FBN) para 5,5 milhões de hectares de terra cultivada para substituir o uso de fertilizantes nitrogenados (Brasil, 2010). No entanto, para culturas em que não é possível depender totalmente da FBN, o uso de leguminosas é uma alternativa para substituir ou suplementar a fertilização mineral com N (Ambrosano et al., 2005).

Considerando que as estimativas de produção, distribuição e aplicação de 1 kg de N-fertilizante correspondem a 4,5 kg de CO₂ equivalente emitido para a atmosfera (Oliveira et al., 2014), a FBN possui considerável potencial para uso mais amplo na agricultura brasileira. Além disso, a baixa recuperação do N nos fertilizantes (Cantarella, 2007), destaca a necessidade de buscar alternativas que possibilitem o uso de insumos locais sem afetar a produção agrícola (Perez et al., 2004). Assim, o uso de leguminosas que podem eficientemente facilitar a FBN, pode contribuir para a viabilidade econômica e sustentabilidade dos sistemas de produção de café, reduzindo a necessidade do uso de N sintético (Brito et al., 2009; Guimarães et al., 2016).

A deficiência de nitrogênio (N) é um fator importante que limita a produtividade de sistemas baseados em milho em pequenas plantações agrícolas no sudeste da África (Mangho et al., 2017). As leguminosas fixam biologicamente a atmosfera da atmosfera em formas inorgânicas que podem ser usadas pelas plantas (Giller, 2001). A fixação biológica de nitrogênio é importante para os pequenos agricultores, já que é uma fonte relativamente barata de N, comparada aos fertilizantes inorgânicos, menos propensos a

perdas por lixiviação e desnitrificação. (Hauggaard-Nielsen et al., 2008).

De acordo com Macedo et al. (2008), o feijão-guandu (*Cajanus cajan*) é uma ótima e eficiente leguminosa para consórcio com cana para fornecimento no inverno. Uma vez que possui alta capacidade de fixação de nitrogênio, e é capaz de fornecê-lo para adubação da cana-de-açúcar e ser fornecido aos animais no período da seca, picado juntamente com a cana. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica de diferentes rizóbios para feijão guandu em casa de vegetação.

2. Materiais e Métodos

Coleta de solo

Foram coletadas amostras de solo ao acaso na estação experimental do Caldeirão em áreas de Terra Preta de Índio (TPI) e Terra Mulata (TM) em Iranduba, AM (03° 17' 05'' S; 60° 11' 10'' W). A amostragem foi realizada em TPI em áreas com floresta secundária e cultivada com milho e em áreas de TM com cultivo de milho e seringueira. Foram coletadas três repetições em cada ambiente, e cada repetição era composta por 5 pontos distantes por 5 metros entre eles. (Figura 1).

Culturas-armadilha

As amostras de solo foram utilizadas na preparação de culturas-armadilha usando feijão-guandu como planta hospedeira. O solo utilizado nesse procedimento foi destorroado e peneirado em malha de 2 mm. Em seguida, procedeu-se a semeadura para cada tipo de solo e uso da terra. A verificação da nodulação foi realizada após um período de 30 dias. Durante esse período foi aplicado solução nutritiva de Franco e Dobreiner (1967) sem nitrogênio.

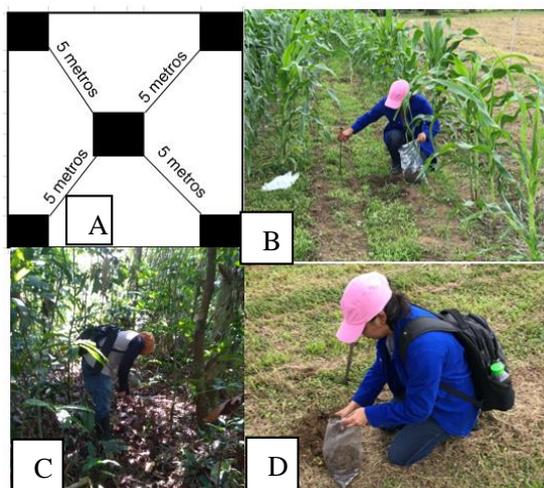


Figura 1 – A) esquema de coleta; B) Plantio de milho na terra-mulata; C) Floresta secundária com Terra Preta de Índio; D) Plantio de mandioca com terra-mulata.

Isolamento de rizóbios

Os nódulos foram coletados das raízes da planta hospedeira das culturas-armadilha. Em seguida, esses nódulos foram lavados em álcool a 70% e água estéril. Após esse procedimento, o nódulo foi macerado sobre uma placa de Petri contendo meio ágar-manitol-levedura (Vincent, 1970).

Em seguida, com o auxílio de uma alça de platina foi realizada a inoculação nesse meio de cultura. Em seguida, a placa de Petri inoculada foi colocada em estufa bacteriológica a 30°C por até 7 dias. Posteriormente, foi verificado o crescimento das colônias bacterianas e realizado uma nova inoculação em novas placas de Petri e tubos de ensaio.

Os isolados em tubo de ensaio foram mantidos e conservados em geladeira a 8°C. Uma parte desses tubos foi coberto por uma camada de óleo mineral estéril a fim de diminuir o crescimento bacteriano e conservar o isolado por um período mais longo de tempo (Rhodes, 1957; Costa e Ferreira, 1991; Romeiro, 2006).

Caracterização morfológica dos isolados e testes bioquímicos

Os rizóbios isolados foram inoculados em meio ágar-manitol-levedura (AML) contendo azul de bromotimol como indicador, onde a mudança de coloração indicou a acidificação ou alcalinização do meio de cultura.

Assim, os isolados que acidificaram o meio foram classificados como de crescimento rápido e os que alcalinizaram como de crescimento lento (Martins *et al.*, 1997).

O crescimento das colônias também foi classificado conforme o tempo de incubação em rápido (até 3 dias), intermediário (3 a 5 dias), moderado (5-9 dias) e lentas (≥ 10 dias). Também foram realizadas as provas bioquímicas para catalase e oxidase (Atlas, 2010; Tonne, 2011). E por último, foi realizada a coloração de Gram (Bartholomew *et al.*, 1965). (Figura 2).

Solubilização de fosfato

A solubilização de fosfato foi avaliada por meio da inoculação dos isolados em placas de Petri contendo meio AML com 0,1% de fosfato tricálcico $[Ca_3(PO_4)_2]$. Após uma semana de incubação a solubilização de fosfato foi observada pela presença de halo transparente formado em torno da colônia de rizóbios (Berraquero *et al.*, 1976).

Produção de Auxinas

A produção de ácido indolacético (AIA) foi determinada inoculando os isolados de rizóbios em meio AML com triptofano (50 mg/L) durante um período de incubação de 72 horas em estufa bacteriológica a 28-30°C sob agitação a 120 rpm.

Após a incubação, foi adicionado o reagente de Salkowski

ao meio de cultura e mensurada a produção de AIA usando espectrofotômetro com comprimento

de onda de 535 μm (Asghar *et al.*, 2002). A produção de auxina é mostrada na Figura 3.

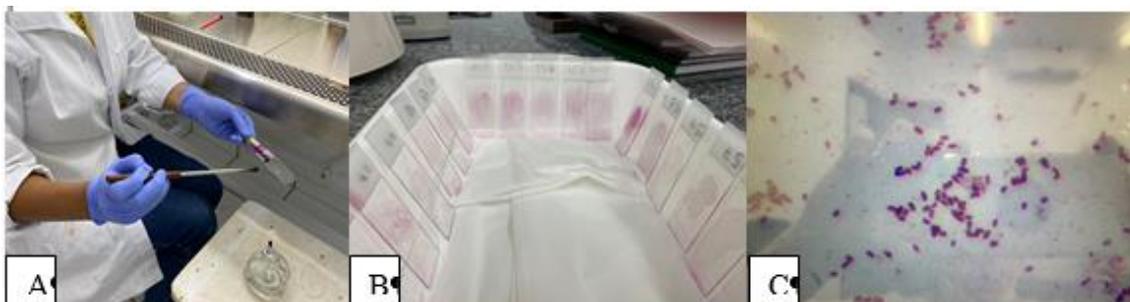


Figura 2 - A) teste de catalase e oxidase; B) lâminas para leitura do teste de coloração de Gram; C) bacilos na cor rosa mostrando a reação do meio



Figura 3 - A) cubetas utilizadas no teste de produção de auxinas; B) curva-padrão com ácido indolacético; C) espectrofotômetro utilizado.

Avaliação da eficiência simbiótica

A eficiência simbiótica foi avaliada em um experimento em casa-de-vegetação. Esse experimento utilizou um delineamento completamente casualizado com quatro repetições. O feijão-guandu foi semeado em recipientes plásticos (500 mL) com areia e vermiculita estéril (2:1 v/v).

A inoculação das plantas foi realizada com 1 mL de meio de cultura líquido contendo o isolado em fase de crescimento exponencial. Foram utilizados dois tratamentos controle, com e sem adição de nitrogênio. O tratamento com nitrogênio utilizou 160 mg N. L⁻¹ parcelado semanalmente. As avaliações de massa seca da parte aérea e nodulação (número e massa de nódulos) ocorreram 45 dias após a

semeadura. Durante esse período, as plantas receberam a solução nutritiva de Norris sem nitrogênio (Norris e Date, 1976). A eficiência e a eficácia simbiótica foram obtidas pelas fórmulas (Faria e Franco, 2002):

$$\text{Eficiência (\%)} = \left(\frac{\text{MSPA trat}}{\text{MSPA TSN}} \right) \times 100 ;$$

$$\text{Eficácia} = \left(\frac{\text{MSPA trat}}{\text{MSPA TCN}} \right) \times 100$$

Em que MSPA trat= massa seca da parte aérea do tratamento inoculado; MSPA TSN= massa seca do tratamento sem nitrogênio; e MSPA TCN= massa seca do tratamento com nitrogênio.

Análise de resultados

Os resultados obtidos para caracterização fenotípica foram submetidos a análise descritiva, enquanto os dados de produção de auxinas e eficiência simbiótica foram



Ciências Agrária

submetidos a análise de variância e ao teste de separação de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que 95% dos isolados foram oxidase negativa enquanto 85% foram catalase positiva. A produção de oxidase por apenas 5% dos isolados divergiu de outros estudos, onde a grande maioria apresenta essa característica (Sadowsky et al., 1983; Nagalingam et al., 2020).

Já a produção de catalase foi comum em outros estudos com a soja nos Estados Unidos e em feijão-guandu na Índia, onde todos os isolados apresentaram essa característica (Sadowsky et al., 1983; Nagalingam et al., 2020). Essa produção de catalase ocorreu na sobrevivência de rizóbios durante períodos de seca (Goyal et al., 1986; Boumahdi et al., 1999; Hussain et al., 2014).

Com relação a mudança do pH do meio, observou-se que destes isolados: 55% acidificaram, 45% alcalinizaram e 5% mantiveram o pH neutro. A acidificação do meio foi diferente da observada no estado de Sergipe com diferentes rizóbios para feijão-guandu, onde 81% dos isolados acidificaram o meio de cultura (Fernandes e Fernandes, 2000). No entanto, outros estudos relataram que os isolados de rizóbio para *Cajanus cajan* podem acidificar, alcalinizar ou não alterar o meio cultura (Fernandes et al., 2003).

A modificação de pH em meio de cultura ágar-manitol-levedura (AML), foi uma característica para distinção dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* que possuem a propriedade de tornar o meio de cultura ácido, enquanto

Azorhizobium e *Bradyrhizobium* tornam o meio alcalino (Lima et al., 2012).

Esta alteração de pH promovida pelo rizóbio no meio AML foi em decorrência do uso preferencial de açúcares como a galactose utilizada por rizóbios de crescimento rápido, enquanto nos rizóbios de crescimento lento ocorreu a excreção de ácidos orgânicos e compostos nitrogenados resultando na liberação de cátions (Coutinho et al., 1999; Martins et al., 1997). Em relação à velocidade de crescimento, 18 (90%) foram considerados rápidos, e nenhum apresentou crescimento além do 7º dia.

Esses resultados foram similares aos obtidos por Degefu et al., (2018), que observaram somente rizóbios de crescimento rápido e moderado. A maioria de rizóbios de crescimento rápido obtidas nesse trabalho corroborou os estudos de Pereira (2000) e Chagas-Júnior (2007, que também observou rizóbios com as mesmas características de crescimento e que acidificaram o meio.

Os rizóbios isolados apresentaram forma circular, elevação plana, borda inteira superfície lisa e cor opaca. Martins et al., (1997) observou que geralmente as estirpes de rizóbios, independente da forma da colônia, possuem borda lisa ou inteira. A maioria dos isolados obtidos (75%) foram caracterizados como gram negativos. De acordo com Zakhia e Lajudie (2001), o gênero *Rhizobium* foi descrito como bactérias gram-negativas, aeróbias, com capacidade de infectar as leguminosas.

Dentre os isolados, 13 (65%) foram caracterizados como solubilizadores de fosfato, e dentre



Ciências Agrária

esses 8 apresentaram acidificação do meio (Tabela 1). A capacidade dos isolados de rizóbios solubilizarem o fosfato de cálcio foi relacionada com a diminuição do pH do meio pelos

ácidos orgânicos produzidos (Mikanova & Kubat, 1999; Mikanova, 2000; Mikanová; Nováková, 2002; Hara;Oliveira, 2005).

Tabela 1 - Características morfológicas, bioquímicas e solubilização de fosfato de rizóbios isolados em Iranduba, AM.

Isolado	Oxi	Cat	pH	Forma	Elevação	Borda	Superfície	Cor	Consistência	VC	Gram	Sol.
E10119	-	-	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Viscosa	Rap	-	+
E10219	-	+	Al	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Butirosa	Rap	-	-
E10319	-	+	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Gomosa	Int	-	-
E10419	-	-	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Viscosa	Rap	-	+
E10519	-	+	Al	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Aquosa	Rap	-	-
E11519	-	+	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Butirosa	Rap	-	-
E11719	-	+	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Aquaosa	Rap	+	-
E11819	-	+	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Butirosa	Mod	+	+
E11919	-	+	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Butirosa	Rap	+	+
E12019	-	+	Al	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Butirosa	Rap	-	+
E12119	-	+	Al	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Butirosa	Rap	-	+
E12219	-	+	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Butirosa	Rap	+	+
E12319	+	+	Al	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Butirosa	Rap	-	+
E12419	-	+	Al	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Butirosa	Rap	-	-
E12619	-	+	Al	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Viscosa	Rap	+	+
E12719	-	+	Al	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Gomosa	Rap	-	-
E14319	-	+	Al	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Viscosa	Rap	-	+
E14419	-	+	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Viscosa	Rap	-	+
1119	-	-	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Gomosa	Rap	-	+
1120	-	-	Ac	Circ	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Gosmosa	Rap	-	+

Oxi= oxidase; Cat= catalase; Ac=ácido; Al= alcalino; Circ= circular; Sol= solubilização de fosfato; Rap= rápida; Int= intermediária; Mod= Moderada.

Não foram observadas diferenças entre os isolados na produção de ácido indolacético (Tabela 2). Essa produção de ácido indolacético (AIA) também foi verificada em outros rizóbios isolados na região amazônica na cultura do feijão-caupi (Chagas-Junior et al., 2009). Tal produção de AIA indicou em outros trabalhos que pode

contribuir com a absorção de nutrientes pelas raízes como em *Azospirillum* contribuiu na absorção de nutrientes pelas raízes (Dobbelaere et al., 1999).

Os isolados E11919, E11819, E10119, E11519, E126198 e E11719 apresentaram maior número de nódulos que as demais cepas testadas, mas não diferiram entre si



(Tabela 3). Entretanto, outros trabalhos evidenciaram que o número de nódulos não forneceu uma explicação para a eficiência da simbiose rizóbio-leguminosa (Freitas et al., 2011). Além disso, observou que esses nódulos podem ser pequenos e não funcionais e funcionarem como um dreno de fotoassimilados (Atkins, 1984). E ainda, muitos nódulos não representou sempre uma maior massa de nódulos (Frizzo, 2007) e não está diretamente relacionado com a produção de massa seca pela planta hospedeira (Lammel et al., 2015).

Os isolados E11919, E11819, E11519, E12119 e E12019 apresentaram maior massa de nódulos que as demais estirpes testadas, mas não diferiram entre si. Por sua vez, os isolados E10119, E12219, E12319 e E12419 foram superiores na massa de nódulos do que aos isolados E12619, E11719 e E10519. E por último, os isolados E14319 e E14419 foram inferiores as demais cepas na massa de nódulos (Tabela 3). Martins et al. (2012) também observaram resultados semelhantes relacionados a massa seca da parte aérea, número de nódulos e massa seca de nódulos. Em estudos conduzidos com isolados de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros de Sergipe, Fernandes et al. (2003) também verificaram diferenças entre os rizóbios quanto à capacidade de promover o crescimento vegetativo e nodulação das raízes de feijão guandu.

Os isolados E11919, E11819, E10119, E11519 foram os isolados que promoveram a maior produção de massa seca em feijão-guandu que os demais isolados e as testemunhas com e sem nitrogênio mineral, mas não diferiram entre si (Tabela 3). Os isolados E12219, E12619, E12119,

E14319, E12719, E10319, E12019, E10219 e E10419 apresentaram maior massa seca da parte aérea do que os isolados E11719, E10519, E12319, E14419, E12419 e TSN, mas não diferiram entre si e a TCN. Martins et al. (2012) também observou diferenças entre os isolados de rizóbios nativos do Mato Grosso do Sul e do tratamento com adição de nitrogênio.

Tabela 2 - Produção de ácido indolacético (AIA) por rizóbios de feijão-guandu isolados em Iranduba, AM.

Isolados	AIA
	-----mg/L-----
E10119	34,3 a
E10219	32,3 a
E11519	30,8 a
E11719	28,7 a
E11819	32,9 a
E10319	31,8 a
E11919	33,1 a
E12019	30,8 a
E12119	31,7 a
E12219	33,9 a
E12319	38,2 a
E12419	28,9 a
E12619	35,4 a
E12719	32,5 a
E10519	29,2 a
E14319	28,1 a
E14419	28,1 a
E10419	28,5 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

A eficiência relativa dos isolados variou de 18 a 890%. Foi observado que 70 % dos isolados foram mais eficientes que a testemunha sem nitrogênio, enquanto 30% apresentaram ineficiência. A eficácia relativa dos isolados variou de 5 a



Ciências Agrária

245%. Os resultados demonstraram que os isolados E11919, E11819, E10119, E11519 e E12219 foram os mais

eficazes do que a testemunha com nitrogênio mineral, enquanto as demais estirpes foram ineficazes.

Tabela 3 - Nodulação (número e massa de nódulos) e massa seca da parte aérea de feijão-guandu inoculado com rizóbios isolados de Iranduba, AM

Isolado	NNOD ----Número/planta)- ----	MSN _(mg) -----mg/planta-----	MSPA _(mg)	Eficiência	Eficácia
E11919	8,3 a	255,8 a	2790,0 a	890%	245%
E11819	7,8 a	255,9 a	2463,3 a	786%	216%
E10119	9,8 a	176,7 b	2217,5 a	708%	195%
E11519	8,1 a	288,2 a	2137,5 a	682%	188%
E12219	2,9 b	186,6 b	1293,3 b	413%	113%
TCN	-	-	1140,0 b	-	-
E12619	8,1 a	148,7 c	1070,0 b	341%	94%
E12119	2,9 b	221,8 a	875,0 b	279%	77%
E14319	3,7 b	122,7 d	767,5 b	245%	67%
E12719	5,1 b	59,7 e	763,3 b	244%	67%
E10319	4,6 b	12,5 e	750,0 b	239%	66%
E12019	5,2 b	252,0 a	730,0 b	233%	64%
E10219	5,8 b	35,0 e	690,0 b	220%	61%
E10419	3,9 b	10,0 e	672,5 b	215%	59%
E11719	7,2 a	162,5 c	486,7 c	155%	43%
TSN	-	-	313,3 c	-	-
E10519	2,6 b	139,5 c	252,5 c	81%	22%
E12319	4,3 b	200,9 b	190,0 c	61%	17%
E14419	4,1 b	99,3 d	190,0 c	61%	17%
E12419	3,3 b	210,6 b	56,7 c	18%	5%

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

Dentre os mais eficazes, os isolados E11919, E11819, E11519 foram provenientes do Latossolo Amarelo, enquanto as estirpes E12219 e E10119 foram oriundas de Terra Preta de Índio coletada da floresta.

4. Conclusão

Conclui-se que a maioria dos isolados de feijão-guandu testados são oxidase e catalase positivos, apresentam colônias circulares, planas com bordas inteiras e

superfície lisa. Além disso, observou-se também que esses isolados apresentam a mesma produção de ácido indolacético. E por último, que os isolados E11919, E11819, E10119, E11519 promovem uma maior nodulação (número e massa de nódulos), produção de massa seca da parte aérea em feijão-guandu e são mais eficazes do que a testemunha com nitrogênio mineral.



Ciências Agrária

Agradecimentos

Ao Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA), a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e a FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas) pelo suporte técnico e financeiro nessa pesquisa.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

Ambrosano, E.J. *et al.* 2005. Utilization of nitrogen from green manure and mineral fertilizer by sugarcane. *Sci Agric*.

Asghar, H.N.; Zahir, Z.A.; Arshad, M.; Khaliq, A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, v.35, p.231-237.

Atkins, C.A. 1984. Efficiencies and inefficiencies in the legume/ Rhizobium symbiosis - a review. *Plant and Soil*, v. 82, p. 273-284.

Atlas R.M. 2010. Handbook of Microbiological Media. 4th ed. *ASM Press*, Washington, DC.

Bartholomew, J.W.; Cromwell, T.; Gan, R. 1965. Analysis of the mechanism of Gram differentiation by use of filter paper chromatographic Technique. *J.Bacteriol*, 90:766, 1965.

Berraquero, F. R.; Baya, A. M.; Cormenzana, A. R. 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, v. 17, p. 399-406.

Brasil. Decreto 7.390, de 9 de dezembro de 2010. (Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato200

7-2010/2010/Decreto/D7390.htm). Acesso em 18 de junho de 2018.

Brito, M.M.P.; Muraoka, T.; Silva, E.C. 2009. Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de ¹⁵N. *Rev Bras Cienc Solo*. 33:895-905

Cantarella, H. 2007. Nitrogênio. Fertilidade do solo. Viçosa, MG: *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*. 375-470.

Chagas Junior, A.F. 2007. Características Agronômicas e ecológicas de Rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. *Tese: Universidade Federal do Amazonas*, Manaus. 158p.

Chagas Junior, A.F.; Oliveira, L.A. de; Oliveira, A.N. 2009. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. *Revista Ceres*. Viçosa, v56, n 6, p. 812-817, nov./dez.

Coutinho, H.L.C.; Oliveira, V.M.; Lovato, A.; Maia, A.H.N.; Manfio, G.P. 1999. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Applied Soil Ecology*. v. 13, n. 2, p. 159-167.

Degefu, T. *et al.* 2018. Morphophysiological diversity of rhizobia nodulating pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) growing in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*. Ethiopia, Vol. 17(6), pp. 167-177.

Dobbelaere, S. 1999. Phytostimulatory effect os *Azospirillum brasiliense* wild type os mutante strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*. Dordrecht, v. 212, p. 155-164.

Fernandes, M.F. *et al.* 2003. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-deporco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 38, n. 7, p. 835-842.

Ferreira, P.A.; Bomfeti, C.A.; da Silva Júnior, R.; Soares, B.L.; Soares, C.R.F.S.; Moreira, F.M.S. 2012. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 1, p. 85-95.

Guareschi, R.F. *et al.* 2011. Nodulação e crescimento vegetativo de feijão azuki (*Vigna angularis*) submetido a inoculação e adubação



Ciências Agrária

- nitrogenada. *Global Science and Technology*, Rio Verde, 4(3):75-82.
- Guimarães, S.L. *et al.* 2010. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. *Revista Caatinga*, Mossoró, 23(4):32-39.
- Guimarães, S.L. *et al.* 2016. Development of pigeon pea inoculated with *rhizobium* isolated from cowpea trap host plants. *Rev. Caatinga*, Mossoró, 29 (4): 789-795.
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A. 2005. Características Fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, n. 7, p. 667-672.
- Hauggaard-Nielsen, H.; Jørnsgaard, B.; Kinae, J.; Jensen, E.S. 2008. Grain legume-cereal intercropping: The practical application of diversity, competition and facilitation in arable and organic cropping systems. *Renew. Agric. Food Syst.* 23(1): 3-12.
- Kumar, A.; Rana, K.S. 2007. Performance of pigeonpea (*Cajanus cajan*) + greengram (*Phaseolus radiatus*) intercropping system as influenced by moisture – conservation practices and fertility level under rainfed conditions. *Ind. J. Agro.* 52(1):31-35.
- Lammel, D.R., Cruz, L.M., Mescolotti, D., Stürmer, S.L., Cardoso, E. J. 2015. Woody Mimosa species are nodulated by Burkholderia in ombrophylous forest soils and their symbioses are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *Plant and soil*, v. 393, n. 1-2, p.123-135.
- Lima, A. A.; Fernandes Júnior, P. I.; Passos, S. R.; Paulo, F. S; Nosoline, S. M.; Faria, S. M.; Guerra, J. G. M.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R. 2012. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 36, n. 2, p. 337-348.
- Macedo, R. *et al.* 2008. Pecuária leiteira com base ecológica em assentamentos rurais no Oeste do Estado de São Paulo. São Paulo, SP: *INCRA*, 41p.
- Mangho, W. G. *et al.* 2017. Biological nitrogen fixation and yield of pigeonpea and groundnut: Quantifying response on smallholder farms in northern Malawi. *African Journal of Agricultural Research*. 12(16): 1385-1394.
- Martins, L.M.V.; Xavier, R.X.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 1997. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio". Comunidade Técnico: *Embrapa*, nº 19, dez. 14p.
- Martins, N. M. *et al.* 2012. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos de Mato Grosso do Sul, inoculados em guandu. *4º Seminário de Agroecologia de Mato Grosso do Sul: 3º Encontro de Produtores de Agroecologia de MS*. Mato Grosso do Sul, 2012.
- Mendonça, E.deS. *et al.* 2016. Biological Nitrogen Fixation by Legumes and N Uptake by Coffee Plants. *Revista Brasileira Ciencia do Solo*. 2017: 41.
- Mikanova, O. 2000. Study of the P-solubilizing microorganisms and their utilization for improving plant nutrition. *Disertation Thesis*, Czech Univerzity of Agriculture Prague/ Faculty of Agronomy, Prague. p.1 – 13.
- Mikanova, O.; Kúbat, J. 1999. Practical use of P-solubilization a activity of Rhizobium species strains. *Rostlinná Výroba*, 45(9): 407-409.
- Mikanová, O.; Nováková, J. 2002. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostlinná Výroba*, v. 48, n. 9, p. 397-400.
- Norris, D.O.; Date, R.A. 1976. Legume bacteriology. Tropical pasture research: principles and methods. *Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops*, 134-174.
- Pereira, E.G. 2000. Diversidade de rizóbios isolados diferentes sistemas de uso da terra Amazônia. Tese: *Universidade Federal de Lavras*, Minas Gerais. 93p
- Perez, A.M.M. *et al.* 2004. Impactos da implementação de um sistema agroflorestal com café na qualidade do solo. *Agropec Técn.* 25: 25-36.
- Pott, C.A. *et al.* 2007. Adubação verde como alternativa agroecológica para recuperação da fertilidade do solo. *Ambiência – Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, Guarapuava, 3 (1): 51-63.



Ciências Agrária

Singh, R.S. 2007. Effect of organic and inorganic sources of nutrition on productivity of long duration pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Enviro. Eco.*, 25 (3): 768-770, 2007.

Tonne, E.J. 2011. Advances and enzymology and related áreas of molecular biology. Canada.

Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. 164 pp.

Zakhia, F.; Lajudie, P. 2001. Taxonomy of Rhizobia. *Agronomie*, Oxford, v. 21, n. 6, p. 569-576. IB Brassica juncea I Biology and Fertility of Soils-