

DIVISÃO 2 - PROCESSOS E PROPRIEDADES DO SOLO

Comissão 2.1 - Biologia do solo

DIVERSIDADE E CAPACIDADE SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE NÓDULOS DE MUCUNA-CINZA E MUCUNA-ANÃ⁽¹⁾

Andréa Aparecida de Lima⁽²⁾, Paulo Ivan Fernandes Júnior⁽³⁾, Samuel Ribeiro Passos⁽²⁾, Fernanda Santana de Paulo⁽²⁾, Sumaya Mário Nosoline⁽²⁾, Sérgio Miana de Faria⁽⁴⁾, José Guilherme Marinho Guerra⁽⁴⁾, Norma Gouvêa Rumjanek⁽⁴⁾ & Gustavo Ribeiro Xavier⁽⁴⁾

RESUMO

As espécies de mucuna são muito utilizadas como adubos verdes, e poucas informações estão disponíveis a respeito dos rizóbios nativos capazes de nodular-las. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e a capacidade simbiótica de isolados bacterianos de nódulos de mucuna-cinza (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) e mucuna-anã (*Mucuna deeringiana* (Bort.) Merr.). As bactérias foram isoladas de nódulos de mucunas cinza e anã cultivadas em vasos com solos de um sistema de produção agroecológica. Foram isoladas 160 bactérias, sendo 80 de mucuna-anã e 80 de mucuna-cinza, que foram autenticadas e selecionadas para avaliação da capacidade simbiótica. A diversidade dos isolados foi avaliada por meio das características culturais em meio de cultura YMA e da técnica de análise de restrição do produto de PCR do gene 16S rDNA. A inoculação de cinco isolados em mucuna-cinza e dois em mucuna-anã apresentou elevada biomassa da parte aérea. A maioria dos isolados apresentou crescimento rápido e acidificou o meio de cultura. A análise de restrição demonstrou que as bactérias isoladas apresentam baixa similaridade com estirpes de referência, sugerindo a existência de isolados pertencentes a novos grupos, capazes de nodular as mucunas anã e cinza.

Termos de indexação: adubos verdes, seleção de estirpes, fixação biológica de nitrogênio, inoculante, rizóbio.

⁽¹⁾ Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo (CPGA-CS) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. Recebido para publicação em 2 de fevereiro de 2011 e aprovado em 9 de fevereiro de 2012.

⁽²⁾ Discente do CPGA-CS/UFRRJ, Instituto de Agronomia, Departamento de Solos. BR 465, km 7 CEP 23890-000 Seropédica (RJ), Brasil. Bolsista CAPES. E-mails: andrea_ap_lima@yahoo.com.br; passos.samuel@gmail.com; nandasibylla@yahoo.com.br; suya-maia@bol.com.br

⁽³⁾ Pesquisador da Embrapa Semiárido, BR 428, km 152, Zona Rural, CEP 56302-970 Petrolina (PE). E-mail: paulo.ivan@cptsa.embrapa.br

⁽⁴⁾ Pesquisador(a) Embrapa Agrobiologia BR 465, km 7, CEP 23890-000 Seropédica (RJ). E-mails: sdefaria@cnpab.embrapa.br; mgguerra@cnpab.embrapa.br; norma@cnpab.embrapa.br; gustavo@cnpab.embrapa.br

SUMMARY: DIVERSITY AND SYMBIOTIC CAPACITY OF BACTERIA ISOLATED FROM NODULES OF TWO VELVET BEAN SPECIES

Mucuna species are widely used as green manure, and little information is available about rhizobia that can nodulate them. The objective of this study was to evaluate the diversity and ability of bacteria isolated from symbiotic nodules of velvet bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) and *Mucuna deeringiana* (Bort.) Merr. From the nodules of either *Mucuna* species, grown in pots with soils from an agroecological system, 80 bacteria were isolated. The selected bacteria were classified and used to assess the symbiotic capacity. The diversity assessment of the isolates was based on cultural characteristics on YMA medium and the technique of restriction analysis of PCR products of 16S rDNA. The inoculation of *Mucuna pruriens* with five and *Mucuna deeringiana* with two isolates increased the aboveground biomass. Most isolates grew rapidly and acidified the culture medium. Restriction analysis showed low similarity of the reference strains with the bacterial isolates, suggesting the existence of isolates belonging to new groups that are able to nodulate the two *Mucuna* species.

Index terms: green manure, strain selection, biological nitrogen fixation, inoculant, *Rhizobium*.

INTRODUÇÃO

A fixação biológica de N₂ é um processo que disponibiliza grande quantidade de N para os agroecossistemas, principalmente através da associação das leguminosas e bactérias diazotróficas simbiotes, coletivamente denominadas rizóbios (Moreira & Siqueira, 2006). Devido a essa capacidade, as leguminosas têm sido utilizadas como adubos verdes, assumindo importante papel para o aumento da quantidade e da qualidade da matéria orgânica do solo. A incorporação de biomassa vegetal ao solo colabora para o aumento da fertilidade e da estabilidade física dos agregados do solo, sobretudo em solos tropicais mais intemperizados e com baixa fertilidade natural (Fageria, 2007).

Diversas leguminosas são utilizadas como adubos verdes, entre as quais estão as espécies de *Mucuna* spp. Essas espécies apresentam desenvolvimento vegetativo muito rápido e são resistentes à baixa disponibilidade hídrica e a solos com baixa fertilidade natural, o que as torna passíveis de cultivo em regiões de terras degradadas e não utilizadas para práticas agrícolas convencionais (Okito et al., 2004). Diversos estudos têm demonstrado a capacidade dessas espécies em acumular alta quantidade de N sob condições de inoculação (Houngnandan et al., 2000; Okito et al., 2004).

Para maximizar os benefícios dos adubos verdes, a inoculação de estirpes de rizóbios eficientes e competitivas é desejável. A nodulação abundante em adubos verdes com rizóbios nativos do solo é parcialmente responsável pela não adoção da prática de inoculação pelos produtores; entretanto,

resultados de pesquisa têm mostrado que a inoculação dessas espécies com estirpes eficientes e competitivas podem contribuir para elevar as taxas de N fixado e aumentar o crescimento vegetal (Okito et al., 2004; Kumar et al., 2006). A seleção de estirpes de rizóbios para os adubos verdes tem resultado em estirpes promissoras para a inoculação em guandu (Valarini & Godoy, 1994; Fernandes Júnior, 2009), feijão-de-porco (Silva et al., 2007), mucunas cinza, anã e preta (Lima, 2009) e feijão-caupi (Martins et al., 2003; Lacerda et al., 2004; Melloni et al., 2006; Leite et al., 2009; Zilli et al., 2009).

Recentemente, diversas novas espécies de bactérias originárias dos trópicos capazes de nodular leguminosas empregadas como adubos verdes têm sido descritas. Espécies de α -proteobactérias pertencentes a grupos que anteriormente não eram apontados como capazes de nodular leguminosas, como *Methylobacterium nodulans* (Sy et al., 2001) e *Ochrobactrum lupini* (Trujillo et al., 2005), foram isoladas pela primeira vez de crotalária e tremoço, respectivamente, indicando o potencial para o acesso a novas espécies de rizóbios associados a adubos verdes. Estudos que avaliam a diversidade de rizóbios em adubos verdes no Brasil têm demonstrado que a microbiota capaz de nodular espécies como o feijão-caupi (Leite et al., 2009; Florentino et al., 2010), guandu (Ambrosano et al., 2009; Fernandes Júnior, 2009) e cratília (Teixeira et al., 2010) é muito diversa, apresentando baixa similaridade com estirpes dos gêneros tradicionais de rizóbio. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a diversidade cultural e genética de rizóbios isolados de nódulos de duas espécies de *Mucuna* e determinar a capacidade simbiótica de isolados selecionados.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados rizobianos

Foram coletadas amostras do horizonte superficial de oito áreas sob diferentes coberturas vegetais e histórico de uso no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) (S 22° 45'; W 43° 40'), localizado em Seropédica-RJ (Quadro 1). As amostras de solo foram peneiradas e distribuídas em vasos furados com capacidade de 5 kg de solo. Os vasos foram enterrados ao nível do solo ao ar livre, para simular as características de variação na temperatura ocorrentes naturalmente no solo. Foram semeadas de 10 a 15 sementes de mucuna-anã [*Mucuna deeringiana* (Bort.) Merr] ou mucuna-cinza [*Mucuna pruriens* (L.) DC.]. O experimento foi implantado em um sistema fatorial 2 x 8 entre duas espécies de mucuna e oito tipos de solo em duplicata, totalizando 36 vasos (parcelas).

Aos 12 dias após a emergência (DAE), foi realizado um desbaste, deixando-se apenas duas plantas por vaso. As plantas receberam água conforme necessário e foram coletadas aos 75 DAE. As raízes foram lavadas e os nódulos destacados e armazenados em frascos contendo sílica-gel. De cada vaso, foram selecionados aleatoriamente cinco nódulos para o isolamento, totalizando 80 isolados de mucuna-cinza e 80 de anã. Os nódulos foram reidratados com água destilada autoclavada, desinfestados superficialmente e pressionados em placas de Petri contendo meio de cultura YMA com vermelho congo como indicador (Vincent, 1970). As placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 28 °C por sete dias, e as culturas foram transferidas para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol como indicador (Vincent, 1970) e reinoculadas sucessivas vezes no mesmo meio até

obtenção das culturas puras. Os isolados foram estocados em meio YMA suplementado com 30 % (v/v) de glicerol e estocados em ultrafreezer a -80 °C.

Avaliação da capacidade nodular e eficiência simbiótica

A capacidade de nodulação dos isolados de mucuna-anã e de mucuna-cinza foi avaliada em um experimento em casa de vegetação, utilizando vasos de Leonard autoclavados com areia e vermiculita (2:1, v:v) como substrato. As sementes de mucuna foram desinfestadas superficialmente, com peróxido de hidrogênio, e semeadas duas por vaso. Aos sete DAE foi realizado desbaste, deixando-se uma planta por vaso; a inoculação foi feita aos 10 DAE, sendo aplicada solução nutritiva (Norris & T'Mannetje, 1964) semanalmente. Os isolados foram cultivados em meio YMA (Vincent, 1970) a 28 °C, sob agitação, de um a sete dias, de acordo com o tempo de crescimento de cada isolado. Os tratamentos consistiram dos isolados obtidos (80 para cada espécie de mucuna), de uma estirpe de referência (BR 2811) e do controle negativo (sem fonte de N e sem inoculação). O experimento foi realizado com o delineamento de blocos ao acaso em duplicata. De acordo com a nodulação e, ou, capacidade de indução da produção de biomassa vegetal (dados não mostrados) de cada isolado, foram selecionados cinco isolados de mucuna-anã e cinco de mucuna-cinza, para avaliação do estabelecimento da simbiose com o hospedeiro original.

Os experimentos para avaliação da capacidade simbiótica de cada isolado foram realizados em casa de vegetação, nas mesmas condições dos testes de nodulação. Para a mucuna-cinza, foram testados os isolados M41(3), M3(6), M25(3), M15(6) e M47(1), e para a mucuna-anã, os isolados M38(2), M30(3),

Quadro 1. Descrição das áreas onde foram coletadas as amostras de solos utilizadas para o cultivo das mucunas, visando à obtenção dos nódulos para o isolamento dos rizóbios

Área	Solo	Histórico de utilização das áreas	Cobertura no momento da coleta
1	Planossolo Háptico	Sorgo (2 anos) e guandu	Guandu
2	Planossolo Háptico	Guandu e feijão de porco (2 anos)	Crotalária e rami
3	Planossolo Háptico	Feijão comum seguido por 2 anos de pousio	Crotalária
4	Argissolo Amarelo	Consórcio Mandioca/Crotalária (3 anos)	Guandu
5	Argissolo Vermelho-Amarelo	Milho consorciado com mucuna preta e crotalária (3 anos).	Pousio
6	Argissolo Vermelho-Amarelo	Rotação milho/mucuna preta	Milho
7	Argissolo Amarelo	Rotação milho, couve e mucuna preta	Berinjela
8	Argissolo Amarelo	Milheto e crotalária em rotação com batata doce (2 anos).	Área arada, sem cobertura

M6(2-1), M6(4-2) e M6(5). Para cada espécie de mucuna, foi utilizado um delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições, em um esquema fatorial 8 (tratamentos) x 2 (coletas). Os tratamentos consistiram na inoculação de cinco isolados oriundos das espécies de mucuna, na inoculação com a BR 2811, na testemunha nitrogenada (com aplicação de 100 mg/vaso de NH_4NO_3 , não inoculada) e na testemunha absoluta (sem inoculação e sem aplicação de N).

Foram realizadas duas coletas: aos 40 e 55 DAE para a mucuna-cinza e aos 35 e 50 DAE para a mucuna-anã. As variáveis analisadas foram: massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raiz seca (MRS), massa de nódulos secos (MNS) e massa total seca (MTS), calculada com o somatório das variáveis MPAS, MRS e MNS. Também foi determinado o acúmulo de N total na parte aérea pelo método semimicro Kjeldahl, sendo o conteúdo de N na parte aérea obtido pelo produto entre a concentração e a massa seca. A eficiência nodular foi obtida pela razão entre o N acumulado na parte aérea e a MNS. Foi realizada a análise de variância e o teste de comparação de médias, utilizando o teste de Scott-Knott a 5 %, por meio do software Sisvar (Ferreira, 2003).

Para os tratamentos inoculados com os isolados em teste, os índices de eficiência (Ef_n), eficácia (Ef_0) e efetividade (Ef_s) foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$Ef_n = \{\sum[(a_{ij}/a_{nj}) 100] - 100\} n^{-1}$$

$$Ef_0 = \{\sum[(a_{ij}/a_{0j}) 100] - 100\} n^{-1}$$

$$Ef_s = \{\sum[(a_{ij}/a_{sj}) 100] - 100\} n^{-1}$$

em que a_{ij} representa o acúmulo de N na parte aérea da parcela experimental inoculada com o i -ésimo isolado no j -ésimo bloco testado; a_{nj} , a quantidade de N na parte aérea da parcela experimental que recebeu N mineral no j -ésimo bloco; a_{0j} , a quantidade de N na parte aérea da parcela experimental do controle absoluto (sem inoculação e sem adição de N mineral) no j -ésimo bloco; a_{sj} , a quantidade de N na parte aérea da parcela experimental inoculada com a estirpe de referência BR 2811 no j -ésimo bloco; e n , o número de repetições. Os índices de eficiência, eficácia e efetividade foram avaliados por meio do teste de correlação de ranqueamento de Spearman (Conover, 1971) a 5 %.

Caracterização cultural e genotípica

A caracterização cultural dos isolados de rizóbio foi feita avaliando os seguintes atributos: tempo de crescimento de cada isolado, considerando crescimento rápido (aparecimento de colônias isoladas em até três dias) ou lento (aparecimento de colônias iso-

ladas em quatro ou mais dias); reação de pH do meio de cultura após o crescimento das bactérias (ácido, alcalino ou neutro); tamanho da colônia, em mm; forma da colônia (circular ou irregular); elevação (plana ou com elevação); borda (inteira ou irregular); transparência (opaca, translúcida ou transparente); aparência (homogênea ou heterogênea); cor (branca ou amarela); elasticidade (1 = pouco, 2 = médio, 3 = muito); e limpa placa (sim = quando há facilidade para retirada do muco da placa; não = quando há dificuldade para retirada do muco). Foram utilizadas cinco espécies de bactérias diazotróficas como estirpes de referência, obtidas da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, sendo uma de cada gênero, para fins de comparação com os isolados obtidos: BR 112 (*Sinorhizobium fredii*), BR 113 (*Bradyrhizobium elkanii*), BR 521 (*Mesorhizobium ciceri*), BR 10016 (*Rhizobium tropici* II) e BR 5410 (*Azorhizobium caulinadans*).

De acordo com os resultados obtidos do dendrograma com as características fenotípicas dos isolados, foram selecionados 42 isolados representantes de agrupamento morfológico (22 de mucuna-anã e 20 de mucuna-cinza) para caracterização do perfil de restrição de DNA pela técnica de Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA). Para comparação dos resultados, além das cinco citadas, foram incluídas mais 15 espécies de bactérias diazotróficas como estirpes de referência, obtidas da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia: BR 2811 (*B. elkanii*), BR 7411 (*S. meliloti*), BR 522 (*Mesorhizobium mediterraneum*), BR 527 (*S. terangeae*), BR 526 (*S. sahelii*), BR 114 (*B. japonicum*), BR 523 (*M. tianshanense*), BR 524 (*M. huakuii*), BR 529 (*R. giardinii*), BR 10026 (*R. etli*), BR 10052 (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*), BR 7606 (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*), BR 528 (*R. gallicum*) e BR 5401 (*Azospirillum doberaneae*). O DNA foi extraído e submetido à eletroforese (100 V; 30 min) em gel de agarose (1 %), corado com brometo de etídio (10 mg L⁻¹).

A reação de PCR foi dimensionada para volume final de 35 mL, contendo tampão de reação 1X, MgCl_2 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1,75 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, cat N° 10342-020) BSA 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dNTP 0,25 mmol L⁻¹ e 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada iniciador. Os iniciadores utilizados foram Y1, que está compreendido entre a região 20 e 43 do gene 16S rDNA de *E. coli*, e Y3, correspondente à região 1507 a 1482 do gene 16S rDNA de *E. coli*. A amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 93 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 93 °C por 1 min, 62 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e extensão final a 72 °C por 10 min (Leite et al., 2009).

Na análise de restrição foram utilizadas as endonucleases *DdeI*, *MspI* e *HinfI*, seguindo as

orientações do fabricante. O DNA digerido foi analisado em gel horizontal a 3 % de agarose em tampão TBE 0,5X por 3 h, em voltagem constante de 75 V. O marcador de peso molecular utilizado foi o *fX174* (Invitrogen, cat N° 15611-015). As imagens dos géis foram analisadas pelo programa Gel Compar 2.0 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e o algoritmo UPGMA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização cultural e genotípica

A avaliação da capacidade de nodulação mostrou que 97,5 e 67,5 % dos isolados bacterianos de nódulos de mucuna apresentaram capacidade de nodular mucunas cinza e anã, respectivamente. A capacidade de nodulação de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas pode ser perdida após o processo de isolamento e estocagem das bactérias, principalmente para aquelas que apresentam os genes da simbiose em plasmídeos, como os rizóbios pertencentes à espécie *Rhizobium leguminosarum* (García de los Santos et al., 1996).

As características tempo de crescimento e reação de pH foram as mais discriminantes na formação dos

grupos fenotípicos. Ocorreu a formação de quatro grupos em mucuna-anã, com destaque para o grupo B, com 57,5 % dos isolados, e as estirpes de referência BR 521 (*M. ciceri*), BR 10016 (*R. tropici*) e BR 112 (*S. fredii*). Nesse agrupamento, as características predominantes foram crescimento rápido, pH ácido, aparência do muco homogênea e muco com pouca elasticidade (Quadro 2).

Em mucuna-cinza foi observada a formação de cinco grupos. O grupo C foi o mais abundante, com 36,25 % do total de isolados, e as características mais comuns foram pH ácido, crescimento rápido, aparência da colônia homogênea e pouca elasticidade do muco (Quadro 2). As estirpes de referência foram observadas no grupo A: BR 113 (*B. elkanii*) e BR 5410 (*A. caulinodans*); grupo B: BR 10016 (*R. tropici*) e BR 112 (*S. fredii*); e grupo E: BR 521 (*M. ciceri*). Em ambas as mucunas, os grupos C e D apresentaram características fenotípicas distintas daquelas das estirpes de referência utilizadas neste trabalho.

A alteração de pH em meio de cultura YMA é, comumente, uma característica para diferenciação dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, que apresentam a propriedade de acidificar o meio de cultura, enquanto *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* alcalinizam o meio YMA (Coutinho et al., 1999). Em solos tropicais sob diferentes manejos, bactérias isoladas de leguminosas de

Quadro 2. Características culturais de isolados bacterianos oriundos de nódulos de mucuna-anã e mucuna-cinza cultivadas em oito solos sob manejo orgânico

Grupo	N° isolados (%)	Tempo crescimento	pH do meio	Aparência Muco	Elasticidade	Limpa placa	Estirpes de referência
Mucuna-anã							
Características predominantes							
A	9(11,25 %)	lento	alcalino	homogêneo	pouca	sim	BR113 (<i>B. elkanii</i>); BR5410 (<i>A. caulinodans</i>).
B	46(57,5 %)	rápido	ácido	homogêneo	pouca	sim	BR521 (<i>M. ciceri</i>); BR10016 (<i>R. tropici</i>); BR112 (<i>S. fredii</i>).
C	19(23,75 %)	rápido	ácido	homogêneo	pouca	não	---
D	6(7,5 %)	lento	alcalino	heterogêneo	pouca	não	---
Mucuna-cinza							
Características predominantes							
A	22(27,5 %)	lento	alcalino	homogêneo	pouca	sim	BR113 (<i>B. elkanii</i>); BR5410 (<i>A. caulinodans</i>).
B	6(7,5 %)	rápido	ácido	homogêneo	pouca	sim	BR10016 (<i>R. tropici</i>); BR112 (<i>S. fredii</i>).
C	29(36,25 %)	rápido	ácido	homogêneo	pouca	não	---
D	10(12,5 %)	rápido	ácido	homogêneo	média	sim	---
E	13(16,25 %)	rápido	ácido	heterogêneo	pouca	não	BR521 (<i>M. ciceri</i>)

grãos, como soja (Nicolás et al., 2002), feijão-comum (Hungria et al., 2000), amendoim (Santos et al., 2005; Borges et al., 2007) e feijão-caupi (Melloni et al., 2006; Leite et al., 2009), também apresentam a característica de crescer rapidamente e acidificar o meio de cultura. Bactérias com as mesmas características culturais têm sido isoladas de leguminosas utilizadas como adubos verdes, como feijão-de-porco (Bratti et al., 2005; Silva et al., 2007), guandu (Coutinho et al., 1999; Fernandes Júnior, 2009; Fernandes Júnior et al., 2011), leucena (Marquina et al., 2011) e siratro (Jesus et al., 2005).

Ao isolar rizóbios de nódulos de diferentes espécies de crotalária cultivadas no mesmo sistema deste trabalho, Bratti et al. (2005) também constataram maior proporção de bactérias com a capacidade

de acidificar o meio de cultura e de crescimento rápido. A capacidade de crescer rapidamente e acidificar o meio de cultura pode representar uma vantagem competitiva desses isolados em detrimento dos isolados de crescimento mais lento e que alcalinizam o meio de cultura, sobretudo com relação à competência saprofítica e à colonização dos sítios de infecção (Bushby & Marshall, 1977), o que pode explicar a abundância dessas características em bactérias isoladas de leguminosas utilizadas como adubos verdes.

avaliando os resultados da análise de restrição, todos os isolados e as estirpes de referência apresentaram apenas 15 % de similaridade. No dendrograma de similaridade foi possível verificar a formação de cinco grupos distintos (Figura 1). O

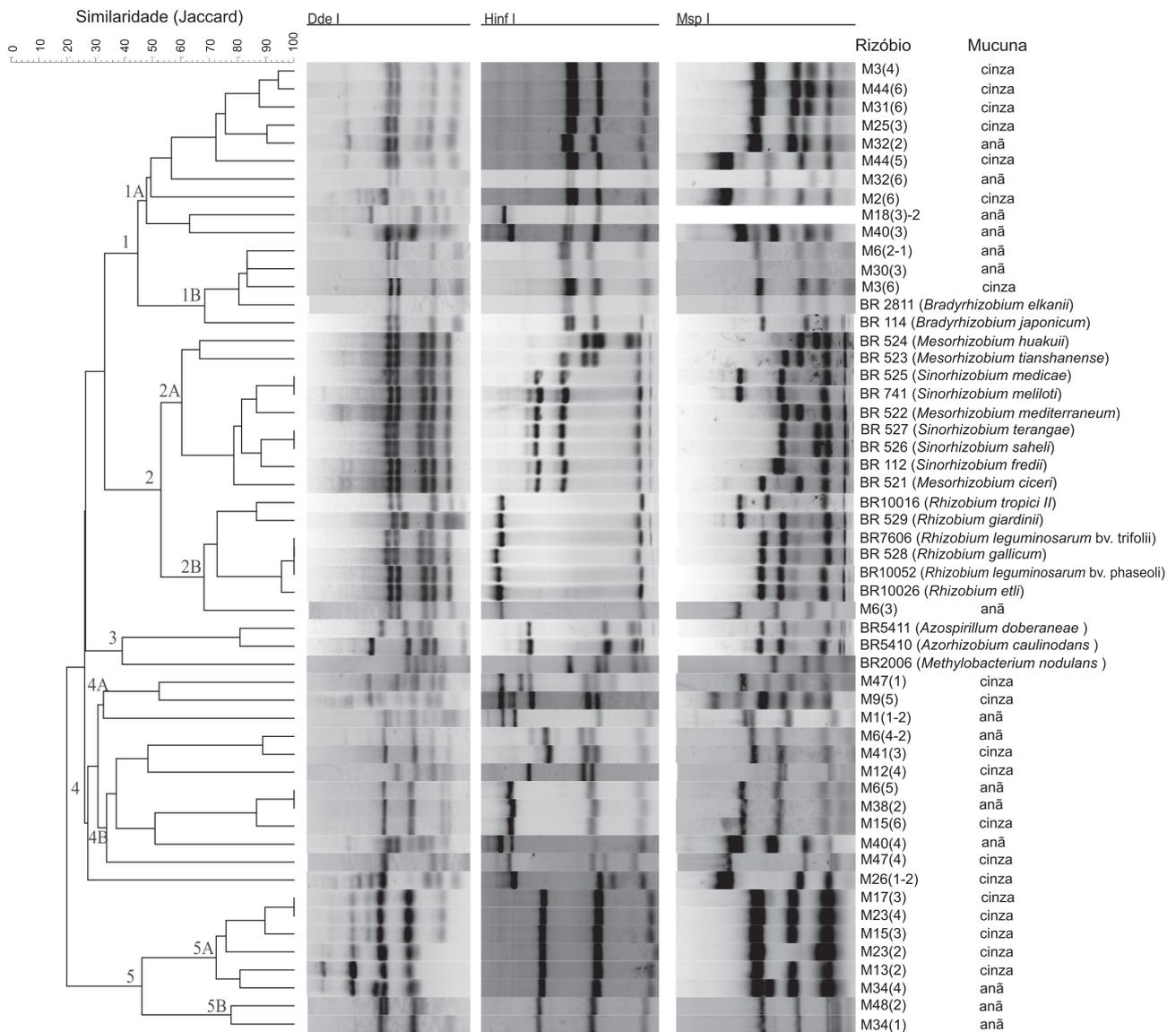


Figura 1. Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de nódulos de mucunas-anã e cinza e 20 estirpes de referência por meio da técnica de ARDRA-16S rDNA, utilizando as enzimas de restrição *Hinf* I, *Msp* I e *Dde* I.

grupo 1, com aproximadamente 45 % de similaridade, englobou 13 isolados de mucunas cinza e anã, além das estirpes BR 2811 de *B. elkanii* e BR 114 de *B. japonicum*. Este grupo apresentou dois subgrupos: o 1A, formado por 10 isolados oriundos das mucunas, e o 1B, formado pelos isolados M6 (2-1) de mucuna-anã e M3(6) de mucuna-cinza e pelas estirpes de *Bradyrhizobium* BR 2811 e BR 114 (Figura 1). No grupo 2 (aproximadamente 55 % de similaridade) agruparam-se todas as estirpes de referência, pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*. Neste grupo, o subgrupo 2A apresentou todas as estirpes de *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, enquanto o subgrupo 2B apresentou todas as estirpes de *Rhizobium*, além do isolado M3(6) oriundo de nódulos de mucuna-anã (Figura 1).

O grupo 3, com 40 % de similaridade, reúne as estirpes de referência BR 5401 (*Azospirillum doberanae*), BR 5410 (*Azorhizobium caulinodans*) e BR 2006 (*Methylobacterium nodulans*) (Figura 1). O grupo 4, com 30 % de similaridade, agrupa 11 isolados oriundos do presente estudo e não mostrou a presença de estirpes rizobianas de referência. Neste grupo, também houve a formação de dois subgrupos: 4A, com dois isolados de mucuna-cinza e um de mucuna-anã, e 4B, com quatro rizóbios oriundos de cada uma das espécies de mucuna avaliadas (Figura 1).

Pela análise molecular do 16S rDNA, entre os isolados de mucunas cinza e anã utilizados no presente estudo, apenas os isolados de crescimento lento M30(3) e M3(6) de mucunas anã e cinza, bem como o isolado de crescimento rápido M6(2-1) de mucuna-anã, pertenceram ao mesmo grupo das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. O isolado M6(2-1) não possui características culturais compatíveis com as apresentadas pela maioria dos isolados pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, porém o agrupamento de rizóbios de adubos verdes por meio da técnica de restrição de 16S rDNA (Yang et al., 2008; Leite et al., 2009; Fernandes Júnior et al., 2010) e restrição do espaço intergênico 16S-23S e por RAPD (Yang et al., 2008) mostra que rizóbios de crescimento rápido e com a capacidade de acidificar o meio de cultura podem agrupar com estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, demonstrando o pouco conhecimento a respeito da taxonomia e fisiologia dos isolados de rizóbio oriundos de nódulos de adubos verdes.

O crescimento rápido, a capacidade de acidificar o meio de cultura e a produção e heterogeneidade do muco produzido são compatíveis com aqueles apresentados por estirpes do gênero *Rhizobium*. Contudo, ao avaliar o agrupamento gerado a partir do perfil de restrição do gene 16S rDNA dos isolados testados, é possível observar que apenas o isolado M6(3) de mucuna-anã juntou-se às estirpes do gênero *Rhizobium* (Figura 1). Os resultados

indicam que esses isolados, apesar de apresentarem características fenotípicas compatíveis com as apresentadas por estirpes de grupos bem conhecidos, são geneticamente divergentes, sugerindo a presença de grupos novos.

Há baixa similaridade das estirpes isoladas de nódulos de mucuna em comparação com estirpes de gêneros já descritos, como *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Pandey et al., 2004; Kumar et al., 2006). A técnica de restrição do gene 16S rDNA tem sido demonstrada como uma eficiente ferramenta para o agrupamento de rizóbios isolados de diversas espécies, apresentando-se como uma técnica de baixo custo e boa capacidade de discriminação (Stocco et al., 2008; Leite et al., 2009; Teixeira et al., 2010; Marquina et al., 2011).

Eficiência simbiótica

Além de avaliar a capacidade de nodulação dos isolados após o processo de isolamento, purificação e estocagem, os testes de nodulação permitiram pré-selecionar os isolados de rizóbio que mostraram o melhor desempenho. Foi observado que alguns isolados promoveram o surgimento de até 163 nódulos por planta, com valores de massa de nódulos secos superiores a 500 mg/planta, resultando em massa de parte aérea superior a 5 g/planta para mucuna-cinza. Para mucuna-anã, os valores atingiram 272 nódulos, massa de nódulos secos de 1.200 mg/planta e 2,8 g/planta de massa de parte aérea.

No experimento de avaliação da capacidade simbiótica dos isolados selecionados, os tratamentos inoculados com algumas bactérias apresentaram valores mais elevados de massa de parte aérea do que os observados no tratamento nitrogenado (Quadro 3). A elevada nodulação nas plantas de mucuna-anã inoculadas com os isolados M30(3) e M6(2-1) foi proporcional ao conteúdo de N na parte aérea, porém, nas plantas inoculadas com o isolado M38(2), que também apresentou elevada nodulação, o acúmulo de N na parte aérea foi inferior ao do tratamento inoculado com a estirpe BR 2811 e ao da testemunha nitrogenada (Quadro 2). Além da nodulação abundante, três tratamentos inoculados com isolados de mucuna-cinza apresentaram acúmulo de N na parte aérea igual ao das plantas inoculadas com a estirpe de referência (Quadro 3). Os isolados M41(3), M3(6), M25 (3) e M15(6) inoculados em mucuna-cinza apresentaram, em média, aumento de cerca de 70 % da massa seca total em relação à testemunha absoluta e foram similares à estirpe de referência e à testemunha nitrogenada (Quadro 3).

O acúmulo de N na parte aérea das plantas de mucuna-anã inoculadas com os isolados M38(2), M30(3) e M6(4-2) foi maior do que o encontrado

Quadro 3. Massa de parte aérea, nódulos de raiz e total, acúmulo de nitrogênio na parte aérea e eficiência nodular de mucuna-anã e mucuna-cinza inoculadas com diferentes isolados de rizóbios, estirpe de referência BR 2811, testemunha nitrogenada (com N e sem inoculação) e testemunha absoluta (sem N e sem inoculação) em duas épocas, aos 35 e 50 dias após a emergência

Tratamento	Massa											
	Parte aérea seca		Nódulo seco		Raiz seca		Total seca		N total parte aérea		Eficiência nodular	
	g/planta		g/planta		g/planta		g/planta		mg/planta		mg N nódulo ⁻¹	
	Mucuna-anã (dias após a emergência)											
	35	50	35	50	35	50	35	50	35	50	35	50
M38(2)	2,00 Aa	3,08 Ba	0,20Aa	0,38Aa	0,50Aa	0,84 Aa	2,71 Ab	4,30 Ba	56,0 Aa	63,7 Ba	0,3 Aa	0,2 Aa
M30(3)	2,11 Ab	5,33Aa	0,21 Ab	0,54 Aa	0,35 Ab	1,09 Aa	2,67 Ab	6,98 Aa	56,5 Ab	112,2 Aa	0,3 Aa	0,2 Aa
M6(2-1)	1,69 Ab	4,78 Aa	0,14 Ab	0,52 Aa	0,49 Ab	1,19 Aa	2,32 Ab	6,49 Aa	35,0 Bb	116,0 Aa	0,2 Aa	0,2 Aa
M6(4-2)	1,63 Aa	2,82 Ba	0,25 Aa	0,27 Ba	0,57 Aa	0,89 Aa	2,46 Ab	3,98 Ba	44,5 Aa	61,2 Ba	0,2 Aa	0,2 Aa
M6(5)	1,95 Aa	2,51 Ba	0,25 Aa	0,19 Ba	0,45 Ab	0,97 Aa	2,67 Ab	3,67 Ba	15,7 Bb	47,0 Ba	0,1 Bb	0,2 Aa
BR 2811	1,37 Ab	3,95Aa	0,14 Ab	0,45 Aa	0,52 Ab	1,11 Aa	2,03 Ab	5,51 Aa	26,2 Bb	103,2 Aa	0,2 Aa	0,2 Aa
Test. Nitrogenada	2,49 Aa	4,24 Aa	0 Aa	0 Ca	0,63 Aa	0,79 Aa	3,12 Ab	5,03 Aa	16,5 Ba	134,0 Aa	-	-
Test. absoluta	1,03 Aa	2,14 Ba	0 Aa	0 Ca	0,40 Ab	0,99 Aa	1,43 Ab	3,14 Ba	2,0 Cb	1,2 Cb	-	-
CV(%)	25,6		40,5		27,8		44,9		78,4		29,0	
	Mucuna-cinza (dias após a emergência)											
	40	55	40	55	40	55	40	55	40	55	35	50
M41(3)	3,96 Ab	6,62 Aa	0,39 Ab	0,70 Aa	0,90 Ba	1,52Aa	5,26 Ab	8,47 Aa	104,0 Ab	178,7 Aa	0,3 Aa	0,3 Aa
M3(6)	3,78 Ab	6,08 Aa	0,43 Aa	0,58 Aa	1,28Aa	1,23 Aa	5,50 Ab	7,89 Aa	102,0 Ab	158,7 Aa	0,2 Aa	0,3 Aa
M25(3)	4,79 Aa	6,13 Aa	0,37 Ab	0,63Aa	0,66 Bb	1,13 Aa	5,82 Ab	7,88 Aa	81,2 Aa	154,5 Aa	0,2 Aa	0,3 Aa
M15(6)	3,48 Ab	5,93 Aa	0,43 Ab	0,78 Aa	0,83 Ba	1,18 Aa	4,73 Ab	7,89 Aa	79,5 Ab	135,0 Ba	0,2 Aa	0,2 Aa
M47(1)	4,86 Aa	4,38 Ba	0,44 Aa	0,55 Aa	1,38 Aa	0,99 Aa	6,68 Ab	5,92 Ba	135,7 Aa	96,7 Ba	0,3 Aa	0,2 Ab
BR 2811	3,64 Aa	5,41 Aa	0,30 Ab	0,63 Aa	0,80 Ba	1,20 Aa	4,74 Ab	7,24 Aa	82,5 Ab	146,2 Aa	0,3 Aa	0,2 Aa
Test. Nitrogenada	5,20 Ab	7,25 Aa	0 Ba	0 Ba	0,83 Bb	1,51 Aa	6,06 Ab	8,78 Aa	140,7 Ab	200,0 Aa	-	-
Test. absoluta	2,88 Aa	3,88 Ba	0 Ba	0 Ba	0,61 Ba	0,89 Aa	3,50 Ab	4,78 Ba	1,2 Ba	2,5 Ca	-	-
CV (%)	25,6		40,5		27,8		23,5		31,1		26,1	

Valores são médias de quatro repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5 %; letras maiúsculas comparam tratamentos na coluna e letras minúsculas comparam coletas na linha.

na testemunha nitrogenada e inoculado com a BR 2811 na primeira coleta (Quadro 3). Na segunda avaliação, apenas plantas inoculadas com o isolado M30(3) mantiveram alto conteúdo de N na parte aérea; os demais isolados não repetiram o mesmo desempenho na segunda coleta (Quadro 3).

A estirpe BR 2811, recomendada como inoculante para mucuna-preta (*Mucuna aterrima*), neste trabalho foi usada como estirpe de referência para as espécies de mucunas anã e cinza, já que no Brasil não existe estirpe recomendada para essas espécies vegetais, conforme as normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 2011). Nesse estudo, essa estirpe apresentou

elevada massa de nódulos e elevado acúmulo de N na parte aérea em ambas as espécies de mucuna (Quadro 3). Por outro lado, as plantas inoculadas com os isolados M41(3), M3(6) e M25(3) de mucuna-cinza e M30(3) e M6(2-1) de mucuna-anã indicam o benefício dessas estirpes para a contribuição da FBN em relação às épocas de coletas e sugerem que a otimização da FBN, nesses casos, depende do correto manejo da cultura.

Avaliando a eficiência nodular, na segunda coleta, todas as plantas inoculadas com bactérias de mucuna-anã apresentaram igualdade estatística com a estirpe de referência, enquanto na primeira coleta apenas um isolado mostrou eficiência nodular

menor do que a apresentada pela estirpe BR 2811 (Quadro 3). Para a mucuna-cinza, todas as bactérias mostraram eficiência nodular igual à apresentada pela estirpe de referência na primeira coleta; na segunda coleta, apenas um isolado apresentou eficiência nodular menor do que a apresentada pela estirpe de referência (Quadro 3). Esses resultados demonstram que mesmo as estirpes com menor nodulação em seu hospedeiro original apresentam nódulos muito eficientes, com elevada capacidade de fixar o N atmosférico.

Aumento do desenvolvimento radicular foi observado em tratamentos com alguns dos isolados avaliados. Tratamentos inoculados com o isolado M30(3) de mucuna-anã apresentaram aumento real de 115 % na MRS entre a primeira e a segunda coleta, enquanto plantas inoculadas com a estirpe BR 2811 tiveram aumento de 14 %. Estudos recentes têm demonstrado que diversas bactérias isoladas de nódulos também são capazes de produzir reguladores de crescimento vegetal, que auxiliam no desenvolvimento radicular (Kumari et al., 2008; Yanni & Dazzo, 2010).

O índice de eficiência (Ef_n), calculado a partir da relação entre os acúmulos de N da parte aérea

no tratamento inoculado em comparação com a testemunha nitrogenada, demonstrou que todos os isolados de mucuna-anã avaliados apresentaram eficiência positiva na primeira coleta, com destaque para o isolado M30(3), com eficiência positiva em ambas as coletas. Assim como a estirpe de referência avaliada, todos os isolados de mucuna-cinza apresentaram eficiência negativa em ambas as coletas (Quadro 4). Pela análise da eficácia (Ef_0), calculada a partir da relação entre os acúmulos de N da parte aérea no tratamento inoculado em relação à testemunha absoluta, todos os isolados avaliados, assim como a estirpe de referência, apresentaram índices positivos e com valores muito elevados, indicando efeito significativo na promoção das espécies de mucuna (Quadro 4).

O índice de efetividade (Ef_s), calculado a partir da razão entre os acúmulos de N da parte aérea no tratamento inoculado com o isolado em teste em relação ao tratamento inoculado com a estirpe de referência, demonstrou que os tratamentos inoculados com três isolados de mucuna-anã e quatro isolados de mucuna-cinza mostraram maior capacidade simbiótica dos isolados em avaliação do que a estirpe de referência, pois apresentaram índices positivos na primeira coleta. Na segunda

Quadro 4. Eficiência, eficácia e efetividade de cinco isolados de mucuna-anã e cinco de mucuna-cinza

	Eficiência (Ef_n)		Eficácia (Ef_0)		Efetividade (Ef_s)	
	Mucuna-anã					
Coleta (DAE)	35	50	35	50	35	50
M38(2)	38,8	-52,4	1107,3	1297,4	-12,3	-38,0
M30(3)	155,8	11,5	2125,5	3169,9	61,6	45,0
M6(2-1)	58,6	-12,9	1280,3	2455,6	0,3	13,4
M6(4-2)	101,8	-54,3	1655,4	1239,4	27,5	-40,6
M6(5)	43,9	-41,8	1152,2	1606,3	-9,1	-24,3
BR 2811	58,3	-23,1	1276,9	2154,4	-	-
Spearman ⁽²⁾	0,99	0,93	0,99	0,99	0,97	0,95
	Mucuna-cinza					
Coleta (DAE)	40	55	40	55	40	55
M41(3)	-26,2	-10,8	1904,0	4819,3	26,6	22,1
M3(6)	-27,6	-20,5	1865,7	4281,9	24,2	8,8
M25(3)	-23,3	-22,8	1984,6	4155,6	31,7	5,6
M15(6)	-43,6	-32,7	1432,4	3612,7	-3,2	-7,8
M47(1)	-3,7	-51,7	2515,4	2562,9	65,2	-33,9
BR 2811	-41,7	-26,9	1482,8	3928,8	-	-
Spearman ⁽²⁾	0,80	0,92	0,86	0,99	0,85	0,96

⁽¹⁾ Valores são médias de quatro repetições. ⁽²⁾ Coeficiente de correlação de ranqueamento de Spearman calculado entre os quadrados dos índices e do parâmetro quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea. Todos os coeficientes de correlação foram significativos a 5 %.

coleta, os tratamentos inoculados com dois isolados de mucuna-anã e três de mucuna-cinza mantiveram os valores positivos do índice, com destaque para os isolados M30(3) de mucuna-anã e M41(3) de mucuna-cinza, que proporcionaram valores positivos de maior valor absoluto em ambas as coletas (Quadro 4). Esses resultados sugerem que, entre os isolados avaliados no presente estudo, há aqueles capazes de fornecer maior quantidade de N para o hospedeiro do que a estirpe utilizada como referência.

Os índices de eficiência e eficácia são utilizados para avaliar o desempenho de estirpes de rizóbios e já foram propostos há vários anos (Döbereiner et al., 1970), com variações na forma de cálculo. Outro índice, proposto neste trabalho, é o de efetividade, que serve para comparar os resultados da seleção de novas estirpes em relação às estirpes de referência ou estirpes recomendadas. De acordo com as determinações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Brasil, 2011), para recomendação de novos produtos ou estirpes, esses devem ter resultado superior ao da testemunha absoluta e igual ou superior ao da testemunha nitrogenada e a estirpe recomendada. Nesse contexto, o índice de efetividade tenta preencher essa lacuna, ao buscar estirpes de bactérias mais eficientes para a FBN. Essa é uma determinação simples e confiável, sendo facilmente comparável por meio do teste de correlação de Spearman (Quadro 4). O termo efetividade é empregado na literatura como um conceito confuso, em que são utilizados elementos relacionados à eficiência e à eficácia, conforme pode ser observado em outros trabalhos (Ferreira & Marques, 1992; Santos et al., 2005). Utilizando os conceitos de eficiência, eficácia e efetividade, os resultados do presente estudo indicam o potencial de alguns isolados obtidos de nódulos de mucuna-cinza e de mucuna-anã para futuros estudos em campo.

CONCLUSÕES

1. As bactérias isoladas de nódulos de ambas as espécies de mucuna apresentam elevada diversidade fenotípica com predominância de isolados com capacidade de acidificar o meio de cultura e de crescimento rápido.

2. Todos os isolados e as estirpes de referência apresentaram apenas 15 % de similaridade genética pelo 16S rDNA.

3. Plantas inoculadas com os isolados M30(3) e M6(2-1) originados dos nódulos de mucuna-anã e os isolados M41(3), M25(3) e M 3(6) de mucuna-cinza apresentaram massa total seca e N total da parte aérea superiores aos da testemunha absoluta e

semelhantes aos da estirpe de referência BR 2811 e do tratamento nitrogenado.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Embrapa Agrobiologia e ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo (CPGA-CS) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo suporte financeiro e estrutural.

LITERATURA CITADA

- AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M.B.; SCHAMMASS, E.A.; MURAOKA, T.; GUIRADO, N. & ROSSI, F. Nitrogen supply to corn from sun hemp and velvet bean green manures. *Sci. Agric.*, 66:386-394, 2009.
- BORGES, W.L.; SANTOS, C.E.R.S.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio de acessos de amendoim. *Agr. UFPE.*, 2:32-37, 2007.
- BRATTI, A.E.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; MARTINS, C.M.; ZILLI, J.E.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. & NEVES, M.C.P. Levantamento de rizóbios em adubos verdes cultivados em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA). Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2005.15p. (Documento, 204)
- 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 micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil, na forma dos Anexos I, II e III, desta Instrução. DOU, 25 de mar. 2011. Seção 1. p.3-7.
- BUSHBY, H.V.A. & MARSHALL, K.C. Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on desiccation. *Soil Biol. Biochem.*, 9:143-147, 1977.
- CONOVER, W.J. Practical nonparametric statistics. New York, 1971. 163p.
- COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; LOVATO, A.; MAIA, A.H.N. & MANFIO, G.P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Appl. Soil Ecol.*, 13:159-167, 1999.
- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A.A. & GUZMÁN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. *Pesq. Agropec. Bras.*, 5: 155-161, 1970.
- FAGERIA, N.K. Green manuring in crop production. *J. Plant Nutr.*, 30:691-719, 2007.

- FERNANDES JÚNIOR, P.I. Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2009. 186p. (Tese de Doutorado)
- FERNANDES JÚNIOR, P.I.; ALMEIDA, J.P.S.; PASSOS, S.R.; OLIVEIRA, P.J.; RUMJANEK, N.G. & XAVIER, G.R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios de isolados de guandu. *Pesq. Agropec. Bras.*, 45:1465-1470, 2010.
- FERNANDES JÚNIOR, P.I.; OLIVEIRA, P.J.; RUMJANEK, N.G. & XAVIER, G.R. Poly- β -hydroxybutyrate and exopolysaccharide biosynthesis by bacterial isolates from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] root nodules. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 164:473-484, 2011.
- FERREIRA, E.M. & MARQUES, J.F. Selection of portuguese *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strains for production of legume inoculants. *Plant Soil*, 147:151-158, 1992.
- FERREIRA, D.F. Sisvar. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2003.
- FLORENTINO, L.A.; SOUSA, P.M.; SILVA, J.S.; SILVA, K.B. & MOREIRA, F.M.S. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. *R. Bras. Ci. Solo*, 34:1113-1123, 2010.
- GARCÍA DE LOS SANTOS, A.; BROM, S. & ROMERO, D. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12:119-125, 1996.
- HOUNGNANDAN, P.; SANGINGA, N.; WOOPER, P.; VANLAUWE, B. & van CLEEMPUT, O. Response of *Mucuna pruriens* to symbiotic nitrogen fixation by rhizobia following inoculation in farmers fields in the derived savanna of Benin. *Biol. Fert. Soil.*, 30:558-565, 2000.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J. & MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, 32:1515-1528, 2000.
- JESUS, E.C.; MOREIRA, F.M.S.; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D. & OLIVEIRA, M.S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40:769-776, 2005.
- KUMAR, B.; KUMAR, M.S.; ANNAPURNA, K. & MAHESHWARI, D.K. Genetic diversity of plant growth-promoting rhizobia isolated from a medicinal legume, *Mucuna pruriens* Linn. *Curr. Sci.*, 91:1524-1529, 2006.
- KUMARI, B.S.; RAM, M.R. & MALLAYAH, K.V. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from *Indigofera*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 3:10-14, 2008.
- LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B. & SOARES, A.L.L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. *R. Ceres*, 51:67-82, 2004.
- LEITE, J.; SEIDO, S.L.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. & MARTINS, L.M.V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco River Valley. *R. Bras. Ci. Solo*, 33:1215-1226, 2009.
- LIMA, A.A. Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2009. 92p. (Tese de Mestrado)
- MARQUINA, M.E.; GONZÁLEZ, N.E. & CASTRO, Y. Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *R. Biol. Trop.*, 59:1017-1036, 2011.
- MARTINS, L.M.V.; RANGEL, F.W.; XAVIER, G.R.; RIBEIRO, J.R.A.; MORGADO, L.B.; NEVES, M.C.P. & RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: A strategy for improving grain yield in the semi- arid region of Brazil. *Biol. Fert. Soils*, 38:333-339, 2003.
- MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A. & SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:235-246, 2006.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.
- NICOLÁS, M.F.; FARIAS, C.A.A. & HUNGRIA, M. Genetics of nodulation and nitrogen fixation in Brazilian soybean cultivars. *Biol. Fert. Soils*, 36:109-117, 2002.
- NORRIS, D.O. & T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. *East Afr. Agric. For. J.*, 29:214-235, 1964.
- OKITO, A.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. & BODDEY, R.M. Nitrogen fixation by groundnut and velvet bean residual benefit to a subsequent maize crop. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39:1183-1190, 2004.
- PANDEY, P.; SAHGAL, M.; MAHESHWARI, D.K. & JOHRI, B.N. Genetic diversity of rhizobia isolated from medicinal legumes growing in the sub-Himalayan region of Uttaranchal. *Curr. Sci.*, 86:202-207, 2004.
- SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; FREITAS, A.D.S.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N. & SOUTO, S.M. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região nordeste do Brasil, na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea*). *Acta Sci.*, 27:305-312, 2005.
- SILVA, G.; LIMA, A.; NOSOLINE, S.; RUMJANEK, N. & XAVIER, G. Seleção de inoculante rizobiano para feijão-deporco. *R. Bras. Agroecol.*, 2:1232-1235, 2007.
- STOCCO, P.; SANTOS, J.C.P.; VARGAS, V.P. & HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1107-1120, 2008.

- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C. & DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.*, 183:214-220, 2001.
- TEIXEIRA, F.C.P.; BORGES, W.L.; XAVIER, G.R. & RUMJANEK, N.G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. *Braz. J. Microbiol.*, 41:201-208, 2010.
- TRUJILO, M.E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A.M.; RIVAS, R.; LUDENA, D.; MATEOS, P.F.; MARTINEZ-MOLINA, E. & VELAZQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:1318-1327, 2005.
- VALARINI, M.J. & GODOY, R. Contribuição da fixação simbiótica de nitrogênio na produção do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). *Sci. Agric.*, 51:500-504, 1994.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific, 1970. 164p.
- YANG, J.K.; YUAN, T.Y.; ZHANG, W.T.; ZHOU, J.C. & LI, Y.G. Polyphasic characterization of mung bean (*Vigna radiata* L.) rhizobia from different geographical regions of China. *Soil Biol. Biochem.*, 40:1681-1688, 2008.
- YANNI, Y.G. & DAZZO, F.G. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. *Plant Soil*, 336:129-142, 2010.
- 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. *Acta Amaz.*, 34:749-758, 2009.