

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO: AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS EM FEIJÃO GUANDU EM CASA DE
VEGETAÇÃO

Dissertação

Luiz de Moura Neto

Manaus – AM

2020



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO: AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS EM FEIJÃO GUANDU EM CASA DE
VEGETAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido para obtenção do título de Mestre.

NOME: Luiz de Moura Neto

ORIENTADOR: Aleksander Westphal Muniz

COORIENTADOR: Everton Rebelo Cordeiro

Manaus – AM

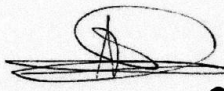
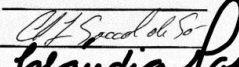
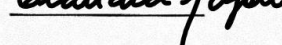
2020

DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

Ata da Defesa Presencial de Dissertação de Mestrado de, aluno Luiz de Moura Neto do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agricultura no Trópico Úmido, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, realizada no dia 11 de Dezembro de 2020.

Aos 11 dia do mês de dezembro de 2020, às 09h, realizou-se por videoconferência a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado, intitulada: “**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS EM FEIJÃO GUANDU EM CASA DE VEGETAÇÃO** do (a) aluno (a) LUIZ DE MOURA NETO , sob a orientação do Dr.(a) ALEKSANDER WESTPHAL MUNIZ (INPA) em conformidade com o Artigo 52 do Regimento Geral da Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI-INPA) e Artigo 60 do Regimento Interno do PPG-ATU como parte de suas atividades para conclusão e obtenção do título de “**MESTRE EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO**”. A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Dr. José Renato Pereira Cavallazzi (UFAM) , Dr. Enilson Luis Saccol de Sá (UFRGS) e Dra. Cláudia Majolo (EMBRAPA) . O Presidente da Banca Examinadora deu início à sessão, convidando os membros e o (a) Mestrando (a) a tomarem seus lugares. Em seguida, O Sr. Presidente informou sobre o procedimento do exame. A palavra foi facultada ao (a) Mestrando (a) para apresentar uma síntese do seu estudo e responder às perguntas formuladas pelos membros da Banca Examinadora. Após a apresentação e arguição pelos membros da Banca Examinadora esta decidiu pela aprovação do discente. O **Certificado de conclusão do Curso de mestrado e o Diploma o aluno receberá somente o título após cumprir as exigências do Art. 54 do Regulamento Geral dos programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu* datado de 29 de fevereiro de 2008**. Será conferido ao aluno após a apresentação, um prazo máximo de 30 (trinta) dias após a Defesa da versão definitiva contendo as modificações sugeridas pela Banca e impressa em 02 (duas) cópias e 1 (uma) cópia em meio digital (arquivo preferencialmente em .pdf, que inclua todo o texto, figuras e outras matérias que fazem parte da dissertação). Nada mais havendo, a sessão foi encerrada, foi lavrada a presente Ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA:

<u>Nome</u>	<u>Parecer</u>	
Dr. José Renato Pereira Cavallazzi	(X) Aprovado () Reprovado	
Dr. Enilson Luis Saccol de Sá	(X) Aprovado () Reprovado	
Dra. Cláudia Majolo	(X) Aprovado () Reprovado	

() com “*Distinção*” () com “*Distinção e Louvor*”

Manaus (AM), 11 de dezembro de 2020.

Obs. O aluno se compromete a fazer as correções de acordo com as sugestões da banca.

Folha de aprovação

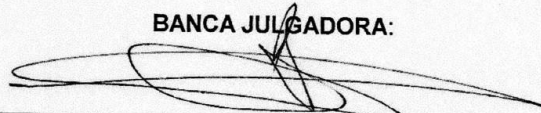
A Banca Julgadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

TÍTULO: "EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS EM FEIJÃO GUANDU EM
CASA DE VEGETAÇÃO"

AUTOR (A):

LUIZ DE MOURA NETO

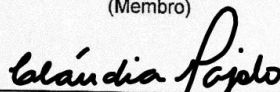
BANCA JULGADORA:



Dr. José Renato Pereira Cavallazzi (UFAM)
(Membro)



Dr. Enilson Luis Saccol de Sá (UFRGS)
(Membro)



Dra. Cláudia Majolo (EMBRAPA)
(Membro)

Manaus, 11 de dezembro de 2020

©SEDAB/INPA - Ficha Catalográfica Automática gerada com dados fornecidos pelo(a)
autor(a) Bibliotecário responsável: Jorge Luiz Cativo Alauzo - CRB11/908

D278l De Moura Neto, Luiz
mne EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS EM FEIJÃO
GUANDU EM CASA DE VEGETAÇÃO / Luiz De Moura Neto;
orientador Aleksander Westphal Muniz; coorientador
Everton Rebelo Cordeiro. -- Manaus:[s.], 2020.
33 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação
em Agricultura do Trópico Úmido) -- Coordenação do
Programa de Pós-Graduação, INPA, 2020.

1. Microbiologia do solo. 2. Fertilidade do solo. 3.
Fisiologia Vegetal. I. Muniz, Aleksander Westphal, orient.
II. Cordeiro, Everton Rebelo, coorient. III. Título.

CDD: 630

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha filha Luiza, aquela que faz todo esforço ser irrisório.

Agradecimentos

A Deus pela vida e pelas vitórias alcançadas;

A minha família pelo apoio motivacional e em especial minha esposa e filha que são minha base;

Aos meus pais pelo incentivo e palavras de sabedoria;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela oportunidade de fazer parte de tal órgão tão respeitado por suas contribuições científicas;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido pelo apoio em desenvolver a agronomia na Região Amazônica;

A Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado do Amazonas pela concessão da bolsa de estudos;

Aos Dr. Aleksander Westphal Muniz e Dr. Everton Rebelo Cordeiro pela excelente orientação, amizade e companheirismo;

Aos colaboradores da Embrapa pela infinita paciência e ajuda em todas as horas, não poupando esforços;

À minha colega de mestrado e pesquisa Danyella Vasconcelos presentes em todas as horas e sempre prestativa;

Aos meus amigos e colegas de graduação na UFAM e pós-graduação do INPA que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.

RESUMO

O feijão-guandú é uma leguminosa importante tanto no uso de alimentação animal quanto para recuperação de áreas degradadas. Essa leguminosa faz simbiose com rizóbios, que fixam biologicamente o nitrogênio (FBN). Dessa forma, a seleção de rizóbios eficientes permite a maximização dessa FBN. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica de diferentes rizóbios para feijão-guandú em casa de vegetação. Para isso, foram utilizadas culturas-armadilha com diferentes tipos de solo e usando feijão-guandú 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-guandú. 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.

ABSTRACT

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 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.

Key words: Biological N fixation, auxins, phosphate solubilization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Rizóbios.....	3
2.2. Feijão-guandu (<i>Canjanus cajan</i> (L.) Millsp).....	5
2.2.1. Origem e importância	5
2.2.2. Características botânicas	8
2.2.3. Cultivar estudada: BRS Mandarin	9
3. OBJETIVOS.....	10
3.1. Objetivo geral	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. Local de estudo.....	11
4.2. Coleta de solo	11
4.4. Isolamento dos nódulos	12
4.4.1. Manutenção de colônias.....	13
4.5. Avaliação da Eficiência Simbiótica	13
4.6. Análise de resultados.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS	24

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 nutrientes 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 é uma ótima 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 este trabalho tem por objetivo avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios para feijão-guandu (*Cajanus cajan*) em casa-de-vegetação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Rizóbios

No presente século, o aumento da população tem pressionado a agricultura de duas maneiras, primeiro a necessidade urgente de atender à demanda por grãos alimentares e, segundo, atender a essas demandas de maneira sustentável. Uma resposta promissora para esse desafio é a implementação de uma agricultura sustentável que envolve a utilização de uma série de técnicas como agricultura orgânica, aplicação de inoculantes e sistemas modificados de cultivo. Embora o uso de fertilizantes químicos tenha levado a um aumento na produção agrícola melhorada, várias preocupações relacionadas à saúde e ao meio ambiente foram associadas a elas (Ejaz *et al.*, 2004). Além disso, o problema generalizado de patógenos de plantas torna necessário explorar novos métodos para garantir o crescimento das plantas e sua saúde (Miller e Beed, 2009).

Ao contrário dos cereais que dependem quase exclusivamente de fertilizantes químicos para sustentar seu crescimento, as leguminosas podem se beneficiar das associações de fixação de nitrogênio com as bactérias do solo que são coletivamente conhecidas como rizóbios. (Udvardi e Poole, 2013).

Durante o processo de associação simbiótica que permite que rizóbios infectem células vegetais, as plantas hospedeiras selecionam ativamente bactérias simbióticas através da troca de múltiplos sinais moleculares (Perret *et al.*, 2000; Oldroyd *et al.*, 2011; Nelson e Sadowsky, 2015).

Além da eficiência simbiótica, a capacidade de sobrevivência no solo e a habilidade competitiva com a população rizobiana nativa ou naturalizada do solo são características altamente desejáveis em estirpes de rizóbios recomendadas para inoculação em leguminosas (Brockwell, 1981). Essas características têm sido freqüentemente relacionadas à maior resistência das estirpes a antibióticos, ao Al e a temperaturas elevadas (Oliveira & Graham, 1990; Wolff *et al.*, 1991; Xavier *et al.*, 1998). As temperaturas elevadas, que ocorrem freqüentemente nos trópicos, afetam diversos estágios da fixação biológica do N₂ (FBN), como o crescimento e sobrevivência do rizóbio no solo, troca de sinais moleculares entre os simbioss, processo de infecção e nodulação e atividade do aparato

enzimático para redução do N₂ e assimilação da amônia formada (Hungria & Vargas, 2000).

Do mesmo modo, concentrações tóxicas de Al ocorrem em diversos solos intemperizados dos trópicos e afetam todas as etapas da FBN (Hungria & Vargas, 2000). Contudo, existe variabilidade entre estirpes e rizóbio quanto à tolerância a temperaturas elevadas e ao Al tóxico (Ayanaba *et al.*, 1983; La Favre e Eaglesham, 1986; Karanja e Wood, 1988; Wood, 1995; Hungria *et al.*, 1997; Hungria e Vargas, 2000; Campo e Wood, 2001).

A utilização de rizóbios é um processo chave para o manejo agrícola sustentável na Amazônia, a fim de proporcionar às plantas menor dependência da aplicação de fertilizantes químicos, pois além da capacidade de fixar nitrogênio, algumas estirpes são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis do solo, e disponibilizam o fósforo tanto para si como para a planta hospedeira, promovendo o crescimento das mesmas (Starkanova *et al.*, 1999). Além de ser eficiente na fixação de nitrogênio em condições de campo, o rizóbio de guandu também apresenta outras aplicações biotecnológicas, como a produção de biopolímeros e a atividade enzimática (Fernandes *et al.*, 2012; Júnior *et al.*, 2011).

Fatores predominantes nos solos da Amazônia, como pH ácido e alta concentração de alumínio tóxico, podem diminuir a população desses microrganismos no solo (Oliveira *et al.*, 1994; Wood, 1995; Hungria e Vargas, 2000). No entanto, algumas estirpes podem desenvolver mecanismos de tolerância a esses fatores estressantes (Kawai *et al.*, 2000; Watkin *et al.*, 2000). A utilização dessas estirpes tolerantes pode aumentar a fixação biológica em solos ácidos e reduzir a aplicação de nitrogênio e fósforo, de acordo com os princípios da agricultura ecológica e economicamente sustentável.

Sabe-se há muito tempo que a acidez do solo diminui a fixação de nitrogênio simbiótico em leguminosas, afetando negativamente o crescimento e a produtividade, especialmente em plantas que dependem exclusivamente da simbiose para adquirir nitrogênio (Mohammadi *et al.* 2012; Bekere *et al.* 2013). Aproximadamente 30% da superfície terrestre apresenta solo ácido (pH 5,5), incluindo 40% de terra arável, afetando a disponibilidade de nutrientes e o crescimento das raízes, além de aumentar toxicidade por Al³⁺, o que, em última análise, leva a perdas no rendimento das culturas (Lin *et al.*, 2012).

Plantas simbióticas têm sido usadas para recuperação de áreas degradadas ou outras finalidades, uma vez que elas desempenham um papel importante na melhoria da qualidade do solo, fornecendo N ao solo (Leblanc *et al.*, 2005; Nichols e Carpenter, 2006). As plantas leguminosas possuem três fontes alternativas de nitrogênio inorgânico no ambiente: nitrato, amônio e N², (Pal'ove-Balang e Mistrik, 2007) em relação às leguminosas, essas plantas têm a capacidade de incorporar nitrogênio do N² atmosférico pela associação com o rizóbio que promove a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Desta forma, contribui para a entrada de N no ecossistema e, conseqüentemente, para melhorar a fertilidade do solo. No entanto, a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio são sensíveis às condições estressantes do ambiente, o que pode causar a inibição dos passos iniciais da infecção bacteriana nas raízes (Bouhmouch *et al.*, 2005).

O feijão-guandu é uma cultivar que cresce vigorosamente em solos com baixa fertilidade, principalmente em terras marginais (Beltrame e Rodrigues, 2007). De fato, o guandu é capaz de se associar com uma grande diversidade de rizóbios nativos no solo, alcançando mais de 150 kg de N fixado por hectare por ano (Peoples *et al.*, 1995). Para explorar o potencial biológico de fixação de nitrogênio (FBN) desta cultura, a seleção e avaliação de novas linhagens de rizóbios de diferentes áreas onde o guandu é cultivado deve ser realizada.

2.2. Feijão-guandu (*Canjanus cajan* (L.) Millsp)

2.2.1. Origem e importância

O feijão-guandu em geral é originário da Índia e foi introduzido no Brasil e Guianas pela rota dos escravos procedentes da África, onde assumiu importância como fonte de alimento humano (Godoy; Santos, 2011; Seiffert; Thiago, 1983). Por ser planta de origem tropical ou subtropical, desenvolve-se bem nas condições climáticas brasileiras. Por ser rústica e suportar condições muitas adversas, pode ser empregado desde a Região Sul até o Nordeste (Amabile *et al.*, 2008). É uma cultura importante para diversos países dos trópicos e subtropicais, principalmente para as nações asiáticas e africanas (Azevedo *et al.*, 2007).

O feijão-guandu é uma planta resistente a condições adversas de clima e solo, como as encontradas no cerrado brasileiro, sendo utilizada no melhoramento do solo, recuperação de terras degradadas, fito-medicação, renovação de pastagens, forragem e para consumo humano (Azevedo; Carvalho; Marques, 2008; Provazi *et al.*, 2007). Esta planta também possui alta capacidade de produção de biomassa, podendo produzir até 11 t ha⁻¹ e contribuindo para a incorporação de N e P (283 kg ha⁻¹ e 23 kg ha⁻¹, respectivamente) (Alves *et al.*, 2004).

Segundo Soussi *et al.* (2001), apesar de o guandu exibir alta capacidade simbiótica com bactérias autóctones, geralmente conhecidas como rizóbios, sua produção agrícola pode ser limitada. Assim, é necessário inocular esta planta com cepas que são eficientes em aumentar sua produção. A eficiência dessa simbiose pode, no entanto, ser afetada não apenas pela linhagem bacteriana e pela cultivar vegetal, mas também pelas condições ambientais (Ferreira *et al.*, 2012).

Cajanus cajan é uma importante leguminosa, com altas taxas de proteína nas regiões semiáridas do mundo (Varshney *et al.*, 2010), devido a sua importância, e pelo fato de ser uma das mais leguminosas tolerantes à seca (Valenzuela e Smith, 2002). É um componente integral da agricultura de subsistência na Índia e parte da África e da América do Sul (Saxena e Sawargaonkar, 2014). No entanto, nos países caribenhos, é uma cultura vegetal popular, cultivada por suas ervilhas obtidas das vagens colhidas na fase imatura (Gooding 1962; Spence e Williams 1972; Singh, 1994 Beekham e Umaharan 2010). É o caso da República Dominicana, onde é uma cultura hortícola conhecida como *guandul* (Cedano, 2006), com produção total quase idêntica à produção total de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). *C. cajan*, também, é conhecido por ser a principal cultura de grãos dos trópicos semi-áridos. Ele tem alto teor de proteína e, portanto, é comumente usado como um substituto para a carne em uma população em grande parte vegetariana na Índia.

Índia (Dubey *et al.*, 2010) e África (Degefu *et al.*, 2013), são, respectivamente, os centros de distribuição primária e secundária de *C. cajan* (Van der Maesen, 2006). Provavelmente esta leguminosa chegou da África aos rápido neste continente (Ramsubhag *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2003; Moulin

et al., 2004; Menna *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2014). No entanto, a simbiose *C. cajan*-rizóbios tem sido pouco estudada até o momento e existem poucos dados sobre a efetividade simbiótica, particularmente de cepas de *Bradyrhizobium*, nesta leguminosa.

A Índia é o maior produtor e consumidor de *C. cajan*, respondendo por cerca de 70% da produção global (Odeny, 2007). Depois do grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e da ervilha (*Pisum sativum*), o guandu é a terceira cultura mais importante de leguminosas na Índia (Sharma *et al.*, 2012). Também possui alta capacidade de fixação de nitrogênio (España *et al.*, 2006).

O feijão-guandu foi introduzido no Brasil e Guianas pela rota dos escravos procedentes da África, onde assumiu importância como fonte de alimento humano (Godoy; Santos, 2011; Seiffert; Thiago, 1983). Por ser planta de origem tropical ou subtropical, desenvolve-se bem nas condições climáticas brasileiras. Por ser rústica e suportar condições muito adversas, pode ser empregado desde a Região Sul até o Nordeste (Amabile *et al.*, 2008). É uma cultura importante para diversos países dos trópicos e subtropicais, principalmente para as nações asiáticas e africanas (Azevedo *et al.*, 2007).

Cajanus cajan proporciona benefícios adicionais aos agricultores devido à liberação de fósforo ligado ao solo, à melhoria da estrutura do solo, e particularmente, à fixação biológica de nitrogênio (FBN) em simbiose com rizóbios (Saxena, 2008). A nodulação de *C. cajan* é pobre, mas isso também acontece em seus centros de distribuição (Khurana e Dudeja, 1981; Sanginga *et al.*, 1996) e, conseqüentemente, a inoculação com cepas nativas selecionadas é uma prática desejável para aumentar o rendimento desta leguminosa sem adição de fertilizantes químicos.

Cajanus cajan é valorizado por suas sementes ricas em proteínas que são usadas para consumo humano e por suas partes aéreas que são usadas como forragem (Varshney *et al.*, 2010). Além disso, *C. cajan* também foi testado como uma planta para reduzir a erosão de solos agrícolas com encostas (Charpentier *et al.* 1999) e como um consórcio em sistemas de cultivo de arroz de terras altas (Akanvou *et al.*, 2002).

Em 2013, a produção anual de *C. cajan* foi estimada em 106 toneladas em todo o mundo, dos quais > 60% foram cultivados apenas na Índia. Na simbiose leguminosa-*Rhizobium*, a bactéria do solo em forma de bastonete, *Rhizobium*, induz nódulos fixadores de nitrogênio nas raízes de plantas leguminosas. O feijão-guandu forma nódulos em associação com *Rhizobium* sp. e é capaz de fixar 41 a 280 kg / ha de nitrogênio. A simbiose é um fenômeno biológico que envolve mudanças dinâmicas na rede de metabolismo e sinalização do genoma (Kawaguchi e Minamisawa, 2010).

A maioria das leguminosas possui dois tipos de simbioses microbianos: fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio, estabelecendo assim uma tríplice associação, capaz de fornecer os teores de N e P às plantas (Silveira e Cardoso, 2004). Tanto os fungos micorrízicos como os *Rhizobium* atuam como biofertilizantes e têm a capacidade única de converter elementos nutricionalmente importantes de indisponíveis para formas disponíveis através de processos biológicos (Vessey, 2003).

2.2.2. Características botânicas

O feijão-guandu é planta ereta e arbustiva, pertencente à família Fabaceae e à subfamília Faboidea, sendo reconhecidas duas variedades botânicas (bicolor e flavus), diferindo entre si pelo ciclo de desenvolvimento, coloração da flor e da vagem. Entre as cultivares de guandu, há ampla variação quanto à altura máxima, pois algumas plantas podem alcançar 4 m e outras não ultrapassam 1 m, apresentando variação também em relação ao potencial produtivo de fitomassa e de grãos e nas características das vagens e sementes (Souza *et al.*, 2007).

Com relação às variações genéticas, destacam que, mesmo sendo planta autógama, possui taxa de cruzamento natural (até 70%) bastante alta (Souza *et al.*, 2007; Amabile *et al.*, 2008). De acordo com a variedade, o feijão-guandu pode apresentar planta de ciclo anual ou perene de vida curta, com caules lenhosos e raiz pivotante que pode penetrar um ou mais metros no solo (Seiffert e Thiago, 1983). Esses autores relataram ainda que as plantas de guandu podem apresentar raízes finas secundárias, nos 30 cm da camada superficial do solo,

apresentando nódulos contendo bactérias do gênero *Rhizobium* fixadoras de nitrogênio atmosférico simbioticamente.

A fixação de nitrogênio gira entre 120 e 350 kg ha⁻¹ ano⁻¹ (Formentini *et al.*, 2008). Godoy e Santos (2011) destacaram que o sistema radicular dos genótipos de vida curta é menos desenvolvido e os genótipos eretos apresentam raízes laterais em menor quantidade. O guandu apresenta caule forte, lenhoso e com reserva de amido na fase vegetativa, porém, ao iniciar a fase reprodutiva, essa reserva se mobiliza para o preenchimento das vagens (Godoy; Santos, 2011).

2.2.3. Cultivar estudada: BRS Mandarin

A cultivar BRS Mandarin, de acordo com as empresas fornecedoras de sementes, apresentam características, condições de exploração e indicações distintas e, em alguns aspectos, semelhantes.

De acordo com Sementes Caiçaras (2011), o feijão-guandu apresenta as seguintes características e condições para exploração: a princípio, não é bem aceito pelos animais, mas depois eles se acostumam; no início do amadurecimento das vagens, deve ser cortado para forragem; o corte deve ser feito de 15 a 50 cm do solo, evitando-se corte rente, que poderá levar à morte ou à rebrota demorada e fraca; adapta-se a ampla faixa de solos, desde que bem drenados; regiões com precipitação de 500 a 2.000 mm, germinação de 15 a 30 dias, dependendo das condições climáticas e fixação de 200 kg ha⁻¹ano⁻¹ de nitrogênio.

Para a Wolf Seeds (2011a), o feijão-guandu cv. BRS Mandarin apresenta características semelhantes às citadas pelas Sementes Caiçara, destacando-se, porém, que pode produzir em altitude de até 1.000 m e precipitação anual acima de 900 mm, ciclo de florescimento de 150 dias, destaca-se devido à tolerância alta à seca, média ao frio, baixa à umidade e média ao sombreamento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar eficiência simbiótica de rizóbios para feijão guandu (*Cajanus cajan*) em casa de vegetação.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar rizóbios de feijão-guandu de diferentes solos em casa de vegetação;
- Selecionar os rizóbios mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio para feijão-guandu;
- Identificar as espécies de rizóbios mais eficientes para feijão-guandu.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de estudo

O experimento foi realizado em casa de vegetação e, situado na sede da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na AM-010, no município de Manaus, no Amazonas ($2^{\circ}53'25''\text{S}$ e $59^{\circ}58'06''\text{W}$).

4.2. Coleta de solo

Foram coletadas amostras de solo na estação experimental do Caldeirão em áreas de Terra Preta de Índio (TPI) e Terra Mulata (TM) em Iranduba, AM ($03^{\circ} 17' 05'' \text{ S}$; $60^{\circ} 11' 10'' \text{ W}$). 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. Foi feita 3 repetições em cada ambiente, e cada repetição era composta por 5 buracos distantes por 5 metros entre eles. (Figura 1).

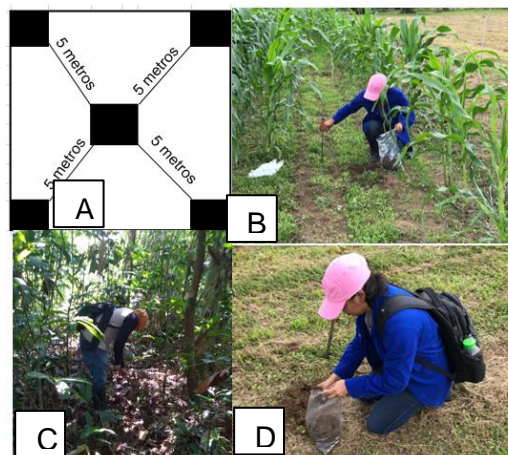


Figura 1 - Na figura A está esquematizado como foram feitas as coletas, na figura B o ambiente de plantio de milho na terra-mulata, na figura C o ambiente de floresta com terra-preta e na figura D é ambiente de plantio de mandioca com terra-mulata. Acervo próprio.

4.3. Culturas-armadilha

As amostras de solo foram utilizadas na preparação de culturas-armadilha usando feijão-gandu 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 15 mL/copo de solução nutritiva de Franco e Dobereiner (1967) sem nitrogênio.

De acordo com Franco e Dobereiner (1967), a solução nutritiva utilizada foi: 0,07 g/L de K_2HPO_4 , 0,08g de KH_2PO_4 , 0,10 g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,12 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,15 g/L de $Na_2HO_4 \cdot 12H_2O$, 10 mL de FeNaEDTA, 1,0 mL de micronutrientes, conferindo se o pH está próximo a 7,0.

Para o preparo de FeNaEDTA foi dissolvido 3,72 g de NaEDTA + 3,78 g de $Fe SO_4 \cdot 7H_2O$ em 900 mL de água destilada aquecida a 80 °C até dissolução completa. Deixando esfriar e completar o volume para 1 litro.

Para o preparo da solução de micronutrientes foram usados 2,86 g/L de H_3BO_3 , 2,08 g/L de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,22 g/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,08 g/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e 0,11 g/L de Na_2MoO_4 .

4.4. Isolamento dos nódulos

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 na placa com 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.

O meio de extrato de levedura-manitol-ágar (AML) (Fred e Waksman, 1928) com adição do corante azul de bromotimol ou vermelho-congo, onde contém: 5,0 g L^{-1} de manitol, 0,5 g L^{-1} de K_2HPO_4 , 0,2 g L^{-1} de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g L^{-1} de NaCl, 0,5 de extrato de levedura, 15 g L^{-1} de ágar e 1.000 g L^{-1} de água destilada.

4.4.1. Manutenção de colônias

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).

4.5. Avaliação da Eficiência Simbiótica

Para avaliar a eficiência simbiótica foi realizado 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 da massa seca da parte aérea e nódulos (número e massa de nódulos) ocorreram 45 dias após a inoculação. Durante esse período, as plantas receberam 50mL/copo da solução nutritiva de Norris sem nitrogênio (Norris e Date, 1976). A eficiência e a eficácia simbiótica foram obtidas pelas fórmulas (Faria e Franco, 2002):

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

, onde 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.

4.5.1. Massa seca da parte aérea

A massa seca da parte aérea, ou biomassa aérea, foi determinada seguindo onde a parte aérea foi separada da raiz e colocada em um saco de

papel *kraft*, e então foi colocada em uma estufa com circulação de ar forçada por 48 horas a uma temperatura variando entre 65-70 °C. Após o material foi seco em estufa e pesado em balança de precisão, onde cada saco foi pesado 3 vezes e tirado a média posteriormente.

4.5.2. Nódulos

Para a nodulação a metodologia foi semelhante à da parte aérea, sendo diferente somente no início, onde os nódulos foram contados antes de irem aos sacos de papel *kraft*, mas a secagem e a pesagem foram feitas de maneira semelhante.

4.5.3. Caracterização morfológica e testes bioquímicos dos isolados

Os rizóbios isolados foram inoculados em meio de cultura AML contendo azul de bromotimol como indicador. Nesse meio com indicador observou-se a mudança de coloração, onde as cores azul e amarelo indicam alcalinização e acidificação, respectivamente. Além disso, os rizóbios que alcalinizaram o meio foram classificados como de crescimento lento e os que acidificaram como de crescimento rápido (Martins *et al.*, 1997). De acordo com o tempo de crescimento das colônias incubadas em placas de Petri a 28 °C são consideradas rápidas quando crescem em até 3 dias, intermediárias em até 5 dias, moderadas em até 9 dias e lentas iguais ou superiores a 10 dias.

Os isolados foram testados bioquimicamente para catalase e oxidase. A catalase converte peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Esse teste consiste na adição de peróxido de hidrogênio sobre uma lâmina contendo o isolado bacteriano. Em seguida, observa-se a formação ou não de bolhas. Após essa observação classifica-se o isolado como catalase positivo ou negativo (Atlas, 2010). Já a oxidase foi determinada usando tiras de papel estéril. As tiras foram inoculadas com cada isolado com o auxílio de uma alça de platina. Após

2 minutos, observou-se a formação de coloração violeta da tira, que indica que o isolado apresenta oxidase positiva (Tonne, 2011).

Antes de iniciar a coloração de Gram, foi assegurado de que o esfregaço estivesse seco. Foi coberto o esfregaço com violeta-de-metila e deixado por aproximadamente 15 segundos, depois foi adicionado igual quantidade de água sobre a lâmina coberta com violeta-de-metila e deixado para agir por mais 45 segundos, então foi escorrido o corante e lavado em um filete de água corrente, depois foi coberto a lâmina com lugol diluído e deixado para agir por aproximadamente 1 minuto, então foi escorrido o lugol e lavado em um filete de água corrente, e adicionou-se álcool etílico (99,5° GL) sobre a lâmina, descorando-a, até que não desprenda mais corante, foi lavado em um filete de água corrente, e coberto a lâmina com safranina e deixado para agir por aproximadamente 30 segundos, então lavou-se em um filete de água corrente, e deixado para secar ao ar livre, e então foi lido em um microscópio óptico com óleo de imersão na lente de 100x (Bartholomew *et al.*, 1965).

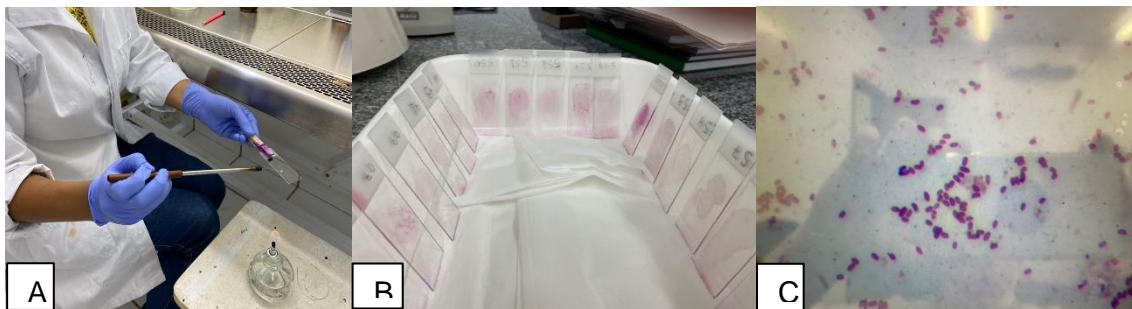


Figura 2 - Na figura A como foi feito o teste de catalase e oxidase Na figura B são as lâminas prontas para leitura do teste de coloração de Gram, Na figura C é uma imagem do microscópio já com a Gram colorida. Acervo próprio.

4.5.4. Solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada em placas de Petri contendo meio de levedura-manitol-ágar (Vincent, 1970) sem adição de fosfato de potássio monohidratado (K_2HPO_4) e suplementando com 0,1% de fosfato tricálcico [$Ca_3(PO_4)_2$]. O inóculo para esse teste foi produzido em frascos com meio ML (manitol-levedura) líquido sob agitação constante a 120 rpm, a 28 °C durante 48 horas. A inoculação nas placas foi realizada com alíquotas de 20 μ L com duas repetições por isolado. As placas foram incubadas em estufa durante 7 dias a uma temperatura de 28 °C, observou-se a formação de um halo

transparente o isolado com a capacidade de solubilização do fosfato pelo isolado.

4.5.5. Produção de auxinas

Para determinação de produção de ácido indolacético (AIA), os isolados foram inoculados em meio AML com 50 mg de triptofano/litro, depois foram incubados durante 72 horas em estufa bacteriológica a 28-30°C sob agitação a 120 rpm. Após o período de incubação, foi adicionado 50 ml do caldo bacteriano em um tubo e acrescentado mais 50 ml da solução de Salkowski. A curva-padrão de AIA com meio AML em ordem crescente foi preparada. A leitura da produção de AIA foi realizada em um espectrofotômetro na faixa de absorvância de 535 μm (Asghar *et al.*, 2002).

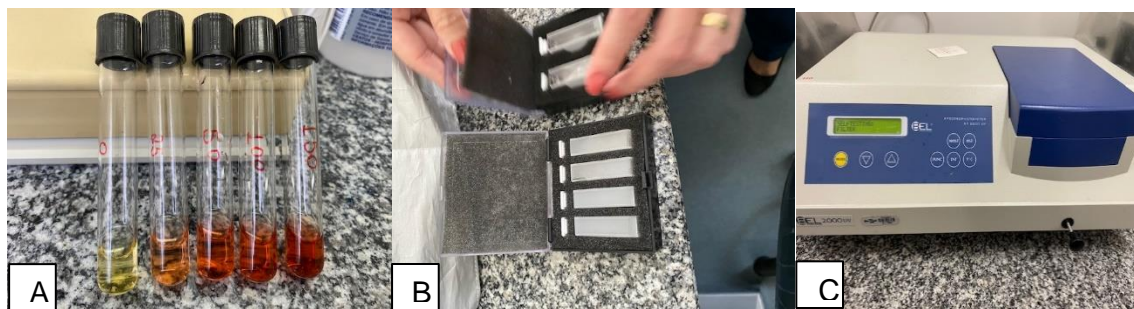


Figura 3 - Na figura A é possível ver as cubetas onde foi feita as leitura do teste de produção de auxinas, na figura B está a curva-padrão para o teste e na figura C está a espectrofotômetro utilizado. Acervo próprio.

4.6. 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 submetidos a análise de variância e ao teste de separação de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$). (Scott & Knott, 1974).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que 19 (95%) dos isolados foram oxidase negativa enquanto 17 (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 foi uma reação da 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% acidificam, 45% alcalinizam e 5 % mantém o pH neutro. A acidificação do meio foi diferente da observada em Sergipe com diferentes rizóbios para feijão-guandu, onde 81 % dos isolados acidificaram o meio de cultura (Fernandes e Fernandes, 2000). No entanto, outros estudos relatam 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 YMA, é frequentemente uma característica para distinção dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* que possuem a propriedade de tornar o meio de cultura ácido, enquanto que *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* tornam o meio alcalino (Lima et al., 2012).

Esta alteração de pH promovida pelo rizóbio no meio AML pode ser em decorrência do uso preferencial de açúcares, pelos rizóbios de crescimento rápido, acompanhada da excreção de ácidos orgânicos e compostos nitrogenados pelos rizóbios de crescimento lento, resultando na liberação de cátions (Coutinho et al., 1999; Martins et al., 1997).

Em relação à velocidade de crescimento, 18 (90%) são considerados rápidos, e nenhum apresentou crescimento além do 7º dia. Autores como Degefu et al., (2018) também encontraram resultados parecidos, trabalhando com *C. cajan*, com relação a velocidades de crescimento onde os seus isolados eram de crescimento rápido ou moderado, corroborando outro estudo similar de Anand e Dogra (1991), onde o feijão guandu produziu nódulos com rizóbios de rápido e

moderado crescimento, indicando que o feijão guandu não é seletivo para realizar a uma associação simbiótica para fixação biológica de nitrogênio.

Junto a esta grande diversidade, cerca de 90% apresentaram velocidade de crescimento rápido em meio de cultura e 55% acidificaram o meio, dados semelhantes encontrados por Pereira (2000) e Chagas-Júnior (2007) com solos de áreas de floresta amazônica.

Todas as estirpes apresentaram forma circular, elevação plana, borda inteira superfície lisa e cor opaca. Martins *et al.*, (1997) afirmou que geralmente as estirpes de rizóbios, independente da forma da colônia, possuem borda lisa ou inteira. Englesham *et al.*, (1987) em estudo na África sugeriu a correlação de isolados com produção de goma como característicos de ambientes com pH mais baixo e maior precipitação pluviométrica.

A Gram de 15 (75%) dos isolados é negativa. O gênero *Rhizobium* é descrito como bactérias gram-negativas, aeróbias, com capacidade de nodular as leguminosas. Pertencem à subdivisão alfaproteobactérias, que inclui as bactérias de crescimento rápido, o que as diferencia do gênero *Bradyrhizobium*, mas sem a caracterização genética não é possível afirmar que esses isolados são pertencentes ao gênero *Rhizobium*. (Zakhia & Lajudie, 2001).

Dentre os isolados, 13 (65%) são solubilizadores de fosfato, e dentre esses 8 apresentaram acidificação do meio. A capacidade dos isolados de rizóbios solubilizarem o fosfato de cálcio está relacionada com a diminuição do pH do meio pelos ácidos orgânicos (Mikanova & Kubat, 1999; Mikanova, 2000). Estudos evidenciaram que a capacidade dos isolados de rizóbios em solubilizar o fosfato está correlacionada com a diminuição do pH do meio de corrente da formação de ácidos orgânicos (Mikanová; Nováková, 2002; Hara;Oliveira, 2005). (Tabela 1).

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	Aquosa	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	Gomosa	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 AIA também foi verificada em outros rizóbios isolados na região amazônica na cultura do feijão-caupi (Chagas-Junior et al., 2009). No entanto, a produção de AIA foi importante, pois contribuiu com o desenvolvimento radicular de diferentes plantas. Outros estudos também relataram que a produção de AIA por *Azospirillum* contribuiu na absorção de nutrientes pelas raízes (Dobbelaere et al., 1999).

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 ($p < 0,05$)

Os isolados E11919, E11819, E10119, E11519, E12619 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 fornece uma explicação para a eficiência da simbiose rizóbios-leguminosa (Freitas *et al.*, 2011). Além disso, observou que esses nódulos podem ser pequenos e não funcionais e acarretarem em um dreno de fotoassimilados (Atkins, 1984). E ainda, um grande número de nódulos não representa 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 parecidos com relação 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 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. Resultados semelhantes encontrados por Martins *et al.* (2012), onde foram usados isolados nativos do Mato Grosso do Sul e estirpes com adição de nitrogênio.

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 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.

Dentre os mais eficazes, os isolados E11919, E11819, E11519 são oriundos do latossolo amarelo, enquanto as estirpes E12219 e E10119 são provenientes da terra-preta coletada da floresta.

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

<i>Isolado</i>	<i>NNOD</i>	<i>MSN_(mg)</i>	<i>MSPA_(mg)</i>	<i>Eficiência</i>	<i>Eficácia</i>
	----- Número/planta)- -----	-----mg/planta-----			
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)

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a maioria dos isolados de feijão-guandu testados são oxidase negativas 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 e E12219 promovem uma maior produção de nódulos (número e massa de nódulos), bem como, produção de massa seca da parte aérea em feijão-guandu e são, portanto, os mais eficazes na fixação biológica do nitrogênio.

7. REFERÊNCIAS

- Akanvou, R.; Kropff, M.J.; Bastiaans, L.; Becker, M. 2002. Evaluating the use of two contrasting legume species as relay intercrop in upland rice cropping systems. *Field Crops Research* 74:23-36.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 3389–3402.
- Alves, S.M.C. et al. 2004. Balanço do nitrogênio e fósforo em solo com cultivo orgânico de hortaliças após a incorporação de biomassa de guandu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 39 (11):1111-1117.
- Amabile, R.F.; Fernandes, F.D.; Pimentel, A.d P.M. 2008. Avaliação da resposta de genótipos de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) na região do Cerrado. *Revista Ceres*, Viçosa, MG, 55 (3):231-235, Maio/Jun.
- Ambrosano, E.J. et al. 2005. Utilization of nitrogen from green manure and mineral fertilizer by sugarcane. *Sci Agric*.
- Anand, R.C.; Dogra, B.C. 1991. Physiological and biochemical characteristics of fast-and slow-growing *Rhizobium* sp. pigeon pea (*Cajanus cajan*). *J. Appl. Microbiol.* 70:197-202.
- Antoun, H.; Beauchamp, C.J.; Goussard, N.; Chabot, R.; Lalonde, R. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, v. 204, n. 1, p. 57-67.
- 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.
- Ayanaba, A.; Asanuma, S.; Munns, D.N. 1983. An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to acid-aluminium stress. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, 47:256-258.
- Azevedo, R.L.; Carvalho, C.A.L.; Marques, O.M. 2008. Insetos associados à cultura do feijão guandu na região do Recôncavo da Bahia, Brasil. *Revista Caatinga*, Mossoró, 21 (4):83-88.
- Azevedo, R.L.; Ribeiro, G.T.; Azevedo, C.L.L. 2007. Feijão guandu: uma planta multiuso. *Revista da FAPESSE*, 3 (2):81-86, jul.-dez.

- Bano, N.; Mussarat, J. 2003. Isolation and characterization of phorate degrading bacteria of agricultural significance. *Letters in Applied Microbiology*, v. 36, n. 6, p. 324-328.
- 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.
- Batista, F. de C. *et al.* 2016. Avaliação da produção de sideróforos por microrganismos endofíticos solubilizadores de fosfato de ferro associados à cultura de milho. *FERTBIO 2016 "Rumo aos novos desafios"*. Goiânia – Goiás.
- Beekham, A., Umaharan, P. 2010. Inheritance and combining ability studies of pod physical and biochemical quality traits in vegetable pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Euphytica*, 176, 37–47.
- Bekere, W.; Kebede, T.; Dawud, J. 2013. Growth and nodulation response of soybean (*Glycine max* L.) to lime, *Bradyrhizobium japonicum* and nitrogen fertilizer in acid soil at Melko, South Western Ethiopia. *Int J Soil Sci* 8: 25–31.
- Beltrame, T.P.; Rodrigues, E. 2007. Guandu bean (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) on tropical forest restoration. *Semina: Ciências Agrárias*, 28:19-28.
- Bouhmouch, I.; Souad-Mouhsine, B.; Brhada, F.; Aurag, J. 2005. Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *J Plant Physiol* 162:1103–1113.
- Brasil. Decreto 7.390, de 9 de dezembro de 2010. (Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/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.
- Brockwell, J. 1981. Can inoculant strains ever compete successfully with established soil populations? Amsterdam: *North Holland/ Elsevier*, 277-315.
- Campo, R.J.; Wood, M. 2001. Residual effects of successive exposure of soybean *Bradyrhizobium* strains to aluminum on solid defined medium. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 36 (11):1399-1407.
- Cantarella, H. 2007. Nitrogênio. Fertilidade do solo. Viçosa, MG: *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*. 375-470.
- Cedano, J. 2006. Guía Técnica Cultivo del Guandul. *CEDAF*, Santo Domingo, República Dominicana.
- 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.

Chagas Junior, A.F.; Oliveira, L.A. de; Oliveira, A.N.de. 2010. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 32, n. 1, p. 161-169.

Charpentie, H.; Doumbia, S.; Coulibaly, Z.; Zana, O. 1999. Fixation de l'agriculture au Nord et au centre de la Côte d'Ivoire: quels nouveaux systèmes de culture? *Agriculture Développement* 21: 41-70.

Combe, J. 1982. Agroforestry techniques in tropical countries potential and limitations. *Agroforestry Systems and International Journal*, Boston, 1: 37-51.

Costa, F.M.; Schiavo, J.A.; Brasil, M.S.; Leite, J.; Xavier, G.R.; Fernandes Jr.; P.I. 2014. Phenotypic and molecular fingerprinting of fast growing rhizobia of field-grown pigeonpea from the eastern edge of the Brazilian Pantanal. *Genet. Mol. Res.* 13, 469–482.

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.

Degefu, T.; Wolde-meskel, E.; Frostegard, A. 2013. Phylogenetic diversity of Rhizobium strains nodulating diverse legume species growing in Ethiopia. *Syst. Appl. Microbiol.* 36:272–280.

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

Dubey, R.C.; Maheshwari, D.K.; Kumar, H.; Choure, K. 2010. Assessment of diversity and plant growth promoting attributes of rhizobia isolated from *Cajanus cajan* L. *Afr. J. Biotechnol.* 9:8619–8629.

Eaglesham, A.R.J.; Stowers, M.D.; Maina, M.L.; Goldman, B.J.; Sinclair, M.J.; Ayanaba, A. 1987. Physiology and biochemical aspects of diversity of Bradyrhizobium sp. (*Vigna*) from three west African soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.19, p.575-581.

Ejaz, S. *et al.* 2004. Endocrine disrupting pesticides: a leading cause of cancer among rural people in Pakistan. *Exp Oncol* 26:98–105.

España, M.; Cabrera-Bisbal, E.; López, M. 2006. Study of nitrogen fixation by tropical legumes in acid soil from Venezuelan Savannas using ¹⁵N. *Interciencia* 31:197– 201.

Fernandes, J.P.I. *et al.* 2012. Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Braz. J. Microbiol.* 43:1604-1612.

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

- Fernandes, M.F.; Fernandes, R.P.M.; Hungria, M. 2003. Genetic characterization of indigenous rhizobia strains from the coastal tableland efficient for the pigeonpea and cowpea crops. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 38:911–920.
- 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.
- Ferreira, P.A.A. *et al.* 2012. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. *World Journal Microbiology Biotechnology*, Dordrecht, 28(1):1947- 1959.
- Formentini, E.A. 2008. Cartilha sobre adubação verde e compostagem. Vitória: *Incaper*. 27p.
- Giller, K. 2001. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. Second edition. *CABI Publishing*. United Kingdom.
- Godoy, R.; Santos, P.M. 2011. *Cajanus cajan*. (Ed.). *Plantas forrageiras*. Editora UFV, Viçosa, Minas Gerais, 294-309.
- Gontang, E.A.; Fenical, W.; Jensen, P.R. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(10) 3272-3282.
- Gooding, H.J. 1962. The agronomic aspects of pigeon pea. *Field Crop Abstr.* 15:1–5.
- Guareschi, R.F. *et al.* 2011. Nodulação e crescimento vegetativo de feijão azuki (*Vigna angularis*) submetido a inoculação e adubação nitrogenada. *Global Science and Technology*, Rio Verde, 4(3):75-82.
- Guimarães, S. L., Cardinal, M. S., Bomfim-Silva, E. M., Polizel, A. C. 2015. Development of cv. BRS Novaera cowpea inoculated with rhizobium recommended for pigeonpea. *Científica*, v. 43, n. 2, p. 149-155.
- 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.
- Hameed, S.; YAsmin, S.; Malik, K. A.; Zafar, Y.; Hafeez, F. Y. 2004. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. *Biology and Fertility of Soils*, v. 39, n. 3, p. 179-185.
- 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.; Kinane, 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.

Hungria, M.; Araújo, S.R. 1994. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. *Brasília*: Embrapa/SPI.

Hungria, M.; Silva, K. da. 2011. Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. *Brasília*: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 21p.

Hungria, M.; Vargas, M.A.T. 2000. Environmental factors affecting N² fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, Amsterdam, 65:151-164.

Hungria, M.; Vargas, M.A.T.; Araujo, R.S. 1997. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. *Biologia dos solos dos Cerrados*. Planaltina: Embrapa-CPAC, 189-295.

Júnior, P.I.F.; De Oliveira, P.J.; Rumjanek, N.G.; Xavier, G.R. 2011. Poly- β -hydroxybutyrate and exopolysaccharide biosynthesis by bacterial isolates from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp] root nodules. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163:473-484.

Karanja, N.K.; Wood, M. 1988. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, Dordrecht, 112:15-22.

Kawaguchi, M.; Minamisawa, K. 2010. Plant-microbe communications for symbiosis. *Plant Cell Physiology* 51:1377-1380.

Kawai, F.; Zhang, D.; Sugimoto, M. 2000. Isolation and characterization of acid and Al-tolerant microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 189:143-147.

Khurana, A.L., Dudeja, S.S. 1981. Field populations of rhizobia and response to inoculation, molybdenum and nitrogen fertilizer in pigeonpea. *ICRISAT Centre*, Patancheru, India, 2:15-19.

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.

La Favre, A.K.; Eaglesham, A.R.J. 1986. The effects of high temperatures on soybean nodulation and growth with different strains of bradyrhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 32: 22-27.

Lammel, D.R., Cruz, L.M., Mescolotti, D., Stürmer, S.L., Cardoso, E. J. 2015. Woody Mimosa species are nodulated by Burkholderia in ombrophyllous forest soils and their symbioses are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *Plant and soil*, v. 393, n. 1-2, p.123-135.

Leblanc, H.A.; McGraw, R.L.; Nygren, P.; Le Roux, C. 2005. Neotropical legume tree *Inga edulis* forms N²-fixing symbiosis with fastgrowing *Bradyrhizobium* strains. *Plant Soil*, 275:123–133.

Leung, K.; Bottomley, P.J. 1994. Growth and nodulation characteristics of subclover (*Trifolium subterraneum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* bv.

trifolii at different water potentials. *Soil and Biology Biochemistry*, Oxford, v.26, p.805-812.

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.

Lin, M.; Gresshoff, P.M.; Ferguson, B.J. 2012. Systemic Regulation of Soybean Nodulation by Acidic Growth Conditions. *Plant Physiol*, 160: 2028–2039.

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.

Marra, L.M.; Soares, C.R.F.S.; Oliveira, S.M. de; Ferreira, P.A.A.; Soares, B.L.; Carvalho, R. de F.; Lima, J.M. de; Moreira, F.M.deS. 2012. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, v.357, p.289-307.

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.

Mary, P.; Dupuy, N.; Dohllhem-Biremon, C.; Defives, C.; Tailliez, R. 1994. Differences among *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains in tolerance to desiccation and storage at different relative humidities. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.26, p.1125-1132.

Masson-Boivin, C. *et al.* 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* 17:458–466.

Mendonça, E. de S. *et al.* 2016. Biological Nitrogen Fixation by Legumes and N Uptake by Coffee Plants. *Revista Brasileira Ciencia do Solo*. 2017: 41.

Menna, P.; Hungria, M.; Barcellos, F.G.; Bangel, E.V.; Hess, P.N.; Martinez-Romero, E. 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:315–332.

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 Vyroba*, 45(9): 407-409.
- Mikanová, O.; Nováková, J. 2002. Evaluation of the Psolubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostlinná Výroba*, v. 48, n. 9, p. 397-400.
- Miller, S.A.; Beed, F.D.; Harmon, C.L. 2009. Plant disease diagnostic capabilities and networks. *Annu Ver Phytopathol* 47: 15–38.
- Mohammadi, K.; Sohrabi, Y.; Heidari, G.; Khalesro, S.; Majidi, M. 2012. Effective factors on biological nitrogen fixation. *African Journal Agric Res* 7:1782–1788.
- Moulin, L.; Bena, G.; Boivin-Masson, C.; Stepkowski, T. 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30: 720–732.
- Nelson, M.S.; Sadowsky, M.J. 2015. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Front.Plant. Sci.* 6: 491.
- Nichols, J.D.; Carpenter, F.N. 2006. Interplanting Inga edulis yields nitrogen benefits to Terminalia Amazonia. *Forest Ecol Manag* 233: 344–351.
- Norris, D.O.; Date, R.A. 1976. Legume bacteriology. Tropical pasture research: principles and methods. Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, 134-174.
- Norris, D.O.; Date, R.A. 1976. Legume bacteriology. Tropical pasture research: principles and methods. *Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops*, 134-174.
- Octive, J.C.; Johson, A.C.; Wood, M. 1994. Effects of previous aluminium exposure on motility and nodulation by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Soilliology & Biochemistry*, 26: 1477-1482.
- Odeny, D.A. 2007. The potential of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Africa. *Nat. Resour. Forum*, 3: 297–305.
- Oldroyd, G.E. *et al.* 2011. The rule of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45: 119–144.
- Oliveira, A.L.M. *et al.* 2014. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. *Biochem Biotechnol Reports*. 3: 56-77.
- Oliveira, L.A.; Graham, P.H. 1990. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* using a nod+ fix-natural mutant. *Archives of Microbiology*, Berlin, 54: 305-310.
- Pal'ove-Balang, P.; Mistrik, I. 2011. Effect of aluminium on nitrogen assimilation in roots of *Lotus japonicus*. *Plant Biosyst*, 145: 527–531.
- Peoples, M.B.; Herridge, D.F.; Ladha, J.K. 1995. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant Soil*. 174: 3-28.

- 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. *Agropecuária Técnica*. 25: 25-36.
- Perret, X.; Staehelin, C.; Broughton, W. J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 180-201.
- 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.
- Provazi, M. *et al.* 2007. Descrição botânica de linhagens puras selecionadas de guandu. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 36 (2): 328-334.
- Ramsubhag, A.; Umaharan, P.; Donawa, A. 2002. Partial 16S rRNA gene sequence diversity and numerical taxonomy of slow growing pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp) nodulating rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 139–144, 2002.
- Raven, P.H.; Ray, F.E.; Eichhorn, S.E. 2001. *Biologia Vegetal*, 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Sanginga, N.; Wirkom, L.E.; Okogun, A.; Akobundu, I.O.; Carsky, R.J.; Tian, G. 1996. Nodulation and estimation of symbiotic nitrogen fixation by herbaceous and shrub legumes in Guinea savanna in Nigeria. *Biol. Fert. Soils* 23, 441–448.
- Saxena, K.B., 2008. Genetic improvement of pigeon pea: a review. *Tropical Plant Biology*. 1 (2), 159–178.
- Saxena, K.B., Sawargaonkar, S.L. 2014. First information on heterotic groups in pigeon pea *Cajanus cajan*. *Euphytica*, 200: 187–196.
- Scott, A.J; Knott, M.A. 1974. A cluster analysis method for grouping means in in the analysis of variance. *Biometrics*. Raleigh, 30:3 507-512.
- Seiffert, N.F.; Thiago, L.R.L.S. 1983. Legumineira Cultura Forrageira para produção de proteína. *Campo Grande/MS*: Embrapa Gado de Corte.
- Sementes Caiçara. Feijão-guandu (*Cajanus cajan*). (<http://www.sementescaicara.com.br/Sementes/Leguminosa/FeijaoG.pdf>). Acesso em: 07 de Agosto de 2018.
- Sharma, M. *et al.* 2012. *Alternaria tenuissima* causing *Alternaria blight* on pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] in India. *Plant Dis*. 96: 907.
- Silveira, A.P.D.; Cardoso, E.J.B.N. 2004. Arbuscular mycorrhiza and kinetic parameters of phosphorus absorption by bean plants. *Agricultural Science* 61: 203-209.
- 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.

- Singh, U. 1994. Processing and utilization of pigeonpea.. Annual Research Planning Meeting. *International Crops Research Institute for Semi-arid Tropics*, Nairobi, Kenya, 133-138.
- Soares, A.L. de; Ferreira, P.A.A.; Pereira, J.P.A.R.; Vale, H.M.M.do; Lima, A.S.; Andrade, M.J.B.de; Moreira, F.M.deS. 2006. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II – feijoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 16-21.
- Somasegaran P.; Hoben, H. 1994. Methods in Legume-rhizobium technology; *NIFTAL project*. Heidelberg, Germany.
- Soussi, M. *et al.* 2001. Effects of salinity on protein and lipopolysaccharide pattern in a salt – tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*. *Journal of Applied Microbiology*, Bedford, 90 (1): 476-481.
- Souza, F.H.D. *et al.* 2007. Produção de sementes de guandu. São Carlos: SP, *Embrapa Pecuária Sudeste*, 69: 68.
- Spence, J.A., Williams, S.J. 1972. Use of photoperiod response to change plant design. *Crop Sci.* 1: 121–122.
- Sprent, Janet. 2003. Plant biology: Mutual sanctions. *Nature*, v. 422, n. 6933, p. 672-674.
- Starkanova, G. *et al.* 1999. P-solubilization activity of *Rhizobium* species strains. *Rostlinna Vyroba*, 45: 403-406.
- Sylvester-bradley, R. *et al.* 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na amazônia. *Acta Amazônica*, Manaus, 1: 12-22.
- Tonne, E.J. 2011. Advances and enzymology and related áreas of molecular biology. Canada.
- Turk, D.; Keyser, H.H. 1992. Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. *Canadian Journal of microbiology*, v. 38, n. 6, p. 451-460.
- Udvardi, M.; Poole, P.S. 2013. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 64: 781-805.
- Valenzuela, H.; Smith, J. 2002. Pigeonpea. University of Hawaii, Honolulu, Hawaii. *Euphytica*, 200: 187-196.
- Van der Maesen, L.J.G. 2006. The potential of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L. Millsp.) in Africa. *Nat. Resour. Forum* 31: 297–305
- Varshney, R.K. *et al.* 2010. Pigeonpea genomics initiative (PGI): an international effort to improve crop productivity of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Mol. Breed.* 26: 393-408.
- Versalovic, J. *et al.* 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and Cellular Biology*, 5: 25-40.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting Rhizobacteria as Biofertilizers. *Plant Soil*, 255: 571-586.

- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific, 164p.
- Watkin, E.L.J. *et al.* 2000. Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 1393-1403.
- Wolf Seeds. Feijão-guandu-mandarim (*Cajanus cajan* cv. BRS)Mandarim. (http://www.wolfseeds.com/pt_BR/produtos-servicos/semente/id/62/selected/6). Acesso em: 07 de Agosto de 2011.
- Wolff, A.B. *et al.* 1991. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 12: 170-176.
- Wood, M. A. 1995. Mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. *Dordrecht: Kluwer*, 173-179.
- Xavier, G.R. *et al.* 1998. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 27: 386-392.
- Zakhia, F.; Lajudie, P. 2001. Taxonomy of Rhizobia. *Agronomie*, Oxford, v. 21, n. 6, p. 569–576.