



ELAINE MARTINS DA COSTA

**POTENCIAL DE PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO VEGETAL E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI EM SOLOS DO
SUDOESTE PIAUIENSE**

LAVRAS – MG

2013

ELAINE MARTINS DA COSTA

**POTENCIAL DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E
DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI EM SOLOS DO SUDOESTE
PIAUIENSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Coorientadora

Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Costa, Elaine Martins da.

Potencial de promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos do Sudoeste piauiense / Elaine Martins da Costa. – Lavras : UFLA, 2013.

149 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Endofíticas. 3. Ácido-3-indol acético. 4. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 5. Solubilização de fosfatos inorgânicos. 6. Bactérias simbióticas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

ELAINE MARTINS DA COSTA

**POTENCIAL DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E
DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI EM SOLOS DO SUDOESTE
PIAUIENSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 04 de março de 2013.

Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega	UFPI
Dr. Messias José Bastos de Andrade	UFLA
Dr. Bruno Lima Soares	UFLA

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2013**

*A Deus, fonte de luz e sabedoria, que sempre iluminou o meu
caminho, dando-me forças para superar os desafios*

OFEREÇO

*A todos que sempre acreditaram na concretização deste
ideal, em especial aos meus pais, as minhas irmãs e aos meus
sobrinhos (Ingrid, Felipe, Lucas e Gabriela)*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho nesta conquista.

À minha família, pelo incentivo e apoio durante toda a minha vida.

À minha orientadora, Professora Dr^a Fatima Maria de Souza Moreira e à minha coorientadora Professora Dr^a Rafaela Simão Abrahão Nóbrega, pela oportunidade, apoio, incentivo, aprendizado e confiança.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao projeto do edital MCT 15/2007 (CNPq) e à Universidade Federal do Piauí pela concessão das bactérias utilizadas neste trabalho.

Ao projeto do edital 64 (MAPA), pelo financiamento desta pesquisa.

Ao professor Dr. Messias José Bastos de Andrade e ao Dr. Bruno Lima Soares, pela participação na banca examinadora deste trabalho e sugestões apresentadas.

A todos os colegas do laboratório de Microbiologia do Solo e do Departamento de Ciência do Solo, pelo apoio, amizade e convivência.

Aos técnicos Marlene e Manuel, pelo auxílio prestado e amizade.

À Fernanda, Jaqueline, André e Lucas, pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos professores e colegas do Campus de Bom Jesus, Piauí, pelo apoio e incentivo.

Aos parentes e amigos, que sempre torceram por mim.

Ao meu namorado Leandro, pelo apoio e carinho.

Às colegas de república, Isabel, Helane e Mirian, pelo apoio e amizade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para essa conquista.

Muito Obrigada !!!

RESUMO GERAL

A fixação biológica de nitrogênio, assim como outros processos biológicos mediados por algumas bactérias simbióticas e não simbióticas podem contribuir de forma significativa para melhoria da nutrição vegetal nos diferentes agroecossistemas. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de promoção do crescimento vegetal por bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos de Várzeas e Chapadas do Sudoeste piauiense; selecionar entre as simbióticas, as eficientes em fixar nitrogênio em simbiose com plantas de soja e feijão-caupi e caracterizar geneticamente as bactérias mais eficientes na promoção do crescimento vegetal por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Avaliou-se a capacidade de 53 de estirpes (30 oriundas de solos de Várzeas e 23 de solos de Chapadas), incluindo simbióticas e não simbióticas, em realizar os seguintes processos: fixação biológica de nitrogênio em vida livre; solubilização de fosfatos inorgânicos de cálcio, alumínio e ferro e produção de ácido-3-indol acético (AIA) em meio 79 e DYGS, na ausência e presença do aminoácido triptofano (100 mg L^{-1}). Avaliaram-se também essas estirpes, em condições axênicas, quanto à capacidade nodulífera, eficiência simbiótica e/ou capacidade promotora do crescimento de plantas de soja e feijão-caupi, em experimentos conduzidos em garrafas *long neck* (500 ml) e vasos de Leonard, respectivamente. Nenhuma das estirpes fixou nitrogênio em vida livre; a maioria foi capaz de solubilizar o fosfato de cálcio *in vitro*. Considerando ambos os meios de cultivo (79 e DYGS), 81% das estirpes oriundas de solos de Várzeas e todas as estirpes oriundas de solos de Chapadas sintetizaram AIA quando na presença do triptofano. Em relação às estirpes oriundas de solos de Várzeas, apenas uma nodulou plantas de soja, sendo esta eficiente, e cinco não nodulíferas se destacaram na promoção do crescimento dessa espécie; dez estirpes nodularam plantas de feijão-caupi, porém, todas promoveram aumento da matéria seca total das plantas, em relação ao controle sem nitrogênio mineral. Quanto às estirpes oriundas de solos de Chapadas, nenhuma nodulou plantas de soja, no entanto, 42% foram capazes de promover o crescimento dessa espécie, e em plantas de feijão-caupi, somente duas nodularam, porém, a maioria (88%) das estirpes promoveu aumento da matéria seca da parte aérea, em relação ao controle sem nitrogênio mineral. O sequenciamento do gene 16S rRNA identificou as estirpes nodulíferas como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Bacillus* e *Paenibacillus* e as não nodulíferas promotoras do crescimento vegetal como pertencentes aos gêneros *Citrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Endofíticas. Solubilização de fosfatos inorgânicos. Ácido-3-indol acético. *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

GENERAL ABSTRACT

The biological nitrogen fixation, as well as other biological processes mediated by some non-symbiotic and symbiotic bacteria may contribute significantly to improving plant nutrition in different agroecosystems. In this context, the present study aimed: assess the potential for plant growth promotion by symbiotic and non-symbiotic bacteria isolated from cowpea nodules grown in floodplains and highlands soils from Piauí Southwest, select the most efficient in symbiotic N₂ fixation with soybean and cowpea, and sequence the 16S rRNA gene of the bacteria more efficient in promoting plant growth. We evaluated the capacity of fifty-three strains (thirty derived from floodplains soils and twenty-three derived from highlands soils) including symbiotic and non-symbiotic, in making the following processes: free-living biological nitrogen fixation, solubilization of inorganic phosphates of calcium, aluminum and iron and production of indole-3-acetic acid (IAA) in medium 79 and DYGS in the absence and presence of tryptophan (100 mg L⁻¹). We also evaluated these strains in axenic conditions regarding to their ability nodulation, symbiotic efficiency and/or ability promoting plant growth of soybean and cowpea in experiments conducted in *long neck* bottles (500 ml) and Leonard jars, respectively. No one of strains fixed nitrogen in free-living, most were able to solubilize calcium phosphate *in vitro*. Considering both culture medium (79 and DYGS), 80% of the strains from floodplains soils and all strains from soils highlands synthesized IAA when in the presence of tryptophan. Regarding the strains from floodplains soils, only one nodulated soybean plants, which was efficient, and five non-nodulating excelled in promoting the growth of this species; ten strains nodulate cowpea plants, but all promoted increased total dry biomass compared to control without mineral nitrogen. Regarding strains from highlands soils, no one nodulate soybean plants, however, 42% were able to promote the growth of the plants of this species. In cowpea plants, only two nodulate, but most (88%) of the strains caused an increase in shoot dry biomass compared to control without mineral nitrogen. The sequencing of the 16S rRNA gene, identified the nodulating strains as belonging to the genera *Bradyrhizobium*, *Bacillus* and *Paenibacillus* and non nodulating promoting plant growth strains as belonging to the genera *Citrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* and *Enterobacter*.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Endophytic. Inorganic phosphate solubilization. Indole-3-acetic acid. *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução Geral	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A cultura do feijão-caupi no estado do Piauí	15
2.2 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico	17
2.3 Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para cultura do feijão-caupi	20
2.4 Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas	22
2.5 Diversidade genética de bactérias fixadora de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL)	24
2.6 Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal	26
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 2 Potencial de promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos de Várzeas do Sudoeste piauiense	38
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86
CAPÍTULO 3 Potencial de promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi no Cerrado piauiense	94
1 INTRODUÇÃO	97
2 MATERIAL E MÉTODOS	100
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
4 CONCLUSÕES	135
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
REFERÊNCIAS	137
ANEXOS	145

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 Halos de solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP promovidos pelas estirpes: a) UFLA 03 09 (controle positivo), b) UFPI B5-8A e c) UFPI B5-6, após 15 dias de incubação a 28°C.....57

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 Halo de solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP (a), crescimento sem halo de solubilização em meio GES contendo fosfato de alumínio (b) e em meio GELP contendo fosfato de ferro (c) pela estirpe UFPI CB10-9, incubada por 15 dias, a 28°C108

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- TABELA 1 Solubilização de CaHPO_4 , $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ e $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos de Várzeas sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense 56
- TABELA 2 Produção de ácido-3-indol acético (AIA) pelas estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos de Várzeas sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense, cultivadas em meio 79 e em meio DYGS.....61
- TABELA 3 Número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST) e eficiência em relação ao controle nitrogenado (EFCN) e ao controle sem nitrogênio mineral (EFSN) obtidos em plantas de soja inoculadas com estirpes isoladas de solo de Várzeas do Sudoeste piauiense.....68
- TABELA 4 Número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), eficiência em relação ao controle nitrogenado (EFCN) e ao controle sem nitrogênio mineral (EFSN) obtidos em plantas de feijão-caupi inoculadas com estirpes isoladas de solo de Várzea do Sudoeste piauiense 74
- TABELA 5 Identificação das estirpes, simbióticas e não simbióticas, isoladas de nódulos de feijão-caupi, baseada nas sequências mais similares encontradas no *GenBank* (NCBI)..... 84

CAPÍTULO 3

- TABELA 1 Solubilização de CaHPO_4 , $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ e $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense..... 107
- TABELA 2 Produção de ácido 3-indol acético (AIA) pelas estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense, cultivadas em meio 79 e em meio DYGS.....113

TABELA 3 Número de nódulo (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), eficiência em relação ao controle nitrogenado (EFCN) e ao controle sem nitrogênio mineral (EFSN) obtidos em plantas de soja inoculadas com estirpes isoladas de solo do Sudoeste piauiense	121
TABELA 4 Número de nódulo (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), eficiência em relação ao controle nitrogenado (EFCN) e ao controle sem nitrogênio mineral (EFSN) obtidos em plantas de feijão-caupi inoculadas com estirpes isoladas de solos do Sudoeste piauiense	126
TABELA 5 Identificação das estirpes, simbióticas e não simbióticas, isoladas de nódulos de feijão-caupi, baseada nas sequências mais similares encontradas no <i>GenBank</i> (NCBI).....	134

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa de grande importância agrícola, apresentando ampla adaptação edafoclimática, versatilidade e excelente valor nutritivo. No cenário agrícola do estado do Piauí, essa cultura apresenta lugar de destaque na produção, ocupando uma área de aproximadamente 242,5 mil hectares (CONAB, 2008), porém, a produtividade é bastante variável em função dos agroecossistemas de cultivo e níveis tecnológicos adotados. No Pólo de Produção de Bom Jesus, situado na região Sudoeste do Estado, o feijão-caupi vem sendo explorado há mais de 10 anos em diferentes agroecossistemas; em áreas de Várzeas, sendo o cultivo vinculado a pequenos produtores, e em áreas de Chapadas, em que o cultivo é realizado por médios e grandes produtores, com adoção de um maior nível tecnológico (MARTINS, 2011a). Para ambos os agroecossistemas mencionados, assim como para outros sob cultivos intensivos, é de fundamental importância a adoção de tecnologias de baixo custo que possam garantir, ao mesmo tempo, o aumento da produtividade das culturas e a sustentabilidade das áreas de cultivo.

A utilização da prática da inoculação com as estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio atualmente autorizadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) como inoculantes para o feijão-caupi (INPA 3-11B, UFLA 3-84, BR 3267 e BR3262), representa uma das alternativas mais promissoras para o aumento da produtividade dessa cultura, podendo substituir totalmente a adubação nitrogenada (ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; SOUSA; MOREIRA, 2011). Também já foi demonstrado que estirpes eficientes em feijão-caupi podem nodular eficientemente plantas de soja (MIGUEL; MOREIRA, 2001). Porém, nem sempre são observadas respostas positivas com a utilização dessas estirpes

(COSTA, 2011), pois vários fatores edafoclimáticos podem interferir na sobrevivência e atividade das mesmas. Assim, no sentido de aumentar a contribuição do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), para a cultura do feijão-caupi, e também de outras leguminosas de importância agrícola, é necessária a seleção de novas estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL) que, além de eficientes em fixar o N_2 , sejam competitivas e adaptadas aos diferentes agroecossistemas de cultivo.

Além da seleção de BFNNL, é de grande interesse agrônomo também a identificação de bactérias com potencial para aumentar a disponibilidade de outros nutrientes e/ou eficiência de utilização dos fertilizantes minerais, visando melhorar a nutrição vegetal, de forma econômica e sustentável. Nesse sentido, estudos relacionados às rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) têm aumentado cada vez mais, nos últimos anos, pois são capazes de influenciar na nutrição das plantas através de diferentes mecanismos. Estas podem ocorrer livremente na rizosfera e/ou endofiticamente, incluindo bactérias não simbióticas e até mesmo algumas BFNNL. Entre os diferentes processos mediados pelas RPCPs, que podem melhorar a nutrição e o crescimento vegetal, destacam-se: a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis, a produção de sideróforos, a síntese de fitohormônios, principalmente o ácido-3-indol acético (AIA) e evidentemente a FBN, no caso das bactérias diazotróficas.

Aliado ao conhecimento dos mecanismos de atuação e do potencial de promoção do crescimento vegetal por bactérias simbióticas e não simbióticas, é crucial o conhecimento da diversidade genética dessas bactérias, visando à exploração das mesmas, como insumos biológicos para culturas de interesse agrícola.

No estado do Piauí, são poucos os estudos relacionados à seleção (JESUS, 2012; MARTINS, 2011a; MARTINS, 2011b) e diversidade genética de BFNNL (SANTOS et al., 2011; ZILLI et al., 2004), e em relação às RPCPs nativas, ainda

não existe registro na literatura quanto à diversidade genética das mesmas. Nos agroecossistemas do Sudoeste piauiense, em que o feijão-caupi vem sendo cultivado há vários anos, espera-se selecionar estirpes nativas eficientes na FBN e/ou com potencial para promover o crescimento do feijão-caupi, e também de outras espécies vegetais cultivadas na região, como a soja (*Glicine max*). A avaliação da diversidade genética, através de técnicas moleculares, como o sequenciamento do gene 16S rRNA, poderá contribuir para o conhecimento da composição taxonômica dessas estirpes, além da possibilidade de identificação de novas estirpes de bactérias, simbióticas ou não, com potencial para exploração biotecnológica.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de promoção do crescimento vegetal por bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos de Várzeas e Chapadas do Sudoeste piauiense; selecionar, entre as simbióticas, as eficientes em fixar nitrogênio em simbiose com plantas de soja e feijão-caupi; e caracterizar geneticamente as bactérias mais eficientes na promoção do crescimento vegetal por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA.

As bactérias utilizadas nesse trabalho foram obtidas a partir do projeto do edital MCT 15/2007 (CNPq), o qual teve como proposta geral a avaliação do diagnóstico químico e físico dos solos e eficiência de populações e estirpes de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio em áreas sob cultivo de feijão-caupi no Pólo de Produção de Bom Jesus, PI.

Esse trabalho também faz parte do projeto do edital 64 (MAPA), que teve como proposta a avaliação da eficiência de inoculantes microbianos de leguminosas em regiões inexploradas e de métodos para seu controle de qualidade e inspeção visando à expansão de seu uso na agricultura brasileira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do feijão-caupi no estado do Piauí

O feijão-caupi, conhecido também como feijão-macáçar, feijão-de-corda ou feijão-miúdo, é uma planta pertencente à família *Fabaceae*, gênero *Vigna*, e espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (VERDCOURT, 1970). Essa espécie é originária da África e apresenta ampla distribuição mundial, sendo cultivada em mais de 65 países, em regiões tropicais e subtropicais (SINGH et al., 2002). É uma excelente fonte alimentar, contendo bons teores de proteínas, carboidratos, vitaminas e fibras dietéticas, além de possuir baixa quantidade de gordura (FROTA et al., 2008), representando um alimento básico na alimentação humana. Este pode ser usado também como forragem na alimentação animal, e ainda como adubo verde na recuperação de solos naturalmente pobres em fertilidade.

Estima-se que a produção mundial de feijão-caupi é cerca de 3,6 milhões de toneladas, obtida em 11,3 milhões de hectares, destacando-se como maiores produtores a Nigéria, o Níger e o Brasil (SINGH et al., 2002). No Nordeste brasileiro, essa leguminosa se destaca como cultura adaptada e de importância socioeconômica para pequenos e médios agricultores, com uma produção de 429 toneladas (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005). Apesar do destaque em produção, a produtividade média do feijão-caupi, nessa região, é muito baixa, situando-se em torno de 317 kg ha⁻¹ (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005).

Entre os estados do Nordeste, o Piauí é o segundo maior produtor nacional de feijão-caupi, com uma área plantada de aproximadamente 242,5 mil hectares e produção de 64,8 toneladas (CONAB, 2008). Nesse Estado, o feijão-caupi é bem adaptado às condições de solo e clima, podendo alcançar altas produtividades com a utilização de alto nível tecnológico. Segundo Freire Filho

et al. (2007), resultados obtidos em diversas regiões mostram que com a utilização de tecnologias como a irrigação, correção do solo e fertilização, um hectare de feijão-caupi pode alcançar rendimentos médios superiores a 2.500 kg ha⁻¹, independentemente da época do ano e local do Estado onde ocorre o cultivo.

Apesar dessa perspectiva, a produtividade média atual no Estado é pequena, em relação à estimada pela pesquisa, variando de 246 a 650 kg ha⁻¹, conforme a safra e o sistema de cultivo (CONAB, 2008), embora em algumas regiões, as produtividades sejam mais elevadas. Dentre os Pólos de Produção do Estado, o de Bom Jesus do Gurguéia, situado na região Sudoeste, em área de transição entre os biomas Cerrado e Caatinga, englobando as áreas de cultivo de 10 municípios, tem se destacado na produtividade do feijão-caupi, tanto no cultivo de 1^a safra quanto de 2^a safra, com média de 763 kg ha⁻¹ (FREIRE FILHO et al., 2007).

No Pólo de Produção de Bom Jesus do Gurguéia, o feijão-caupi, vem sendo amplamente explorado em diferentes agroecossistemas, com distintos níveis tecnológicos. Nas Várzeas, que são áreas situadas próximas às margens do Rio Gurguéia, o cultivo vem sendo realizado há mais de 30 anos por pequenos agricultores, predominando como agricultura de subsistência, com baixo nível tecnológico, sem utilização de corretivos, fertilizantes e qualquer tipo de inoculante microbiano. Já nas áreas de Chapadas, também denominadas de terras altas, o cultivo vem sendo realizado por médios e grandes produtores, estrategicamente, após a colheita da cultura do arroz ou da soja, como cultura “safrinha” (MARTINS, 2011a). De maneira geral, nas áreas de Chapadas, o feijão-caupi tem apresentado maior produtividade em relação às áreas de Várzeas, pois além da utilização dos nutrientes residuais dos cultivos antecessores, essa cultura pode estabelecer simbiose eficiente com estirpes inoculantes utilizadas anualmente nos cultivos da soja (ZILLI et al., 2011).

2.2 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes de maior importância para manutenção e funcionamento dos ecossistemas. É um macronutriente primário requerido em grande quantidade pelos vegetais, atuando em várias reações bioquímicas importantes que ocorrem na planta e como componente estrutural de macromoléculas, como proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos, entre outros. No ar atmosférico, o N é o elemento mais abundante (cerca de 78%). Apesar desse grande reservatório, o N atmosférico encontra-se na forma N_2 , fonte gasosa não acessível a todos os organismos eucariotos e à maioria dos procariotos, que requerem formas combinadas (NH_4 e NO_3) para o sua manutenção e atividade.

A transformação do N_2 a formas combinadas pode ser realizada através de três processos: fixação atmosférica, fixação industrial e fixação biológica. A fixação atmosférica refere-se às descargas elétricas, que ocorrem naturalmente. A fixação industrial refere-se à produção de fertilizantes nitrogenados, que além da utilização de combustíveis fósseis, requerem elevadas temperatura e pressão no processo de fabricação, tornando-os muito caros. Já a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo natural, mediado por um grupo restrito de procariotos que possuem a enzima nitrogenase, tornando-os capazes de quebrar a tripla ligação da molécula do N_2 para obter a forma inorgânica combinada NH_3 que pode, assim, tornar-se disponível as plantas e outros organismos.

Apesar da contribuição dos processos industriais para o fornecimento de N aos sistemas agrícolas e florestais, a FBN é o processo que contribui com a maior parte do N fixado anualmente no planeta, cerca de 65% do total (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Além do aspecto econômico, a FBN apresenta diversas vantagens ecológicas em relação à fixação industrial. Ao contrário da FBN, que é um processo barato e sem impacto ambiental, os fertilizantes

nitrogenados minerais, além de caros, podem promover danos ambientais, quando manejados inadequadamente.

Os organismos fixadores de N_2 , também denominados de diazotróficos, apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética, garantindo a ocorrência da FBN nos mais diversos tipos de ecossistemas. Eles podem ser de vida livre, formar associações e/ou simbiose com outros organismos. De modo geral, a maior contribuição da FBN, para organismos que não fixam o N_2 , ocorre quando são estabelecidas interações, como as associações e principalmente simbioses (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Entre as bactérias diazotróficas simbióticas, aquelas que nodulam leguminosas destacam-se, visto a ampla diversidade, distribuição geográfica e utilização das plantas dessa família e a maior eficiência do processo devido à formação estruturas especializadas nas raízes e/ou no caule, chamadas nódulos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Quando em simbiose, ocorre uma parceria de troca mútua entre o macro e microssimbionte, em que a leguminosa fornece carboidratos como fonte de carbono e energia para o crescimento e atividade das bactérias nodulíferas, e estas, em troca, fornecem o N parcial ou total necessário ao crescimento e produção das leguminosas. No entanto, nem todas as espécies de leguminosas são capazes de nodular.

Algumas espécies de leguminosas, como o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e siratro (*Macroptilium atropurpureum*) podem ser infectadas por diferentes gêneros de BFNNL (GUIMARÃES et al., 2012; JARAMILLO, 2010; LIMA et al., 2009; MOREIRA, 2006; SILVA, 2012), enquanto outras espécies, como a *Sesbania virgata*, são extremamente específicas (MOREIRA et al., 2006). As estirpes de BFNNL também podem variar de altamente específicas até altamente promíscuas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A inoculação de leguminosas com estirpes de BFNNL eficientes pode resultar em diversos benefícios para os sistemas agrícolas e florestais, tais como: aumento na produção vegetal (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006), recuperação de áreas degradadas (MAESTRE et al., 2006) e incremento da fertilidade e da matéria orgânica do solo (HOEFSLOOT et al., 2005). Entretanto, a curto prazo, o principal benefício da FBN está associado à economia no uso de fertilizantes nitrogenados industrializados. A FBN é capaz de substituir total ou parcialmente os adubos nitrogenados em algumas espécies de leguminosas nodulíferas, e isso viabiliza o cultivo dessas espécies, com redução dos custos de produção, além de minimizar os impactos ambientais decorrentes do manejo inadequado daqueles adubos. No Brasil, o melhor exemplo de utilização desse processo é a cultura da soja, na qual a adubação química nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, o que representou, em 2006, uma economia para o país de cerca de US\$ 3,3 bilhões, considerando uma área de 21 milhões de hectares, onde se produziu 57 milhões de toneladas de grãos (MOREIRA, 2010).

Além do benefício proveniente da FBN, algumas estirpes de BFNNL podem beneficiar o hospedeiro através da liberação de substâncias promotoras de crescimento vegetal. A estimulação pode ser devido à produção de fitohormônios, como ácido-3-indol acético (AIA), giberelinas e citocininas, produção de exopolissacarídeos e solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis (BOMFETI et al., 2011; HARA; OLIVEIRA, 2004; MARRA et al., 2011; OLIVEIRA, 2009). No trabalho de Oliveira (2009), entre as 51 estirpes avaliadas, incluindo simbióticas e não simbióticas, a maior biossíntese de AIA ($42,28 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi obtida com estirpe UFLA 04-0321 (*Bradyrhizobium japonicum*), fitossimbionte eficiente de feijão-caupi. Marra et al. (2011) reportaram a capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis

(CaHPO₄ e AlH₆O₁₂P₃) por duas das estirpes inoculantes do feijão-caupi, UFLA 3-84 (*Bradyrhizobium* sp.) e BR 3267 (*Bradyrhizobium japonicum*), e uma estirpe inoculante do feijão comum, CIAT 899^T (*Rhizobium tropici*).

2.3 Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para cultura do feijão-caupi

O feijão-caupi é uma espécie promíscua, sendo capaz nodular e fixar o N₂ em simbiose com vários gêneros de BFNNL, incluído *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Burkholderia*, *Azorhizobium* e *Mesorhizobium* (GUIMARÃES et al., 2012; MOREIRA, 2006; SOARES, 2009; ZHANG et al., 2007; ZILLI et al., 2006). Além dos gêneros mencionados, alguns estudos recentes têm relatado a nodulação do feijão-caupi por outros gêneros que, apesar de abundantes no solo e serem reconhecidamente eficientes em promover o crescimento vegetal através de outros processos diferentes da FBN, ainda não são reconhecidos como nodulíferos de leguminosas. Dentre esses, destacam-se os gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* (JARAMILLO, 2010) e *Paenibacillus* (MARRA et al., 2012).

Apesar da promiscuidade do feijão-caupi, os inoculantes autorizados (BRASIL, 2011) até o presente para essa cultura são produzidos a partir de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*: INPA 3-11B (*Bradyrhizobium elkani*), UFLA 3-84 (*Bradyrhizobium* sp.), ambas isoladas de solos da Amazônia e testadas quanto à eficiência simbiótica (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006), BR 3267 (*Bradyrhizobium japonicum*), isolado do Semi-árido nordestino (MARTINS et al., 2003) e BR 3262 (*Bradyrhizobium* sp.), isolada de um sistema integrado de produção agroecológica, situado no Rio de Janeiro, e avaliada quanto à sua eficiência simbiótica (ZILLI et al., 2006).

O feijão-caupi é uma cultura capaz de beneficiar-se amplamente da FBN, de modo que a utilização de inoculantes, contendo BFNNL eficientes,

pode dispensar a utilização de fertilizantes nitrogenados, e resultar em aumento significativo do rendimento de grãos (ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; SOUSA; MOREIRA, 2011; ZILLI et al., 2009). Soares et al. (2006), verificaram aumento no rendimento de grãos do feijão-caupi (cv. BR 14 Mulato) em Perdões, MG, quando inoculado com as estirpes INPA 3-11B e UFLA 3-84. Estas proporcionaram uma produtividade de 949 e 950 kg ha⁻¹, respectivamente, sendo superiores à testemunha sem N mineral e sem inoculação, que obteve produtividade de apenas 341,80 kg ha⁻¹. Zilli et al. (2009), em cultivos experimentais, no estado de Roraima, verificaram que a estirpe BR 3267 foi capaz de proporcionar rendimento de grãos de feijão-caupi (cv. BRS Amapá) semelhante à aplicação de 50 kg ha⁻¹ de N no plantio ou 80 kg ha⁻¹ de N, parcelado em duas vezes. Almeida et al. (2010), em ensaio conduzido no município de Teresina, PI, utilizando a cultivar de feijão-caupi BR 17 Gurguéia, verificaram rendimento de grãos de 1.637,08 kg ha⁻¹ para o tratamento inoculado com a estirpe BR 3267 e de 1.823,92 kg ha⁻¹ para o tratamento inoculado com a estirpe BR 3262, promovendo aumentos de 24,63 e 38,86%, respectivamente, em relação à testemunha sem N e sem inoculação. Segundo Sousa e Moreira (2011), a inoculação do feijão-caupi com a estirpe INPA 3-11B no município de Confresa, MT, possibilitou um aumento significativo no rendimento de grãos, havendo um incremento de mais de 41%, comparada à produtividade da testemunha sem N mineral e sem inoculante, apresentando-se como alternativa viável para redução dos custos de produção de forma sustentável.

Embora apresente ampla capacidade na FBN, nem sempre são observadas respostas positivas com o uso de inoculantes em campo, em razão de o feijão-caupi apresentar baixa especificidade na nodulação, e também devido à interferência das condições edafoclimáticas na atividade das estirpes inoculantes. Em estudo conduzido no Sudoeste piauiense, em que se avaliou a

eficiência agronômica das estirpes inoculantes INPA 3-11B, UFLA 3-84, BR 3267 e BR 3262 na cultivar de feijão-caupi, BRS Guariba, não foi verificado aumento no rendimento de grãos dos tratamentos inoculados em relação ao controle sem inoculação (COSTA, 2011).

A alta densidade populacional de estirpes nativas, que competem pela ocupação dos sítios de infecção nas raízes das plantas hospedeiras, pode ocasionar diminuição na eficiência da fixação e no fornecimento de N para a planta, uma vez que os nódulos serão constituídos por estirpes de eficiência variável (BOGINO et al., 2008; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Quando a espécie nodulífera é promíscua, como o feijão-caupi, pode dificultar a introdução e estabelecimento de uma simbiose eficiente entre as estirpes inoculantes e a planta hospedeira (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Portanto, para essa cultura, a seleção de estirpes que combinem habilidade na FBN, adaptação a diversas condições edafoclimáticas e alta competição por sítios de infecção nodulares é importante para a produção de inoculantes.

2.4 Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas

A adoção de tecnologias que permitam a conservação dos recursos naturais e proporcionem uma redução na utilização de insumos industrializados é um componente importante na sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Dentre os grupos de microrganismos que habitam o solo, com comprovado potencial de aquisição de nutrientes para as plantas, têm-se as BFNNL.

O processo de seleção de estirpes de BFNNL para uma determinada espécie de leguminosa envolve, de maneira geral, quatro etapas. Na primeira, são verificadas, em condições estéreis e controladas, a capacidade de nodular e fixar nitrogênio de um elevado número de estirpes testadas separadamente em recipientes menores com solução nutritiva livre de nitrogênio na forma mineral.

Na segunda etapa, estirpes selecionadas são testadas em vasos Leonard em casa de vegetação, utilizando substrato esterilizado. Essa etapa permite comprovar se o isolado é realmente nodulífero e obter uma avaliação preliminar do potencial de fixação de nitrogênio das BFNNL. As estirpes que apresentarem melhor performance serão avaliadas na terceira etapa, em vasos com solo não estéril, para verificação da eficiência simbiótica e capacidade competitiva das BFNNL testadas com as estirpes nativas do solo. Na última etapa, as estirpes selecionadas dos experimentos de vasos, serão testadas em condições de campo, em diferentes condições edafoclimáticas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Apesar de existirem no Brasil estirpes de BFNNL selecionadas para 94 espécies vegetais (BRASIL, 2011), a utilização da tecnologia de inoculação com esses microrganismos ainda é muito restrita no país, à exceção da soja. Portanto, é de fundamental importância a difusão dessa biotecnologia de baixo custo econômico, para outras leguminosas de importância agrícola, principalmente aquelas cultivadas por pequenos agricultores, como o feijão-caupi. Um dos maiores objetivos das pesquisas com relação à FBN é ampliar a utilização da biotecnologia de inoculação nas leguminosas que já possuem inoculantes específicos e recomendados, e também, a seleção de novas estirpes de BFNNL adaptados às diferentes regiões do Brasil e que sejam eficientes na FBN.

A inoculação de leguminosas nodulíferas com estirpes BFNNL eficientes na FBN representa uma importante estratégia para o aumento da produção nos sistemas agrícolas, com baixo custo econômico. No entanto, as BFNNL são sensíveis aos distúrbios como os introduzidos pelas práticas agrícolas (JESUS et al., 2009), além de serem afetadas por diversos fatores bióticos (BOGINO et al., 2008; MELLONI et al., 2006; ZHANG et al., 2007) e abióticos (FERREIRA et al., 2012; GIBSON, 1971; HUNGRIA; VARGAS, 2000) e por características genéticas das plantas hospedeiras, podendo haver diferentes respostas quanto à capacidade nodulífera e à habilidade de fixar N_2

quando em simbiose com diferentes espécies hospedeiras, ou genótipos de uma mesma espécie (BELANE; DAKORA, 2009; LACERDA et al., 2004; XAVIER et al., 2006).

Devido à grande diversidade das condições edáficas e climáticas brasileiras e dos sistemas de uso da terra, é de grande importância a seleção de estirpes de BFNNL adaptadas a essa diversidade de condições, e que apresentem alta eficiência na fixação de N₂, alta capacidade competitiva com a população nativa por sítios de infecção e habilidade de fixar N₂ numa ampla faixa de hospedeiros. Estirpes de BFNNL com essas características representam um recurso genético valioso para aumentar a contribuição da FBN nos sistemas agrícolas.

2.5 Diversidade genética de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL)

Tendo em vista a contribuição das BFNNL para a sustentabilidade dos ecossistemas cultivados e naturais, a diversidade dessas bactérias tem sido investigada extensivamente (BALA; GILLER, 2006; GUIMARÃES et al., 2012; LAGUERRE et al., 1994; MOREIRA et al., 1993; MOREIRA et al., 1998; NÓBREGA, 2006). O estudo da diversidade das BFNNL pode contribuir para o conhecimento mundial sobre a distribuição dessas bactérias nos diferentes ecossistemas, e para identificação de estirpes com potencial biotecnológico, visando à otimização do processo de FBN.

A caracterização genotípica das BFNNL é bastante utilizada nos estudos de diversidade desses organismos. O emprego de técnicas da biologia molecular têm possibilitado a reorganização taxonômica e a identificação de novos gêneros e espécies de BFNNL. Atualmente, a maioria dos gêneros reconhecidos como nodulíferos pertencem à subclasse α -proteobactéria, incluindo: *Rhizobium*

(FRANK, 1889), *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Azorhizobium* (DREYFUS; GARCIA; GILLIS et al., 1988), *Sinorhizobium* (*Ensifer*) (CHEN; YAN; LI, 1988; WILLEMS et al., 2003), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Allorhizobium* (LAJUDIE et al., 1998), *Methylobacterium* (SY et al., 2001), *Devosia* (RIVAS et al., 2002), *Phyllobacterium* (VALVERDE et al., 2005), *Ochrobactrum* (TRUJILLO et al., 2005), *Shinella* (LIN et al., 2008), *Aminobacter* (MAYNAUD et al., 2012); *Microvirga* (ARDLEY et al., 2012), *Achromobacter* (GUIMARÃES et al., 2012). Porém, a evolução nos estudos de taxonomia de BFNNL revelou que algumas espécies de BFNNL pertencentes à subclasse β -proteobactéria, identificadas como *Burkholderia* sp. (MOULIN et al., 2001) e *Cupriavidus* sp. (CHEN et al., 2001), também estabelecem simbiose com leguminosas.

O sequenciamento de gene 16S, que codifica para o RNA ribossomal, tem sido amplamente empregado em estudos de diversidade e taxonomia de BFNNL (GUIMARÃES et al., 2012; JARAMILLO, 2010; LAGUERRE et al., 1994; MOREIRA; HAUKKA; YOUNG, 1998; SOARES, 2009). O gene 16S rRNA constitui um excelente marcador molecular, uma vez que os RNAs ribossomais são considerados cronômetros moleculares, pois são moléculas universais altamente conservadas evolutivamente e não sofrem influência de mudanças ambientais (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990). As sequências obtidas do gene 16S rRNA são comparadas a sequências de estirpes tipo das espécies conhecidas em bancos de dados, como o National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), sendo possível a identificação de gêneros/espécies de interesse e construção de árvore de similaridade filogenética. Porém, para alguns gêneros, a exemplo do *Bradyrhizobium*, somente o sequenciamento do 16S rRNA pode não ser suficiente para a identificação ao nível de espécie, requerendo mais testes moleculares para uma melhor discriminação ao nível de espécie. Em estudo

realizado por Guimarães et al. (2012), o sequenciamento do 16S rRNA revelou, para uma única estirpe, 100% de similaridade para quatro espécies de *Bradyrhizobium*.

2.6 Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) - Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) - são bactérias que ocorrem na rizosfera de uma determinada espécie vegetal e são capazes de estimular seu crescimento através de diferentes processos (KLOEPPER; SCHROTH, 1986). Elas podem ser de vida livre, associativas ou endofíticas, que são as colonizadoras dos tecidos internos dos vegetais, podendo ser ou não simbióticas (VESSEY, 2003).

As RPCPs podem favorecer o crescimento das plantas por meio de vários mecanismos, através de ação direta e/ou indireta. A ação direta envolve a produção de compostos fitoestimuladores pela bactéria e/ou atuação em alguns processos que resultam no aumento da disponibilidade de certos nutrientes no ambiente para nutrir as plantas. Entre os processos com efeito direto no crescimento vegetal, destacam-se: fixação do N₂ atmosférico, produção de fitohormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, (OLIVEIRA, 2009; VESSEY, 2003; XIE; PASTERNAK; GLICK, 1996), e solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis, podendo aumentar a eficiência de utilização dos adubos fosfatados e a disponibilidade de fósforo no solo (HARA; OLIVEIRA, 2004; MARRA et al., 2012; OLIVEIRA, 2011; SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). Os mecanismos indiretos estão relacionados à prevenção contra a ação de microrganismos patogênicos, através da competição e/ou produção de antibióticos (SHANAHAN et al., 1992), e a produção de sideróforos, que pode auxiliar as plantas na absorção de íons de ferro, quando há a deficiência deste no meio (CARSON et al., 1992). Esses processos podem ser realizados por

diferentes bactérias, porém uma única bactéria pode atuar em dois ou mais dos mecanismos mencionados, podendo promover o crescimento das plantas pela ação direta e indiretamente.

De maneira geral, dentre o grupo das RPCPs, as bactérias endofíticas apresentam maior eficiência na atuação dos processos promotores do crescimento vegetal, em relação às bactérias de vida livre e associativas, e isso se deve ao fato de que as endofíticas estão protegidas contra estresses ambientais e competição microbiana no solo (MCINROY; KLOEPPER, 1995). As bactérias endofíticas são definidas como sendo aquelas capazes de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar infecções sintomáticas sobre o seu hospedeiro, e que tenham sido isoladas a partir de tecidos de plantas esterilizados superficialmente (HALLMANN et al., 1997). A compreensão do papel ecológico e da diversidade funcional dessas bactérias é de grande interesse, visando à exploração do potencial das mesmas para fins de utilização na produção agrícola sustentável.

Nas últimas décadas, vários trabalhos têm relatado a ocorrência de bactérias endofíticas não simbióticas dentro dos nódulos de leguminosas (IBÁÑEZ et al., 2009; KAN et al., 2007; LI et al., 2008; LIMA et al., 2009; MURESU et al., 2008; SILVA, 2012; STURZ et al., 1997). Possivelmente, essas bactérias entram nos tecidos vegetais juntamente com os rizóbios e vivem dentro dos nódulos por pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, sem prejudicar visivelmente as plantas hospedeiras (HALLMANN et al., 1997). Tem sido sugerido que algumas bactérias endofíticas de nódulos não simbióticas poderão evoluir para bactérias simbióticas através da aquisição de genes simbióticos dos rizóbios, por meio de transferência lateral de genes no interior de nódulos (LI et al., 2008). Apesar de muitas evidências em relação à ocorrência dessas bactérias dentro dos nódulos de leguminosas, ainda são poucos os dados em relação às funções que esse grupo de microrganismos desempenha, no sentido de promover

o crescimento vegetal. Dentre os processos promotores do crescimento vegetal, já descritos para essas bactérias, os mais citados na literatura têm sido a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis, a produção de fitohormônios, principalmente o AIA e efeito sinérgico na simbiose entre rizóbios e leguminosas (IBÁÑEZ et al., 2009; LI et al., 2008; MARRA et al., 2012; SILVA, 2012).

Para avaliação da diversidade genética das bactérias não simbióticas endofíticas de nódulos, assim como para as BFNNL, também tem sido muito utilizado o sequenciamento do gene 16S rRNA. Entre as de maior ocorrência nos nódulos de leguminosas destacam-se as pertencentes ao gênero *Agrobacterium* (KAN et al., 2007; LI et al., 2008; MHAMDI et al., 2005; WANG et al., 2006). Outros gêneros de ocorrência frequente são: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Paenibacillus* (IBÁÑEZ et al., 2009; LI et al., 2008; MURESU et al., 2008; SILVA, 2012).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. L. G. et al. Produtividade do feijão-caupi cv. BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 364-36, 2010.
- ARDLEY, J. K. et al. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary and Microbiology**, Maharashtra, v. 62, p. 2579-2588, 2012.
- BALA, A.; GILLER, K. E. Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Germany, v. 76, p. 319-330, 2006.
- BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Measurement of N₂ fixation in 30 cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes under field conditions in Ghana, using the ¹⁵N natural abundance technique. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 48, p. 47-56, 2009.
- BOGINO, P. et al. Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. strain ins containing indigenous rhizobia. **Systematic & Applied Microbiology**, Washington, v. 56, p. 66-72, 2008.
- BOMFETI, C. A. et al. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, Viçosa, v. 35, p. 657-671, 2011.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: Dez. 2011.
- CARSON, K. C. et al. Siderophore and organic acid production in root nodule bactéria. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 157, p. 264-271, 1992.
- CHEN, W. M. et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fastgrowing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Ames, v. 38, n. 4, p. 392-397, 1988.

CONAB-**Companhia Nacional de Abastecimento**. Avaliação da safra agrícola 2009/2010, quarto levantamento. Rio de Janeiro, 2008.

COSTA, E. M. **Eficiência agrônômica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio em feijão-caupi cv. BRS Guariba no Pólo de Produção de Bom Jesus**, PI. 2011. 52 p. Monografia (Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2011.

COSTA, E. M. et al. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2011.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Ames, v. 38, n.1, p. 89-98,1988.

FERREIRA, P. A. A. et al. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal Microbiol Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 1947-59, 2012.

FRANK, B. Ueber dies pilzsymbiose der leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Stuttgart, v. 7, p. 332-346, 1889.

FREIRE FILHO, F. R. et al. **Caracterização de pólos de produção da cultura de feijão-caupi no estado o Piauí**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007. 28p. (Documento, 100).

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília-DF: Embrapa Informações tecnológicas, 2005. p. 519.

FROTA, K. M. G. et al. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 9, 2008.

GIBSON, A. H. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. **Plant Soil**, The Hague, (Spec. Vol.), p. 139-152, 1971.

GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, 2012.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 343-357, 2004.

HOEFSLOOT, G. et al. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown south african sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, The Hague, v. 277, p. 85-96, 2005.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 51-164, 2000.

IBÁÑEZ, F. et al. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 32, p. 49-55, 2009.

JARAMILLO, P. M. D. **Diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob agrofloresta na Amazônia Ocidental usando o caupi como planta isca**. 2010. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

JARVIS, B. D. W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium cicer*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshansense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Ames, v. 47, n. 3, p. 895-898, 1997.

JESUS, A. A. **Caracterização fenotípica e simbiótica de populações e estirpes de bactérias que nodulam *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong no Sudoeste do Piauí**. 2012. 80 p. Dissertação (Mestrado em solos e nutrição de plantas) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2012.

- JESUS, E. D. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME Journal**, London, v. 3, p. 1004-1011, 2009.
- JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn, 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. D. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Williams and Wilkins, 1984. p. 234-244.
- KAN, F. L. et al. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 188, p. 103-115, 2007.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth promoting rhizobacteria and LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 187-208, 1986.
- LACERDA, A. M. et al. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.
- LAGUERRE, G. et al. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 60, n. 1, p. 56-63, 1994.
- LAJUDIE, P. et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Ames, v. 48, n. 2, p. 369-382, 1998.
- LI, J. et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 40, p. 238-246, 2008.
- LIMA, A. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 319, p. 27-145, 2009.
- LIN, D. X. et al. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated

from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1409-1413, 2008.

MAESTRE, F. T. et al. Fertilization, and slurry inoculation promote recovery of biological crust function in degraded soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 365-377, 2006.

MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 603-609, 2011.

MARRA, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 353, p. 289-307, 2012.

MARTINS, L. V. **Eficiência simbiótica de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de solos da Várzea e do Cerrado Piauiense**. 2011b. 50 p. Monografia (Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2011b.

MARTINS, R. N. L. **Bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio em solos sob cultivo de feijão-caupi no Pólo de produção Bom Jesus- PI**. 2011a. 67 p. Dissertação (Mestrado em solos e nutrição de plantas) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2011a.

MARTINS, L. M. V. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003.

MAYNAUD, G. et al. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 35, n. 2, p. 65-72, 2012.

MELLONI, R. et al. 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. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 20, p. 235-246, 2006.

MCINROY J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, The Hague , v. 173, p. 337-342, 1995.

MHAMDI, R. et al. Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium* like strains. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, p. 105-111, 2005.

MIGUEL, D. L.; MOREIRA, F. M. S. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 873-883, 2001.

MOREIRA, F. M. S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, n. 1, p. 135-146, 1993.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, Amsterdam, v. 7, p. 889-895, 1998.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Ed.). **Manual de biologia dos solos tropicais: Amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010. p. 279-312.

MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford, CAB International Publishing, 2006, p. 237-270.

MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium doebereinae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 197-206, 2006.

MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of the subclass of proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 6850, p. 948-950, 2001.

MURESU, R. et al. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 383-400, 2008.

NÓBREGA, R. S. A. **Efeitos de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo, ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp.]**. 2006. 188 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

OLIVEIRA, S. M. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão-caupi, feijão comum e siratro**. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

OLIVEIRA, S. M. **Rizobactérias promovem o crescimento de feijoeiro-comum e de milho por diferentes processos**. 2011. 103 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

RIVAS, R. et al. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, 2002.

SANTOS, J. O. et al. Genetic diversity among native isolates of rhizobia from *Phaseolus lunatus*. **Annals of Microbiology**, Zhoushan, v. 61, p. 437-444, 2011.

SHANAHAN, P. O. et al. Isolation and characterization of an antibiotic-like compound from a *Fluorescent pseudomonas* and investigation of physiological parameters influencing its production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 353-358, 1992.

SILVA, A. T. **Diversidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de siratro**. 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SINGH, B. B. et al. Recent progress in cowpea breeding. In. FATOKUM, C. A. S. A.; TARAWALI, B. B. SINGH, P. M. KORMAWA, AND M. TAMÓ (editors). 2002. **Challenges and oportunittes for enhancing sustainable cowpea production. Proceedings of the World Cowpea Conference III held at the Internacional Institute of Tropical Agriculture (IITA)**, Ibadan, Nigeria, p. 4-8, 2002. IITA, Ibadan< Nigeria.

SOARES, A. L. L. et al. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 795-802, 2006.

SOARES, B. L. **Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio de diferentes procedências em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e sua identificação**. 2009. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SOUSA, P. M.; MOREIRA, F. M. S. Potencial econômico da inoculação de rizóbios em feijão-caupi na agricultura familiar: um estudo de caso. **Extensão**, Uberlândia, v. 10, n. 2, 2011.

SY, A. et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 214-220, 2001.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Quantitative survey of phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of grasses and legumes in the Amazon. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, p. 15-22, 1982.

STURZ, A. V. et al. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, p. 13-19, 1997.

TRUJILLO, M. E. et al. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupine* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, 2005.

VALVERDE, A. et al. *Phylobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 55, n. 5, p. 1985-1989, 2005.

VERDCOURT, B. Studies in the leguminosae-papilionoideae for the flora of tropical east África. IV. **Kew Bulletin**, London, v. 24, p. 507-69, 1970.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, p. 571-586, 2003.

WANG, L. L. et al. Endophytic occupation of root nodules and roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 436-443, 2006.

- WILLEMS, A. et al. Description of new Ensifer strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1207-1217, 2003.
- WOESE, C. R.; KANDLER, M. L.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v. 87, p. 4576-4579, 1990.
- XAVIER, G. R. et al. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 1, p. 25-33, 2006.
- XIE, H.; PASTERNAK, J. J.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizo-bacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. **Current Microbiology**, New York, v. 32, n. 1, p. 67-71, 1996.
- ZHANG, W. T. et al. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 201-210, 2007.
- ZILLI, J. E. et al. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, p. 49-758, 2009.
- ZILLI, J. E. et al. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, p. 739-742, 2011.
- ZILLI, J. E. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solos do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 811-818, 2006.
- ZILLI, J. E. et al. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 281-287, 2004.

CAPÍTULO 2

POTENCIAL DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI EM SOLOS DE VÁRZEAS DO SUDOESTE PIAUIENSE

RESUMO

Algumas bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas, assim como outras endofíticas de nódulos não simbióticas, são capazes de realizar diferentes processos biológicos que contribuem para crescimento vegetal. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de promoção do crescimento vegetal por bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos de Várzeas do Sudoeste piauiense; selecionar, entre as nodulíferas, as eficientes em fixar nitrogênio em simbiose com plantas de feijão-caupi e soja e caracterizar geneticamente as mais eficientes em promover o crescimento vegetal. Avaliou-se a capacidade de 27 estirpes, incluindo simbióticas e não simbióticas, em realizar os seguintes processos: fixação de nitrogênio em vida livre, em meio semi-sólido LO; solubilização de fosfatos inorgânicos de cálcio (meio NBRIP), alumínio (meio GES) e ferro (meio GELP) e produção de ácido-3-indol acético (AIA) em meio 79 e DYGS, na ausência e presença do aminoácido triptofano (100 mg L^{-1}). Essas estirpes foram avaliadas em condições axênicas quanto à capacidade nodulífera, eficiência simbiótica e/ou capacidade promotora do crescimento de plantas de soja e feijão-caupi. Para ambos os experimentos, o delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições. Entre as estirpes avaliadas, nenhuma fixou nitrogênio em vida livre, 81% foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* e a maior síntese de AIA ocorreu na presença da suplementação com triptofano no meio 79 e DYGS. Apenas uma estirpe (UFPI B3-4) foi capaz de nodular plantas de soja, formando simbiose eficiente. Em relação ao feijão-caupi, apenas oito estirpes nodularam, sendo que a UFPI B3-4 destacou-se na produção de matéria seca da parte aérea, apresentando desempenho semelhante à estirpe inoculante BR 3267, apesar da menor eficiência em relação ao controle com nitrogênio mineral e as outras duas estirpes inoculantes UFLA 3-84 e INPA 3-11B. De maneira geral, a maioria das estirpes promoveu o crescimento de plantas de soja e, principalmente, de feijão-caupi, porém apresentaram eficiência variável. Três das estirpes nodulíferas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Paenibacillus*. Entre as estirpes não nodulíferas promotoras do crescimento vegetal, foi possível a identificação dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus*.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Solubilização de fosfato. Ácido-3-indol acético. *Vigna unguiculata*. *Glicine max*.

ABSTRACT

Some nitrogen fixing bacteria nodulating legumes as well as other non-symbiotic endophytic nodules, are able to perform different biological processes that contribute to plant growth. The aim of this study was to evaluate the potential for promotion of plant growth by symbiotic and non-symbiotic bacteria isolated from nodules of cowpea grown in floodplains soils of the Piauí Southwest, select the most efficient in symbiotic N₂ fixation with soybean and cowpea and genetically characterize bacteria more efficient in promoting plant growth. We evaluated the ability of twenty-seven strains, including symbiotic and non-symbiotic, to perform the following processes: nitrogen fixation in free-living in semi-solid medium LO; inorganic phosphates solubilization of calcium (medium NBRIP), aluminum (medium GES) and iron (medium GELP) and production of indole-3-acetic acid (IAA) in medium 79 and DYGS in the absence and presence of tryptophan (100 mg L⁻¹). These strains were evaluated in axenic conditions for ability nodulation, symbiotic efficiency and/or ability for promoting growth of soybean and cowpea. For both experiments, the experimental design was completely randomized design with three replications. Among the strains tested, any fixed nitrogen in free-living, 81% were able to solubilize calcium phosphate *in vitro* and most synthesis in the IAA was presence supplemented with tryptophan in the medium 79 and DYGS. Only one strain (UFPI B3-4) was able to nodulate soybean plants, formed symbiosis efficiently. In relation to cowpea, only eight strains nodulate being that the UFPI B3-4 stood out in shoot dry matter, showing performance similar to that strain BR 3267, despite lower efficiency compared to treatment fertilized with mineral nitrogen and strains UFLA 3-84 and INPA 3-11B. In general, most strains promoted the growth of soybean plants and especially of cowpea, but showed variable efficiency. Three nodulating strains were identified as belonging to the genera *Paenibacillus*. Among the non-nodulating strains promote plant growth, was possible the identification the genera *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Paenibacillus*.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Phosphate solubilization. Indole-3-acetic acid. *Vigna unguiculata*. *Glicine max*.

1 INTRODUÇÃO

As Várzeas são áreas situadas às margens dos rios que, periodicamente, ficam alagados durante a época chuvosa e descobertas durante o período de seca. Nessas áreas, de maneira geral, os solos apresentam potencial produtivo variável, em função da composição orgânica, química, física e mineralógica dos mesmos (FAJARDO; SOUZA; ALFAIA, 2009; LIMA et al., 2006). No Sudoeste do estado do Piauí, as Várzeas constituem importantes ecossistemas agrícolas para pequenos produtores rurais, e entre as culturas exploradas, destaca-se o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], que vem sendo cultivado há mais de 30 anos e desempenhando relevante papel social e econômico para a população de baixa renda dessa região (MARTINS, 2011a).

Uma importante característica do feijão-caupi é a sua capacidade de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL), podendo beneficiar-se amplamente do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (COSTA et al., 2011; LACERDA et al., 2004; LIMA; PEREIRA; MOREIRA, 2005; SOARES et al., 2006). Porém, apesar de existirem atualmente quatro estirpes inoculantes do feijão-caupi, autorizadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011), nem sempre são observadas respostas positivas da inoculação na cultura (COSTA, 2011), uma vez que as condições edafoclimáticas brasileiras são bastante diversificadas, interferindo na capacidade de sobrevivência e eficiência simbiótica dessas estirpes. Além disso, o feijão-caupi é uma leguminosa promíscua (GUIMARÃES et al., 2012; MELLONI et al., 2006; MOREIRA, 2006), dificultando o estabelecimento de uma simbiose eficiente entre a planta e as estirpes inoculantes. Desse modo, no sentido de otimizar o processo de FBN na cultura do feijão-caupi, e também em outras leguminosas, como a soja

(*Glycine max*), cultivadas nos agroecossistemas brasileiros, são necessários estudos com a finalidade de selecionar BFNNL que, além de formarem simbioses eficientes com mais de uma planta hospedeira, apresentem boa capacidade competitiva e sejam tolerantes a estresses edáficos e climáticos predominantes nas áreas de cultivo.

Nos estudos de seleção e/ou outros relacionados às BFNNL têm sido relatada a coexistência de vários gêneros de bactérias não simbióticas endofíticas dentro dos nódulos de leguminosas (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; KAN et al., 2007; LI et al., 2008; LIMA et al., 2009; SILVA, 2012; TAURIAN et al., 2010). Alguns estudos têm mostrado que essas bactérias não simbióticas endofíticas de nódulos, assim como algumas estirpes de BFNNL, podem atuar no crescimento vegetal por meio de diversos mecanismos, como síntese de fitohormônios (HUNG et al., 2007; LI et al., 2008; OLIVEIRA, 2009; TAURIAN et al., 2010), solubilização de fosfatos inorgânicos (MARRA et al., 2012; OLIVEIRA, 2011), produção de sideróforos (CARSON et al., 1992), entre outros. Assim, na seleção de BFNNL é importante considerar, além da contribuição através do processo de FBN, o potencial dessas bactérias na realização de outros processos promotores do crescimento vegetal. Em relação às bactérias não simbióticas endofíticas de nódulos, também é de grande importância pesquisar e identificar a capacidade das mesmas como promotoras do crescimento vegetal, visando à seleção de estirpes com potencial biotecnológico de interesse agrícola.

Estudos relacionados à seleção e diversidade de BFNNL e/ou com potencial de promoção do crescimento vegetal são incipientes no estado do Piauí (JESUS, 2012; MARTINS, 2011a; MARTINS, 2011b, ZILLI et al., 2004). No trabalho de Martins (2011a), pôde-se observar uma grande diversidade, baseada nas características culturais, entre os isolados oriundos de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos de várzeas do Sudoeste piauiense. Também foi demonstrada boa eficiência de alguns desses isolados em simbiose com plantas de

feijão-caupi em experimento de autenticação (MARTINS, 2011b). Assim, a seleção e o levantamento da diversidade genética de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas e/ou com capacidade de atuação em diferentes processos promotores do crescimento vegetal, oriundas de solos de Várzeas do Sudoeste piauiense, pode fornecer informações importantes sobre o potencial biotecnológico e a composição taxonômica desses grupos de microrganismos. Além disso, o emprego de técnicas da biologia molecular tem possibilitado a identificação de novos gêneros e/ou espécies de bactérias simbióticas e não simbióticas que contribuem para o crescimento vegetal.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de promoção do crescimento vegetal por bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos de Várzeas do Sudoeste piauiense, e selecionar, entre as nodulíferas, as eficientes em fixar nitrogênio em simbiose com plantas de soja e feijão-caupi. Objetivou-se ainda caracterizar geneticamente as bactérias mais eficientes na promoção do crescimento vegetal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das estirpes

No presente estudo foram utilizadas 27 estirpes oriundas da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Estas foram isoladas por Martins (2011a) de nódulos de plantas de feijão-caupi, cultivar BR 17 Gurguéia, cultivadas em vasos com solos de Várzeas tradicionalmente cultivados com essa cultura no Pólo de Produção de Bom Jesus, Sudoeste do estado do Piauí. Ressalta-se que nesses solos nunca houve aplicação de qualquer tipo de inoculante. A identificação dos pontos de coleta, classe de solo, histórico das áreas e caracterização química das amostras de solos encontram-se em anexo (ANEXOS A e B). Essas áreas ficam situadas em região de transição, entre os biomas Cerrado e Caatinga. Utilizou-se como critério, para seleção dessas estirpes, a capacidade nodulífera (ANEXO C), eficiência simbiótica e/ou capacidade de promover o crescimento das plantas de feijão-caupi (BR 17 Gurguéia), em experimento de autenticação conduzido por Martins (2011b), em garrafas de vidro do tipo *long neck* (500 mL), utilizado solução nutritiva de Norris (NORRIS; DATE, 1976).

2.2 Características culturais das estirpes

As características culturais de cada estirpe, previamente caracterizadas por Martins (2011a) (ANEXO C), foram confirmadas em placas de petri contendo meio de cultura 79 sólido (FRED; WAKSMAN, 1928). Foram observados: tempo de crescimento, medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (rápido: 2 a 3 dias; intermediário: 4 a 5 dias; lento: 6 a 10 dias; muito lento: acima de 10 dias); modificação do pH do meio (acidificação,

alcalinização e neutralização); coloração das colônias; diâmetro médio das colônias isoladas e absorção de indicador conforme Moreira (1991).

2.3 Processos promotores do crescimento vegetal

As 27 estirpes selecionadas, foram avaliadas quanto aos seguintes processos promotores do crescimento vegetal: fixação biológica de nitrogênio em vida livre, capacidade de solubilizar fosfatos de cálcio, alumínio e ferro e produção de ácido-3-indol acético.

2.3.1 Fixação biológica de nitrogênio em vida livre

Para avaliação da capacidade de fixar nitrogênio em vida livre, as 27 estirpes e o controle positivo para formação de película, BR5401^T (*Azorhizobium doebereiner*), foram inoculadas em frascos contendo 10 mL de meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio - LO (DREYFUS; ELMERICH; DOMMARGUES, 1983) contendo a seguinte composição (L⁻¹): lactato de sódio 10 g; K₂HPO₄ 1,67 g; KH₂PO₄ 0,87 g; NaCl 0,05 g; MgSO₄.7H₂O 0,1 g; CaCl₂ 40 mg; FeCl₃ 4 mg; MoO₄Na.2H₂O 5 mg; biotina 10 mg; ácido nicotínico 20 mg; ácido pantotênico 10 mg, elementos traços 2 mL, com pH 6,8. O manitol também foi testado como fonte de carbono, em substituição ao lactato, no meio LO.

Os frascos foram incubados por sete dias no escuro, a 28°C, para verificação da formação da película na região superficial do meio. As estirpes foram comparadas ao controle positivo (BR 5401^T), sendo consideradas positivas aquelas que formaram película e negativas as que não formaram película.

2.3.2 Solubilização de fosfatos de cálcio, alumínio e ferro insolúveis

As 27 estirpes foram avaliadas quanto à capacidade para solubilização de fontes inorgânicas insolúveis de fosfatos: CaHPO_4 (P-Ca), $\text{AlH}_6\text{O}_{12}\text{P}_3$ (P-Al) e $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (P-Fe). O meio utilizado para a solubilização de fosfato de cálcio foi o NBRIP (NAUTIYAL, 1999), contendo (L^{-1}): glicose 10 g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g; KCl 0,2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g. Foi utilizada a estirpe UFLA 03 09 (*Acinetobacter* sp.) como controle positivo de solubilização de P-Ca (MARRA et al., 2012). A capacidade de solubilização de fosfato de alumínio foi avaliada em meio GES (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982) contendo (L^{-1}): glicose 10 g; extrato de solo 100 mL; MgSO_4 (10%) 2 mL; CaCl_2 (1%) 2 mL; NaCl 1 mL ; solução de micronutrientes 2 mL ($\text{Ca}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,235 g; H_3BO_3 0,28 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,008 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,024 g dissolvidos em 200 mL de água destilada); Fe-EDTA (1,64%) 4 mL L^{-1} ; KNO_3 0,1 g L^{-1} ; ágar 20 g L^{-1} , acrescido de 3,04 g L^{-1} de $\text{AlH}_6\text{O}_{12}\text{P}_3$ e pH ajustado para 4,5. Para avaliação da capacidade solubilizadora de fosfato de ferro foi utilizado o meio de cultura GELP contendo (L^{-1}): glicose 10 g; extrato de levedura 0,05 g; peptona bacteriológica 5 g; extrato de solo 100 mL; MgSO_4 0,2 g; CaCl_2 0,02 g; NaCl 0,1 g; KNO_3 0,1 g; Fe-EDTA 4 mL; $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,89 g; solução de micronutrientes 2 ml, ágar 15 g e pH ajustado para 7,0.

Para obtenção dos inóculos, as estirpes foram crescidas em meio “79” líquido sem o corante azul de bromotimol, por três dias, sob agitação de 110 rpm, a 28°C. Após o crescimento das estirpes, ajustou-se a densidade óptica (DO) para 0,5 com o auxílio da escala Mc Farland nº 2, acrescentando solução salina (0,85%) para atingir a turbidez desejada. Após a padronização, foram aplicados 20 μL de suspensão das células, em quatro pontos equidistantes, em placas de Petri com 9,5 cm de diâmetro já contendo os meios com os fosfatos

precipitados, separadamente. Para cada estirpe foram utilizadas duas placas para cada meio, totalizando oito repetições. A cada três dias, foi realizada a medição do diâmetro do halo de solubilização (área translúcida em torno da colônia) e da colônia correspondente ao halo, utilizando-se um paquímetro digital, por um período de 15 dias. A partir dessas medidas, foram obtidos os índices de solubilização $(IS) = \text{Ø halo (mm)} / \text{Ø colônia (mm)}$ (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976). Com base nos índices de solubilização, as estirpes foram classificadas como sendo de baixa ($IS > 2$ mm), média ($2 \leq IS < 4,0$ mm) e alta ($IS > 4$ mm) capacidade de solubilização. De acordo com o início da solubilização, as estirpes foram também classificadas como precoces (início da solubilização até o terceiro dia), tardias (início da solubilização a partir do terceiro dia) e não solubilizadoras (não apresentaram solubilização visível até o décimo quinto dia de avaliação).

2.3.3 Produção de Auxina (ácido-3-indol acético - AIA)

As 27 estirpes, juntamente com o controle positivo *Azospirillum brasilense* (BR 11001^T), foram avaliadas quanto ao potencial de produção de AIA em meio “79”, sem o corante azul de bromotimol, e em meio DYGS, contendo (L^{-1}): glicose 2,0 g, ácido málico 2,0 g, peptona bacteriológica 1,5 g, extrato de levedura 2,0 g, K_2HPO_4 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g e ácido glutâmico 1,5 g. Como controle negativo utilizou-se frascos contendo os meios de cultivo sem inóculo, para verificação de possível contaminação.

As estirpes foram crescidas, em triplicata, por 72 horas, a 28°C, sob agitação de 110 rpm, isoladamente, nos meios “DYGS” líquido e “79” líquido, sem o corante azul de bromotimol. Após o crescimento, para cada estirpe crescida em ambos os meios de cultura ajustou-se a densidade óptica (DO) para 0,5 acrescentando solução salina (0,85%) para atingir a turbidez desejada. Após

a padronização, alíquotas de 500 μL de solução bacteriana foram inoculadas em triplicata em frascos contendo 20 mL de cada meio (79 e DYGS), sem triptofano e suplementado com 100 mg L^{-1} de triptofano. As estirpes foram incubadas por 72 horas, a 28°C, sob agitação de 110 rpm. Após este período as células foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foi retirado 3 mL do sobrenadante e adicionado 2 mL do reagente de Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995). O material foi reservado por 30 minutos no escuro para o desenvolvimento da coloração rósea, indicativo da produção de AIA. A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm, segundo Asghar et al. (2002). A concentração do AIA foi estimada utilizando uma curva padrão previamente obtida com os meios de cultura (79 e DYGS) esterilizados não inoculados e quantidades conhecidas de AIA, variando de 0 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os experimentos (na ausência e presença da suplementação com triptofano) foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, e os tratamentos arranjados em esquema fatorial. Avaliou-se a capacidade de produção de AIA das 27 estirpes, juntamente com o controle positivo (BR 11001^T), compondo um fatorial: 28 (estirpes) x 2 (meios de cultura 79 e DYGS). Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

2.4 Avaliação da eficiência das estirpes em promover o crescimento das plantas de soja e feijão-caupi

2.4.1 Experimento em garrafas *long neck* com plantas de soja

No período de 02/04/2012 a 02/05/2012, foi conduzido um experimento em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG, com objetivo de avaliar a capacidade nódulífera, eficiência simbiótica e/ou capacidade promotora do crescimento vegetal das 27 estirpes, em simbiose ou associação com plantas de soja (cultivar 5G 830 RR).

O experimento foi constituído por 33 tratamentos, sendo 27 correspondentes às inoculações com estirpes isoladas de solos de Várzeas do Sudoeste piauiense, 4 controles positivos, referentes à inoculação com estirpes inoculantes da soja, SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 5080 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkanii*) e SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), e 2 controles negativos sem inoculação, um com N mineral e o outro com baixa concentração de N mineral, considerado, nesse trabalho, como controle sem N. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições.

Para a condução do experimento, utilizaram-se garrafas recicláveis de 500 mL do tipo “long neck” revestidas com papel alumínio e contendo solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) diluída quatro vezes. Nos tratamentos inoculados e no controle sem inoculação e sem N mineral, foi utilizada solução nutritiva de Hoagland com baixa concentração de nitrogênio ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$). Para 4 L de água, foram adicionados as seguintes volumes (mL) das soluções estoque: 0,4 de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1M ($236,16 \text{ g L}^{-1}$); 0,1 de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1M ($115,03 \text{ g L}^{-1}$); 0,6 de KNO_3 1M ($101,11 \text{ g L}^{-1}$); 2,0 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M ($246,9 \text{ g L}^{-1}$); 3,0 de K_2SO_4 0,5M ($87,13 \text{ g L}^{-1}$); 10 de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05M ($12,6 \text{ g L}^{-1}$); 200 de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01M ($1,72 \text{ g L}^{-1}$); 1 de FeCl_3 0,06M (10 g L^{-1}) e 1 de micronutrientes (H_3BO_3 , $2,86 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $2,03 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,22 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $0,09 \text{ mg L}^{-1}$).

No controle sem inoculação e com N mineral, foi utilizada a solução de Hoagland completa, com $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrogênio. Para a preparação desta solução, em 4 L de água destilada, foram adicionados os seguintes volumes de solução estoque (mL): 4,0 de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1M ($236,16 \text{ g L}^{-1}$); 1 de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1M ($115,03 \text{ g L}^{-1}$); 6 de K_2SO_4 0,5M ($87,13 \text{ g L}^{-1}$); 2,0 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M ($246,9 \text{ g L}^{-1}$); 1 de FeCl_3 0,06M (10 g L^{-1}) e 1 de micronutrientes (H_3BO_3 $2,86 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $2,03 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,22 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,09 \text{ mg L}^{-1}$). Em cada garrafa contendo solução nutritiva, foram colocadas duas fitas de papel filtro de 2 cm de largura e comprimento igual à altura da garrafa para servirem de suporte às raízes, e também para promover o contato da solução nutritiva com a planta. Posteriormente, todas as garrafas foram autoclavadas por 60 minutos, à pressão de $1,5 \text{ kg cm}^2$, a 121°C .

Antes da semeadura, as sementes de soja foram desinfestadas superficialmente utilizando-se álcool etílico a 98% (30 segundos), hipoclorito de sódio a 2% (2 minutos) e, em seguida, submetidas a lavagens sucessivas em água destilada estéril. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em placas de petri esterilizadas contendo papel filtro e algodão umedecido, onde permaneceram durante 48 horas, em câmara de crescimento a 28°C , para emissão das radículas.

Para o preparo dos inoculantes, as estirpes bacterianas foram cultivadas em meio de cultura "79" líquido, sob agitação de 110 rpm, a 28°C , por um período de 3 (crescimento rápido) a 5 dias (crescimento intermediário). Para cada tratamento inoculado, foi adicionado 1 mL do inoculante sobre a semente pré-germinada. Nos controles sem inoculação, foi adicionado 1 mL do meio de cultura sem inóculo.

Aos 30 dias, após a instalação do experimento, as plantas foram coletadas para determinação do número de nódulos (NN), matéria seca de

nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST), eficiência em relação ao controle sem inoculação e com N mineral (EFCN), e em relação ao controle sem inoculação e sem N mineral (EFSN). Para determinação do NN, os nódulos foram destacados das raízes e contados. Para a determinação da MSN e MSPA, os nódulos e a parte aérea foram acondicionados em sacos de papel e colocados para secar em estufa de circulação forçada a 60°C até atingir peso constante. A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada pela seguinte fórmula: $EFCN = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ com N}) \times 100$ e $EFSN = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ sem N}) \times 100$.

Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância empregando-se o programa de análise estatística SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os dados de NN e MSN foram transformados em raiz quadrada de $Y + 0,5$.

2.4.2 Experimento em vasos de Leonard com plantas de feijão-caupi

No período de 08/06/2012 a 07/08/2012 foi conduzido um experimento na casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do DCS da UFLA, em Lavras, MG, em que plantas de feijão-caupi (cultivar BR 17 Gurguéia) foram cultivadas em vasos de Leonard (VINCENT, 1970) para avaliação da eficiência simbiótica e/ou capacidade das estirpes em promover do crescimento vegetal.

Além das 27 estirpes, foram incluídos 3 controles positivos, referentes às inoculações com três estirpes atualmente autorizadas pelo MAPA como inoculantes de feijão-caupi, INPA 3-11B (*Bradyrhizobium elkani*), UFLA 3-84 (*Bradyrhizobium* sp.), BR 3267 (*Bradyrhizobium japonicum*), mais 2 controles negativos sem inoculação, um sem N mineral e o outro com N mineral,

totalizando 32 tratamentos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições.

Nos tratamentos inoculados e no controle sem inoculação e sem N mineral, foi utilizada solução nutritiva Hoagland com baixa concentração de nitrogênio ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$). No controle sem inoculação e com N mineral foi utilizada a solução de Hoagland completa, com $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N. O procedimento para o preparo da solução foi o mesmo descrito para o experimento conduzido em garrafas tipo “*long neck*”.

Na parte superior do vaso de Leonard, foi adicionada uma mistura 1:2 de areia (150 cm^3) e vermiculita (300 cm^3), e na inferior, solução nutritiva de Hoagland, diluída quatro vezes. Após o preparo dos vasos e da solução nutritiva, estes foram autoclavados por uma hora, à pressão de $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$, a 121°C .

Antes da semeadura, as sementes de feijão-caupi cultivar BR 17 Gurguéia foram desinfestadas, seguindo-se o mesmo procedimento do experimento com soja. Após a desinfestação, as sementes foram submersas por uma hora e meia em água destilada estéril e depois foram colocadas em placas de petri esterilizadas contendo papel filtro e algodão umedecido, onde permaneceram durante 24 horas em câmara de crescimento, a 28°C , para germinação. Em cada vaso, foram adicionadas quatro sementes pré-germinadas.

Para o preparo dos inoculantes, as estirpes bacterianas foram cultivadas em meio de cultura “79” semi-sólido, a 28°C , por um período de 3 (crescimento rápido) a 5 dias (crescimento intermediário). Para cada tratamento inoculado, foi adicionado 1 mL do inoculante por semente. Nos controles sem inoculação, foi adicionado por semente 1 mL do meio de cultura 79 semi-sólido sem inóculo.

Após a semeadura e a inoculação, os vasos foram recobertos com uma camada de areia parafinada (10 kg de areia, 1 L de clorofórmio e 10 g de parafina) com a finalidade de evitar possíveis contaminações. O desbaste foi realizado cinco dias após a emergência, deixando-se duas plantas por vaso.

Durante a condução do experimento, a solução nutritiva foi preparada, autoclavada e repostada nos vasos periodicamente, de acordo com a taxa de absorção das plantas.

Aos 60 dias, após a semeadura, as plantas foram coletadas para determinação do número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST) e eficiência em relação aos controles com N mineral (EFCN) e sem N mineral (EFSN). Para a determinação da MSN e MSPA, EFCN e EFSN, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para o experimento com soja.

Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os dados de NN e MSN foram transformados em raiz quadrada de $Y + 0,5$.

2.5 Caracterização genética das estirpes

As estirpes que apresentaram melhor desempenho nos experimentos conduzidos em vasos de Leonard e garrafas do tipo “*long neck*”, utilizando as plantas hospedeiras feijão-caupi e soja, respectivamente, foram selecionadas para o sequenciamento do 16S rRNA.

As bactérias foram crescidas em meio “79” líquido a 28°C pelo tempo de crescimento de cada uma, avaliado anteriormente. Para extração do DNA, utilizou-se o kit de extração do DNA genômico bacteriano ZR Fungal/Bacterial DNAMiniPrep TM da *Zymo Research*.

Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA, foram utilizado os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT). As

concentrações finais dos reagentes por reação foram: 0,2 μM de cada oligonucleotídeos iniciadores (27F e 1492R), 2,5 mM de cloreto de magnésio, tampão 1X para PCR, 0,2 μM de cada dNTP e 0,02 U Taq DNA polimerase (LANE, 1991). A reação de amplificação foi realizada no Eppendorf Mastercycler[®], Alemanha. As temperaturas do ciclo de amplificação foram: uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação (94°C por 40 s), anelamento (55°C por 40 s), extensão (72°C por 1,5 min) e uma extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV. Os produtos de PCR foram enviados para o Laboratório da Macrogen (Coreia), para sequenciamento e purificação.

As seqüências obtidas foram submetidas ao “*Basic Local Alignment Search Tool*” - BLAST para comparação com as estirpes tipo das espécies depositadas no banco de dados *GenBank*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Processos promotores do crescimento vegetal

No experimento para avaliação da capacidade das estirpes em fixar nitrogênio em vida livre, nenhuma das 27 estirpes (incluindo simbióticas e não simbióticas) formou película sobre a superfície do meio LO, independente da fonte de carbono utilizada (lactato ou manitol). Somente o controle positivo BR 5401^T (*Azorhizobium doebereiner*) formou película quando o lactato de sódio foi utilizado como fonte de carbono. Diferentemente do presente trabalho, Oliveira (2009) verificou que algumas bactérias simbióticas e não simbióticas foram capazes de formar película na superfície do meio LO em ambas as fontes de carbono testadas (lactato e manitol). Deve-se ressaltar que, além do meio LO, existem outros meios para fixação de N₂ em vida livre por bactérias não simbióticas, a exemplo do JNFb, NFb e Fam, cujas composições se encontram em Döbereiner, Baldani e Baldani (1995) e Magalhães et al. (1983), os quais não foram avaliados no presente trabalho.

3.1.1 Solubilização de fosfatos de cálcio, alumínio e ferro insolúveis

Quanto à capacidade solubilizadora de fosfatos inorgânicos insolúveis, das 27 estirpes avaliadas, nenhuma foi capaz de solubilizar P-Fe, apesar de todas terem crescido no meio GELP, contendo esse tipo de fosfato. A maioria das estirpes (81%) não cresceu no meio de cultura contendo P-Al (meio GES). Já no meio NBRIP, específico para solubilização de P-Ca, todas as estirpes cresceram, sendo que a maioria (81%) foi capaz de solubilizar nesse meio (Tabela 1).

Tabela 1 Solubilização de CaHPO_4 , $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ e $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos de Várzeas sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense

Estirpes	CaHPO_4		$\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$		$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		
	I.S. ¹		CS ²	I.S.		CS	I.S.
	Inicial (Dias)	Final		Inicial (Dias)	Final		-
UFPI B1-5	1,24 (9)	1,26	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B1-7	1,18 (3)	1,24	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B1-8	1,26 (3)	1,28	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B1-9	1,17 (3)	1,18	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B3-1	1,17 (3)	1,18	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B3-3	1,17 (3)	1,23	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B3-4	CNS	CNS	-	NC	NC	-	CNS
UFPI B3-5	1,32 (6)	1,45	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B3-7	1,21 (6)	1,33	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B4-3	1,27 (6)	1,44	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B4-5	1,27 (3)	1,29	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B4-6	1,28 (3)	1,43	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B4-7	1,37 (6)	1,42	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B5-4	1,44 (3)	1,77	Baixa	1,20 (12)	1,20	Baixa	CNS
UFPI B5-6	2,16 (3)	3,54	Média	CNS	CNS	-	CNS
UFPI B5-7A	1,41 (3)	1,47	Baixa	CNS	CNS	-	CNS
UFPI B5-8A	2,13 (3)	2,32	Média	NC	NC	-	CNS
UFPI B6-1	1,44 (6)	1,72	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B6-3	1,36 (6)	1,37	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B6-9B	CNS	CNS	-	NC	NC	-	CNS
UFPI B7-1	1,28 (6)	1,31	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B7-3	1,27 (6)	1,31	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B7-5	CNS	CNS	-	NC	NC	-	CNS
UFPI B7-6	1,28 (9)	1,30	Baixa	NC	NC	-	CNS
UFPI B7-7B	1,19 (6)	1,21	Baixa	CNS	CNS	-	CNS
UFPI B7-8	CNS	CNS	-	CNS	CNS	-	CNS
UFPI B7-9	CNS	CNS	-	NC	NC	-	CNS
UFLA03 09*	2,08 (3)	2,44	Média	NC	NC	-	CNS

¹Índice de solubilização (I.S.) = \emptyset halo (mm) / \emptyset colônia (mm); ²capacidade de solubilização; Inicial = leitura feita no dia inicial da solubilização; Final = leitura feita após 15 dias de incubação; NC= Não cresceu; CNS= Cresceu e não solubilizou; * *Acinetobacter* sp. (controle positivo de solubilização de CaHPO_4).

Entre as 22 estirpes que foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*, os índices de solubilização variaram entre baixo e médio, sendo que nenhuma promoveu alto índice (Tabela 1).

Duas estirpes destacaram-se das demais, UFPI B5-8A e UFPI B5-6, apresentando índice médio de solubilização de P-Ca, semelhante ao índice obtido com a estirpe controle positivo, UFLA 03 09 (Tabela 1). Na figura 1, é possível visualizar os halos de solubilização promovidos pelas duas estirpes mencionadas e pelo controle positivo.

De acordo com o início da solubilização, 50% das estirpes se comportaram como precoce, iniciando a solubilização até o terceiro dia após a inoculação. Apenas uma das estirpes (UFPI B5-4) que solubilizou P-Ca foi também capaz de solubilizar o P-Al, mas esta apresentou baixa capacidade e comportou-se como tardia para solubilização do P-Al (Tabela 1).

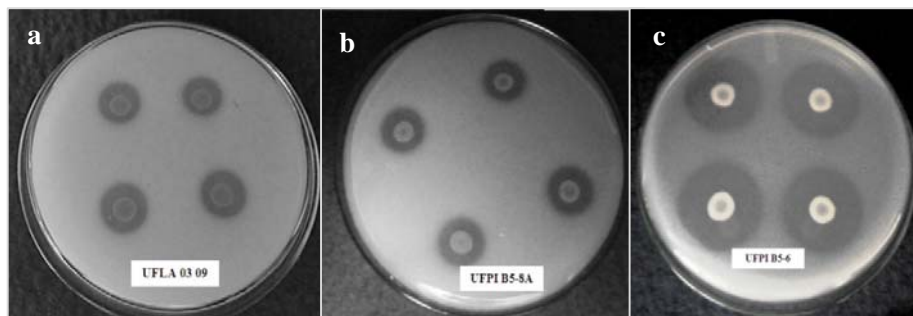


Figura 1 Halos de solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP promovidos pelas estirpes: a) UFLA 03 09 (controle positivo), b) UFPI B5-8A e c) UFPI B5-6, após 15 dias de incubação a 28°C

A capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis por bactérias simbióticas e não simbióticas tem sido sugerida como alternativa para aumentar a disponibilidade de fósforo e favorecer o crescimento vegetal (MARRA et al., 2011; OLIVEIRA, 2011; VESSEY, 2003).

No presente trabalho, a capacidade de solubilização das estirpes que solubilizaram P-Ca variou entre baixa e média e da estirpe que solubilizou P-Al foi baixa (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com outros encontrados na literatura (HARA, OLIVEIRA, 2007; MARRA et al., 2011; MARRA et al., 2012; SRIDEVI, MALLAIAH e YADAV, 2007).

Hara e Oliveira (2007), trabalhando com isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos do Amazonas, inoculados no meio de cultura GES (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982), verificaram que nenhum dos isolados capaz de solubilizar P-Ca apresentou alto índice de solubilização e para o meio com P-Al houve apenas baixo índice de solubilização, sendo que a maioria se comportou como precoce. Sridevi, Mallaiah e Yadav (2007), trabalhando com meio Pikovskaya (PIKOVSKAYA, 1948) para avaliarem a capacidade solubilizadora de P-Ca por estirpes de *Rhizobium*, obtiveram índices médios de solubilização. Marra et al. (2011), ao avaliarem a capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis por sete estirpes tipo e inoculantes de leguminosas em meio GELP sólido, verificaram que nenhuma estirpe conseguiu solubilizar P-Fe e, das estirpes que solubilizaram P-Ca e P-Al, nenhuma atingiu alto índice de solubilização, sendo que para P-Ca, os índices variaram de baixo a médio e para P-Al foram obtidos apenas índices baixos. Resultados semelhantes foram reportados por Marra et al. (2012), trabalhando com isolados nodulíferos e não nodulíferos de feijão-caupi.

Alguns resultados na literatura diferem dos obtidos no presente trabalho, como os encontrados por Oliveira (2009), em que algumas estirpes foram capazes de promover alto índice de solubilização para P-Ca em meio GES (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). No trabalho de Hara e Oliveira (2004), verificou-se uma alta ocorrência de isolados de rizóbios, oriundos de solos ácidos e álicos, que solubilizaram P-Al, sendo superior ao número de isolados

capazes de solubilizar P-Ca em meio GES, apesar de apresentarem baixo índice de solubilização.

Essas diferenças, quanto à capacidade solubilizadora de fosfatos inorgânicos insolúveis, podem estar relacionadas à origem das bactérias avaliadas nos diferentes estudos, as quais foram isoladas de diferentes regiões, ao gênero e/ou espécie a qual elas pertencem, bem como à composição do meio de cultura utilizado para avaliação da solubilização, que diferem entre alguns estudos. No estudo de Silva-Filho e Vidor (2000) foi demonstrado que o crescimento e a capacidade solubilizadora de bactérias e fungos avaliados variaram de acordo com a fonte de carbono utilizada no meio de cultura.

Verificou-se, no presente estudo, que mesmo as estirpes que não solubilizaram P-Ca foram capazes de crescer no meio NBRIB, e que, apesar de nenhuma estirpe ter apresentado capacidade de solubilizar P-Fe, todas cresceram no meio contendo esse tipo de fosfato (meio GELP). Já no meio para solubilização de P-Al, apenas cinco estirpes (17%) cresceram (Tabela 1). Segundo Marra et al. (2011), esse crescimento nos meios contendo P-Ca e P-Fe, sem formação do halo de solubilização, pode estar relacionado ao efeito nutritivo que o cálcio e o ferro exercem para as estirpes, enquanto que o alumínio não é considerado um elemento essencial para o crescimento bacteriano. Assim, o crescimento das estirpes no meio contendo P-Al estaria relacionado a outros mecanismos.

A avaliação da capacidade solubilizadora de fosfatos inorgânicos insolúveis por bactérias adaptadas a condições adversas, como altas temperaturas e condições de alagamento temporário, a exemplo dos ecossistemas de Várzeas do Sudoeste piauiense, são de extrema importância para selecionar estirpes que possam contribuir, por meio da maior disponibilização de fósforo solúvel, com o aumento do crescimento vegetal nesses ambientes. Além disso, o aumento do fornecimento de fósforo solúvel

promovido por essas bactérias pode melhorar a eficiência do processo de FBN, estimulando ainda mais o crescimento de espécies leguminosas. No caso das bactérias nodulíferas, aquelas que, além de eficientes na FBN, são capazes de solubilizarem fosfatos inorgânicos insolúveis apresentam grande potencial biotecnológico para serem utilizadas como inoculantes nos cultivos agrícolas, podendo beneficiar as plantas através de ambos os processos.

3.1.2 Produção de Auxina (ácido-3-indol acético - AIA)

Quanto à capacidade de síntese de AIA, houve interação significativa entre estirpes e meios de cultura (79 e DYGS) nas avaliações realizadas na presença e ausência da suplementação com triptofano (Tabela 2).

Na ausência da suplementação com triptofano, 20 estirpes (74%) não apresentaram habilidade para sintetizar o AIA em ambos os meios de cultivo. No meio DYGS, 7 estirpes, juntamente com o controle positivo (BR 11001), sintetizaram o AIA. Já, no meio 79, apenas a BR 11001^T apresentou essa habilidade, mas produziu quantidade significativamente inferior a obtida no meio DYGS (Tabela 2).

Dentre as 7 estirpes que sintetizaram AIA no meio DYGS, na ausência da suplementação com triptofano, a produção variou de 0,40 (UFPI B6-1) a 9,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (UFPI B5-7A). A estirpe UFPI B5-7A promoveu produção de AIA significativamente superior às demais estirpes e ao controle positivo (BR 11001^T). A estirpe UFPI B5-4 também se destacou, pois expressou habilidade de sintetizar o AIA semelhante à da estirpe BR 11001^T. As demais apresentaram produções decrescentes na seguinte ordem: UFPI B5-8A, UFPI B5-6, UFPI B4-3, UFPI B6-3 e UFPI B6-1 (Tabela 2).

Tabela 2 Produção de ácido-3-indol acético (AIA) por estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos de Várzeas sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense, cultivadas em meio 79 e em meio DYGS

Estirpes	Meio 79	Meio DYGS
AIA - sem triptofano ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹		
UFPI B4-3	0,00 bB*	2,57 eA
UFPI B5-4	0,00 bB	6,10 bA
UFPI B5-6	0,00 bB	2,87 dA
UFPI B5-7A	0,00 bB	9,58 aA
UFPI B5-8A	0,00 bB	5,40 cA
UFPI B6-1	0,00 bB	0,40 gA
UFPI B6-3	0,00 bB	1,14 fA
BR 11001 ^{T**}	0,82 aB	6,12 bA
AIA - com triptofano ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ²		
UFPI B1-7	5,94 gA	0,00 jB
UFPI B1-8	11,82 dA	0,00 jB
UFPI B1-9	6,58 fA	0,00 jB
UFPI B3-1	3,71 iA	0,05 jB
UFPI B3-4	0,00 rB	1,07 gA
UFPI B3-5	0,62 pA	0,00 jB
UFPI B3-7	0,41 qA	0,00 jB
UFPI B4-3	11,33 eA	3,15 fB
UFPI B4-6	2,92 jA	0,00 jB
UFPI B4-7	1,52 mA	0,00 jB
UFPI B5-4	51,52 bA	14,75 cB
UFPI B5-6	51,00 cA	26,54 aB
UFPI B5-7A	52,37 aA	25,85 bB
UFPI B5-8A	1,86 lB	9,71 eA
UFPI B6-1	1,29 nA	0,54 hB
UFPI B6-3	0,00 rB	0,38 iA
UFPI B6-9B	0,92 oA	0,00 jB
UFPI B7-3	11,27 eA	0,00 jB
UFPI B7-5	0,00 rB	0,84 gA
UFPI B7-6	0,09 rB	0,87 gA
UFPI B7-7B	6,54 fA	0,61 hB
UFPI B7-8	0,00 rB	0,87 gA
BR 11001 ^T	5,17 hB	14,33 dA

*Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; ***Azospirillum brasiliense* (controle positivo); ¹Coefficiente de variação (%) = 9,32; ²Coefficiente de variação (%) = 2,42.

Na presença de suplementação com o aminoácido triptofano, 18 estirpes foram capazes de sintetizar o AIA em meio 79, sendo que dentre essas, 16 promoveram produções significativamente superiores em relação às obtidas no meio DYGS (Tabela 2).

Das 13 estirpes capazes de sintetizar o AIA em meio DYGS, na presença de suplementação com triptofano, apenas 4 (UFPI B3-4, UFPI B5-8A, UFPI B6-3 e UFPI B7-5), juntamente com o controle positivo (BR 11001^T), sintetizaram maiores quantidades de AIA, em relação às obtidas no meio 79 inoculado com essas estirpes (Tabela 2).

No meio 79, suplementado com triptofano, a produção de AIA variou de 0,09 a 52,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo a concentração mais baixa sintetizada pela estirpe UFPI B7-6 e a máxima pela estirpe UFPI B5-7A (Tabela 2). Além da estirpe UFPI B5-7A, sete estirpes se destacaram na síntese de AIA nesse meio, UFPI B5-4, UFPI B5-6, UFPI B1-8, UFPI B4-3, UFPI B1-9, UFPI B7-7B e UFPI B1-7, as quais apresentaram produções significativamente superiores a produção obtida com a estirpe BR 11001^T (Tabela 2).

Com relação às concentrações de AIA no meio DYGS suplementado com triptofano, variaram de 0,05 a 26,54 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtidas nas inoculações com as estirpes UFPI B3-1 e UFPI B5-6, respectivamente (Tabela 2). Apenas três (UFPI B5-6, UFPI B5-7A e UFPI B5-4) das 13 estirpes que sintetizaram AIA, nesse meio, apresentaram produções significativamente superiores à obtida com a estirpe BR 11001^T (Tabela 2).

As concentrações de AIA, obtidas no presente trabalho, estão de acordo com as obtidas em outros trabalhos na literatura. Kuss et al. (2007), trabalhando com bactérias diazotróficas associadas a raízes de arroz, obtiveram produção de AIA variando de 2,79 a 13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio de cultura DYGS sem triptofano, sendo que o controle positivo BR 11001^T (*Azospirillum brasilense*) promoveu produção intermediária (5,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$), corroborando ao presente

trabalho. No estudo de Oliveira (2009), as concentrações de AIA sintetizadas por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro, variaram de 0,23 a 12,59 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio DYGS não suplementado com triptofano e de 0,32 a 42,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio DYGS com 100 mg L^{-1} de triptofano, sendo que a estirpe UFLA 04-0321 (*Bradyrhizobium japonicum*) apresentou a maior produção.

Em outros estudos, foram verificadas concentrações superiores às do presente trabalho. Silva (2012), trabalhando com bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de siratro, obteve produção de AIA em meio 79 variando de 0 a 54,68 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio não suplementado com triptofano, e de 2,73 a 218,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio com 100 mg L^{-1} de triptofano, sendo o nível mais alto produzido pela estirpe UFLA 04-287 (*Rhizobium* sp.). No estudo conduzido por Kumar e Ram (2012), a capacidade de sintetizar o AIA por cinco estirpes de *Rhizobium* isoladas de nódulos *Vigna trilobata* (L.) Verdec. em meio 79 suplementado com 100 mg L^{-1} de triptofano variou de 77,48 a 82,89 $\mu\text{g mL}^{-1}$ entre os isolados. Anjum et al. (2011), estudando 44 isolados de nódulos de *Vigna radiata* L. observaram que todos foram capazes de sintetizar o AIA, sendo que a produção variou amplamente entre eles (24,3 a 126 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em meio 79 suplementado com triptofano. Por outro lado, no trabalho de Palaniappan et al. (2010) foi verificada menor produção de AIA por bactérias endofíticas de nódulos de *Lespedeza* sp., em que variou de 1 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio 79 com triptofano (100 mg L^{-1}).

No presente trabalho, verificou-se que, de maneira geral, a maior síntese de AIA foi obtida quando os meios de cultura foram suplementados com o aminoácido triptofano (Tabela 2). Esta resposta pode estar relacionada ao fato do triptofano ser considerado o principal precursor para as vias de biossíntese do AIA por bactérias (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Já foram descritas pelo menos cinco vias de biossíntese de AIA por bactérias simbióticas

e/ou associativas de plantas e, destas, quatro são dependentes do aminoácido triptofano, indole-3-piruvato (IpyA), indole-3-acetamida (IAM) e triptamina (TAM), indole-3-acetonitrilo (IAN) e uma independente do triptofano, cujo precursor ainda é desconhecido (LAMBRECHT et al., 2000; SPAEPEN VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Apesar de a maioria das bactérias avaliadas no presente trabalho ter expressado a capacidade de síntese de AIA nos meios suplementados com triptofano, a UFPI B6-3 sintetizou maior quantidade de AIA no meio DYGS sem adição de triptofano (Tabela 2), indicando que a concentração de triptofano utilizada (100 mg L^{-1}) pode ter interferido na expressão dos genes de biossíntese, inibindo assim a síntese de AIA por essa bactéria. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2009) para as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. UFLA 03-172, INPA 03-11B e UFLA 03-163 inoculadas em meio DYGS.

Alguns trabalhos têm relatado que as bactérias que produzem o AIA no meio sem suplementação com triptofano possivelmente possuem a via biossintética independente do triptofano (OLIVEIRA, 2009; SILVA, 2012). No entanto, no presente trabalho, verificou-se que não só a suplementação com o triptofano, mas também a composição do meio de cultura utilizado promove interferências na capacidade de biossíntese e também na quantidade de AIA sintetizada. Na ausência de suplementação com triptofano, 7 estirpes e o controle positivo (BR 11001^T) foram capazes de sintetizar o AIA no meio DYGS, enquanto no meio 79 somente a BR 11001^T apresentou essa capacidade. Já na presença de triptofano, o meio 79 estimulou a produção de AIA em um maior número de estirpes (66%) e em maior quantidade (Tabela 2). Assim, dependendo do meio de cultura utilizado para avaliação da capacidade de biossíntese de AIA, o potencial da bactéria poderá ser subestimado, sendo necessário, portanto, a utilização de mais de um meio de cultura nos estudos relacionados à síntese de AIA por bactérias simbióticas e não simbióticas.

Uma possível explicação para a maior síntese de AIA no meio DYGS, em relação ao meio 79, na ausência de suplementação com triptofano, está relacionada, entre outros fatores, à quantidade de extrato de levedura adicionada a esses meios. Segundo Yamada et al. (2003), o extrato de levedura é uma fonte rica em aminoácidos, incluindo o triptofano. Desse modo, a maior quantidade de extrato de levedura adicionado ao meio DYGS (2 g L^{-1}), que corresponde a cinco vezes a quantidade adicionada ao meio 79 ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), pode ter ativado alguma das vias biossintéticas do AIA, em algumas bactérias, devido ao maior fornecimento de triptofano nesse meio. Outra explicação está relacionada às fontes e quantidades de nutrientes adicionados aos meios de cultivo, que interferem na expressão dos genes da biossíntese e também na quantidade de AIA sintetizado por diferentes bactérias (BALAJI et al., 2012; KUMAR; RAM et al., 2012; MANDAL et al., 2007; ONA et al., 2005; PATIL et al., 2011).

Balaji et al. (2012), avaliando o efeito de diferentes fontes de carbono (glicose, lactose, amido, celulose e glicerol) e nitrogênio (peptona, farinha de soja, extrato de levedura, extrato de carne e triptona) e concentração de triptofano ($0, 2,5, 5,0$ e $7,5 \text{ mg L}^{-1}$) na síntese de AIA por *Pseudomonas* sp., registraram máxima produção, utilizando o glicerol como fonte de carbono, o extrato de levedura como fonte de nitrogênio e a concentração 5 mg L^{-1} de triptofano. Kumar e Ram (2012) estudaram 5 estirpes de *Rhizobium* isoladas de nódulos *Vigna trilobata* (L.) Verdec. quanto à capacidade de sintetizar AIA em meio 79 suplementado com triptofano (100 mg L^{-1}), testando 10 fontes de carbono, e verificaram que para todas as estirpes, a máxima produção foi atingida quando o manitol foi utilizado como fonte de carbono ($82,89 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Segundo Ona et al. (2005), para alguns gêneros de bactérias, como *Azospirillum*, a concentração de carbono também interfere na síntese de AIA. Ao avaliarem a interferência de diferentes concentrações de malato ($2,5, 5$ e 10 g L^{-1}) na biossíntese de AIA por uma estirpe de *Azospirillum brasiliense* (Sp245),

esses autores verificaram que a maior síntese foi obtida com a concentração de 2,5 g L⁻¹ de malato. Esse resultado sugere que o estresse relacionado à baixa disponibilidade carbono é necessário para maior biossíntese de AIA nesse gênero de bactéria. No presente trabalho, a estirpe controle positivo BR 11001^T, também pertencente ao gênero *Azospirillum*, apresentou maior produção de AIA no meio DYGS (na presença e ausência da suplementação com triptofano), o qual continha menor quantidade de carbono adicionado (2 g de glicose L⁻¹), em relação ao meio 79 (10 g de manitol L⁻¹). Desse modo, pode-se inferir que a maior quantidade de AIA sintetizada no meio DYGS pela estirpe BR 11001^T, pode estar relacionada, entre outros fatores, à menor quantidade de carbono adicionada a esse meio.

O AIA constitui um dos principais hormônios que regula o crescimento vegetal, podendo atuar tanto na fitoestimulação, como na inibição, dependendo das concentrações expostas às plantas. Para algumas espécies vegetais, baixas concentrações de AIA bacteriano são eficazes na promoção do crescimento, sendo que acima da faixa benéfica as concentrações tornam-se tóxicas (PATIL et al., 2011; SCHLINDWEIN et al., 2008). Já outras espécies requerem maiores concentrações de AIA para estimulação do seu crescimento (STROSCHEIN et al., 2011). Patil et al. (2011), avaliando o efeito da inoculação em Amendoim com isolados de *Azotobacter* sp. produtores de AIA, cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de triptofano (1, 2 e 5 mg mL⁻¹), verificaram que na menor concentração, em que a produção de AIA variou de 7,25 a 11,53 µg mL⁻¹, as plantas apresentaram maior índice de germinação e crescimento radicular em relação ao controle. Já na concentração mais elevada (5 mg mL⁻¹ de triptofano), em que a produção de AIA variou de 27,6 a 38, µg mL⁻¹, ocorreu redução do crescimento das plantas. Schlindwein et al. (2008), constataram efeito benéfico em plântulas de alface inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. produzindo até 3,3 µg mL⁻¹ de AIA e efeito tóxico quando

inoculadas com *Rhizobium leguminosarum* produzindo AIA na concentração de 171,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em plântulas de arroz foi verificado que as concentrações de AIA de 43,04 até 101,26 $\mu\text{g mL}^{-1}$, produzidas por rizóbios isolados de alfafa aceleraram os processos de germinação e crescimento inicial (STROSCHEIN et al., 2011).

De acordo com esses resultados, pode-se inferir que o potencial de promoção do crescimento vegetal por bactérias produtoras de AIA depende da concentração de AIA sintetizado por elas e da espécie vegetal. No presente trabalho, verificou-se ampla variabilidade na capacidade de síntese de AIA entre bactérias avaliadas, sugerindo que as mesmas apresentam potencial para serem exploradas na elaboração de inoculantes, visando à promoção do crescimento de uma ampla diversidade de culturas agrícolas.

3.2 Eficiência das estirpes em promover o crescimento de plantas de soja e feijão-caupi

3.2.1 Experimento com plantas de soja

Houve efeito significativo dos tratamentos sobre o NN, MSN, MSPA, MSR, MST, EFCN e EFSN. Os controles negativos (sem N mineral e com N mineral) não apresentaram nodulação, indicando que não houve contaminação no experimento. Os controles positivos (SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019) nodularam eficientemente, evidenciando que as condições foram favoráveis à ocorrência da nodulação e FBN, durante o período experimental. Das 27 estirpes inoculadas em plantas de soja, apenas uma (UFPI B3-4) foi capaz de formar nódulos, sendo que esta proporcionou NN e MSN significativamente inferior às estirpes inoculantes da soja (Tabela 3).

Tabela 3 Número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST) e eficiência em relação ao controle nitrogenado (EFCN) e ao controle sem nitrogênio (EFSN) obtidos em plantas de soja inoculadas com estirpes isoladas de solos de Várzeas do Sudoeste piauiense

Tratamentos	NN	MSN	MSPA	MSR	MST	EFCN	EFSN
	-	mg planta ⁻¹	--- g planta ⁻¹ ---			----- % -----	
UFPI B1-5	0 f*	0 e	0,35 d	0,18 b	0,53 d	29 d	92 d
UFPI B1-7	0 f	0 e	0,45 b	0,20 b	0,65 c	38 c	117 b
UFPI B1-8	0 f	0 e	0,13 g	0,05 e	0,18 f	11 f	35 f
UFPI B1-9	0 f	0 e	0,23 f	0,15 c	0,39 e	13 f	63 e
UFPI B3-1	0 f	0 e	0,39 d	0,18 b	0,57 c	33 c	103 d
UFPI B3-3	0 f	0 e	0,49 b	0,19 b	0,68 b	42 b	131 b
UFPI B3-4	3 e	4 d	0,50 b	0,20 b	0,71 b	42 b	132 b
UFPI B3-5	0 f	0 e	0,43 c	0,20 b	0,64 c	37 c	114 c
UFPI B3-7	0 f	0 e	0,35 d	0,18 b	0,53 d	29 d	92 d
UFPI B4-3	0 f	0 e	0,32 e	0,13 c	0,45 d	26 d	82 e
UFPI B4-5	0 f	0 e	0,31 e	0,15 c	0,46 d	26 d	82 e
UFPI B4-6	0 f	0 e	0,42 c	0,20 b	0,63 c	36 c	112 c
UFPI B4-7	0 f	0 e	0,16 g	0,05 e	0,20 f	14 f	42 f
UFPI B5-4	0 f	0 e	0,47 b	0,20 b	0,67 b	40 b	125 b
UFPI B5-6	0 f	0 e	0,43 c	0,20 b	0,64 c	36 c	114 c
UFPI B5-7A	0 f	0 e	0,50 b	0,20 b	0,71 b	42 b	132 b
UFPI B5-8A	0 f	0 e	0,46 b	0,18 b	0,64 c	39 b	120 b
UFPI B6-1	0 f	0 e	0,29 e	0,16 c	0,46 d	25 d	78 e
UFPI B6-3	0 f	0 e	0,14 g	0,04 e	0,18 f	12 f	38 f
UFPI B6-9B	0 f	0 e	0,15 g	0,06 e	0,21 f	13 f	42 f
UFPI B7-1	0 f	0 e	0,14 g	0,04 e	0,18 f	12 f	37 f
UFPI B7-3	0 f	0 e	0,32 e	0,16 c	0,48 d	27 d	84 d
UFPI B7-5	0 f	0 e	0,26 f	0,10 d	0,36 e	22 e	68 e
UFPI B7-6	0 f	0 e	0,31 e	0,17 c	0,48 d	26 d	82 e
UFPI B7-7B	0 f	0 e	0,31 e	0,16 c	0,47 d	26 d	82 e
UFPI B7-8	0 f	0 e	0,32 e	0,15 c	0,48 d	27 d	86 e
UFPI B7-9	0 f	0 e	0,39 d	0,18 b	0,57 c	33 c	104 d
SEMIA 5019	22 d	31 c	0,42 c	0,20 b	0,62 c	36 c	112 c
SEMIA 5079	33 b	47 b	0,43 c	0,20 b	0,64 c	36 c	114 c

Tabela 3, continua

Tratamentos	NN	MSN	MSPA	MSR	MST	EFCN	EFSN
	-	mg planta ⁻¹	--- g planta ⁻¹ ---			----- % -----	
SEMIA 587	38 a	30 c	0,43 c	0,18 b	0,61 c	36 c	113 c
SEMIA 5080	28 c	54 a	0,50 b	0,18 b	0,68 b	42 b	132 b
CN	0 f	0 e	1,19 a	0,49 a	1,68 a	100 a	315 a
SN	0 f	0 e	0,38 d	0,16 c	0,54 d	30 d	100 d
CV (%)	33,40	22,0	10,01	12,91	9,24	9,61	10,92

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Quanto à produção de MSPA, variou de 0,13 a 1,19 g planta⁻¹, sendo esses valores obtidos no tratamento inoculado com a estirpe UFPI B1-8 e no controle nitrogenado, respectivamente. Nenhuma das estirpes, incluindo as inoculantes da soja, apresentou produção de MSPA semelhante ou superior ao controle com N mineral (Tabela 3).

As estirpes UFPI B1-7, UFPI B3-3, UFPI B5-4, UFPI B5-7A e UFPI 5-8A, apesar de não terem sido capazes de formar nódulos nas plantas de soja, destacaram-se, promovendo produções de MSPA significativamente superiores a três das estirpes inoculantes da soja (SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 567) e ao controle sem N mineral. As estirpes UFPI B3-5, UFPI B4-6 e UFPI B5-6 também foram eficientes na produção de MSPA, apresentando comportamento semelhante às estirpes SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 587 e superiores ao controle sem N mineral. A estirpe UFPI B3-4, apesar de ter apresentado menor nodulação, proporcionou produção de MSPA semelhante à estirpe SEMIA 5080 e estatisticamente superior às outras estirpes inoculantes da soja (Tabela 3).

Em relação à produção de MSR, variou de 0,04 a 0,49 g planta⁻¹, para o tratamento inoculado com a estirpe UFPI B6-3 e o controle com N mineral, respectivamente. Algumas estirpes não simbióticas da soja (46%) e a estirpe nodulífera (UFPI B3-4) promoveram produções semelhantes às estirpes inoculantes da soja e superior ao controle sem N mineral.

Para a MST, 38% das estirpes forneceram incrementos significativos em relação ao controle sem N mineral, sendo que as estirpes UFPI B3-3, UFPI B3-4, UFPI B5-4, UFPI B5-7A e UFPI 5-8A agruparam-se à SEMIA 5080 e destacaram-se estatisticamente das demais estirpes avaliadas (Tabela 3).

Quanto á EFCN, nenhuma estirpe, incluindo as inoculantes da soja, apresentou eficiência semelhante ou superior ao controle nitrogenado. Para a EFSN, 33% das estirpes apresentaram eficiência significativamente superior ao controle sem N mineral, com valores médios variando de 112 (UFPI B4-6) a 132% (UFPI B3-4 e UFPI B5-7A). Por outro lado, algumas estirpes, principalmente UFPI B1-8, UFPI B4-7, UFPI B6-3, UFPI B6-9B e UFPI B7-1, inibiram o crescimento das plantas, resultando em menor eficiência em relação ao controle sem N mineral para todas as variáveis avaliadas.

A baixa ocorrência de nodulação nas plantas de soja, verificada no presente trabalho, pode estar relacionada ao fato de a maioria das estirpes (89%) avaliadas serem de crescimento rápido (ANEXO C). A única estirpe (UFPI B3-4) que foi capaz de nodular plantas de soja apresenta características morfológicas (ANEXO C) semelhantes às estirpes inoculantes da soja, indicando que essa estirpe pode pertencer ao gênero *Bradyrhizobium*. Diversos trabalhos têm demonstrado que a soja é uma espécie capaz de nodular eficientemente com estirpes de crescimento lento, como as pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (MINAMISAWA et al., 1997; PEREIRA et al., 2010; VIEIRA NETO et al., 2008), inclusive as quatro estirpes atualmente autorizadas pelo MAPA como inoculantes para soja pertencem a esse gênero. Por outro lado, são poucos os trabalhos que relatam a nodulação da soja promovida por estirpes de crescimento rápido (CAMACHO et al., 2002; RODRÍGUEZ-NAVARRO et al., 2003), principalmente em cultivares brasileiras (CHUEIRE; HUNGRIA, 1997). Além disso, essas estirpes foram isoladas de nódulos de outra espécie vegetal (feijão-caupi), o que pode ter interferido no estabelecimento da simbiose e

nodulação, pois a formação e funcionamento dos nódulos dependem e podem variar em função dos genótipos das plantas e das estirpes envolvidas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As estirpes não nodulíferas (UFPI B1-7, UFPI B3-3, UFPI B5-4, UFPI B5-7A, UFPI 5-8A, UFPI B3-5, UFPI B4-6 e UFPI B5-6) que se destacaram quanto a MSPA e MSR, inclusive promovendo produções semelhantes e/ou superiores às estirpes inoculantes da soja e ao controle sem N mineral (Tabela 3), podem ter atuado como promotoras do crescimento da soja através de outros processos biológicos, que não a FBN. Todas essas estirpes mostraram-se positivas quanto à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (Tabela 1) e síntese de AIA (Tabela 2), exceto a estirpe UFPI B3-3 que não foi capaz de sintetizar o AIA. Porém, como as fontes de fósforo utilizadas na solução nutritiva durante a condução do experimento são solúveis, sugere-se que a promoção do crescimento das plantas de soja, no presente trabalho, pode estar mais relacionada à produção de AIA, que é um hormônio responsável pela estimulação do crescimento radicular favorecendo o aumento da absorção de nutrientes pela planta. As duas estirpes que apresentaram maior destaque na produção de AIA, UFPI B5-7A ($52,37 \mu\text{g mL}^{-1}$) e UFPI B5-4 ($51,52 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 2), estão entre as que promoveram maior produção de MSPA, MSR, MST, EFCN e EFSN, quando inoculadas nas plantas de soja (Tabela 3). Deve-se ressaltar que, além da produção de AIA, essas bactérias podem ter contribuído com o melhor desempenho das plantas através de outros processos biológicos fitoestimuladores, os quais não foram avaliados no presente trabalho.

Alguns trabalhos, na literatura, têm relatado a capacidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de leguminosas em promover o crescimento das plantas através de vários processos biológicos, como a produção de hormônios vegetais, principalmente o AIA (ANJUM et al., 2011; HUNG et al., 2007; SILVA, 2012), solubilização de fosfato (KUKLINSKY-

SOBRAL et al., 2004; MARRA et al., 2012; OLIVEIRA, 2011), produção de sideróforos (CARSON et al., 1992), além da FBN, no caso das simbióticas e das diazotróficas associativas. Hung et al. (2007) e Silva (2012), trabalhando com estirpes isoladas de nódulos de soja e siratro, respectivamente, verificaram que algumas estirpes não nodulíferas produtoras de AIA foram capazes de promover o crescimento das plantas quando inoculadas em suas espécies de origem, em condições axênicas. No trabalho de Anjum et al. (2011), dos 44 isolados de nódulos de *Vigna radiata* L. produtores de AIA (variando de 24,3 a 126 $\mu\text{g mL}^{-1}$) inoculados em cultivares dessa espécie vegetal, 34 foram eficientes na promoção do crescimento, havendo acréscimo no comprimento da parte aérea e raiz, matéria fresca e seca da parte aérea de até 33, 59, 71 e 148%, respectivamente, em relação ao controle não inoculado, na avaliação realizada aos 15 dias após a emergência das plantas, em condições axênicas. Oliveira (2011) verificaram que as estirpes não nodulíferas de *Burkholderia fungorum* (UFLA 04-155, UFLA 04-233) e *Burkholderia* sp. (UFLA 04-21) isoladas de nódulos de siratro promoveram o crescimento de plantas de milho pela solubilização de fosfato de cálcio insolúvel quando cultivadas em solo.

Por outro lado, algumas bactérias simbióticas ou não isoladas de nódulos de leguminosas, podem causar efeitos prejudiciais ao crescimento das plantas (ANJUM et al., 2011; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). No presente trabalho, verificou-se que a inoculação com algumas estirpes (UFPI B1-8, UFPI B4-7, UFPI B6-3, UFPI B6-9B e UFPI B7-1) resultou em redução significativa na produção de matéria seca da parte aérea e raiz (Tabela 3), apesar de a maioria dessas estirpes terem se mostrado positivas aos processos de solubilização de fosfato de cálcio e produção de AIA (Tabelas 1 e 2). Essas estirpes, além de realizar processos promotores do crescimento vegetal, possivelmente são capazes de sintetizarem fitotoxinas, afetando negativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas. Além disso, poderá ter ocorrido

algum tipo de antagonismo que impediu uma eficiente associação entre essas estirpes e as plantas de soja. Resultados semelhantes foram reportados por Anjum et al. (2011), trabalhando com estirpes isoladas de nódulos de *Vigna radiata* L. inoculados em diferentes cultivares da mesma espécie de origem.

Em relação à estirpe capaz de nodular as plantas de soja (UFPI B3-4), esta apresentou boa performance, inclusive proporcionou eficiência relativa superior a três das estirpes inoculantes da soja (SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 587), o que sugere a avaliação da mesma em outros estudos para avaliação da sua eficiência agrônômica e capacidade competitiva em solo. Entre as estirpes não nodulíferas que promoveram o crescimento das plantas de soja, destaca-se a eficiência das estirpes UFPI B1-7, UFPI B3-3, UFPI B5-4, UFPI B5-7A e UFPI 5-8A. Porém, essa capacidade foi expressa em condições axênicas, na ausência da interação com outros microrganismos e demais componentes do solo, podendo não representar a verdadeira contribuição dessas estirpes quando inoculadas em plantas cultivadas em solo. Assim, sugere-se em trabalhos futuros, a avaliação da capacidade dessas estirpes em promover o crescimento de plantas de soja e/ou outras culturas de interesse agrícola em experimento conduzido em solo.

3.2.2 Experimento com plantas de feijão-caupi

No experimento conduzido em vaso de Leonard com plantas de feijão-caupi, verificou-se efeito significativo dos tratamentos sobre o NN, MSN, MSPA, MSR, MST, EFCN e EFSN (Tabela 4). Os controles negativos (sem N mineral e com N mineral) não apresentaram nodulação, indicando que não houve contaminação no experimento. Das 27 estirpes avaliadas, apenas 8 foram capazes de nodular plantas de feijão-caupi. Entre essas estirpes, o NN variou de 56 a 165 nódulos planta⁻¹, sendo esses valores médios obtidos nos tratamentos

inoculados com as estirpes UFPI B7-6 e UFPI B3-4, respectivamente. O maior NN foi obtido no tratamento inoculado com a estirpe inoculante INPA 3-11B (226 nódulos planta⁻¹), o qual diferiu significativamente dos demais tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 Número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), eficiência em relação ao controle nitrogenado (EFCN) e ao controle sem nitrogênio (EFSN) obtidos em plantas de feijão-caupi inoculadas com estirpes isoladas de solo de Várzea do Sudoeste piauiense

Tratamentos	NN -	MSN mg planta ⁻¹	MSPA -----g planta ⁻¹	MSR -----	MST -----	EFCN ----- %	EFSN -----
UFPI B1-5	0 e*	0 e	0,30 i	0,23 g	0,53 i	10 h	155 f
UFPI B1-7	0 e	0 e	0,29 i	0,20 h	0,50 i	9 h	151 f
UFPI B1-8	0 e	0 e	0,47 g	0,29 g	0,76 h	15 e	240 e
UFPI B1-9	0 e	0 e	0,33 h	0,38 f	0,71 h	11 g	171 f
UFPI B3-1	0 e	0 e	0,24 i	0,34 f	0,58 i	7 i	124 g
UFPI B3-3	0 e	0 e	0,41 h	0,36 f	0,77 h	13 f	208 e
UFPI B3-4	165 b	163 b	1,33 d	0,83 c	2,16 d	42 c	676 c
UFPI B3-5	155 b	101 c	1,13 e	0,50 e	1,62 e	38 c	571 c
UFPI B3-7	68 d	26 d	0,34 h	0,16 h	0,51 i	11 g	177 f
UFPI B4-3	159 b	68 c	0,35 h	0,36 f	0,71 h	11 g	175 f
UFPI B4-5	91 c	59 d	0,50 g	0,26 g	0,76 h	16 e	260 e
UFPI B4-6	63 d	31 d	0,32 h	0,25 g	0,57 i	10 g	165 f
UFPI B4-7	0 e	0 e	0,31 h	0,30 g	0,61 i	10 g	161 f
UFPI B5-4	0 e	0 e	0,39 h	0,54 e	0,93 g	12 f	203 e
UFPI B5-6	0 e	0 e	0,27 i	0,46 e	0,74 h	8 h	139 f
UFPI B5-7A	104 c	98 c	0,77 f	0,69 d	1,47 f	24 d	397 d
UFPI B5-8A	0 e	0 e	0,37 h	0,45 e	0,82 g	11 g	192 f
UFPI B6-1	0 e	0 e	0,41 h	0,37 f	0,78 h	13 f	210 e
UFPI B6-3	0 e	0 e	0,33 h	0,42 f	0,74 h	10 g	168 f
UFPI B6-9B	0 e	0 e	0,28 i	0,43 e	0,71 h	9 h	142 f
UFPI B7-1	0 e	0 e	0,36 h	0,48 e	0,84 g	11 g	186 f
UFPI B7-3	0 e	0 e	0,47 g	0,38 f	0,86 g	15 e	242 e
UFPI B7-5	0 e	0 e	0,22 i	0,32 g	0,54 i	7 i	110 g
UFPI B7-6	56 d	45 d	0,35 h	0,37 f	0,72 h	11 g	178 f

Tabela 4, continua

Tratamentos	NN	MSN mg planta ⁻¹	MSPA	MSR -----g planta ⁻¹ -----	MST	EFCN ----- % -----	EFSN
UFPI B7-7B	0 e	0 e	0,39 h	0,47 e	0,87 g	12 f	205 e
UFPI B7-8	0 e	0 e	0,28 i	0,48 e	0,76 h	9 h	144 f
UFPI B7-9	0 e	0 e	0,34 h	0,37 f	0,71 h	11 g	175 f
INPA 3-11B	226 a	237 a	3,62 a	1,44 b	5,07 b	114 a	1845 a
UFLA 3-84	45 d	82 c	2,13 c	0,42 f	2,54 c	67b	1086 b
BR 3267	41 d	109 c	1,38 d	0,83 c	2,22 d	44 c	699 c
CN	0 e	0 e	3,19 b	2,10 a	5,29 a	100 a	1633 a
SN	0 e	0 e	0,20 i	0,12 h	0,32 j	6 i	100 g
CV (%)	34,09	2,46	9,63	9,58	6,20	4,49	2,74

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os tratamentos inoculados com as estirpes UFPI B3-4, UFPI B3-5, UFPI B4-3, UFPI B5-7A e UFPI B4-5 se destacaram por apresentarem NN estatisticamente superiores a duas das estirpes inoculantes, UFLA 3-84 e BR 3267. Já os tratamentos inoculados com as estirpes UFPI B3-7, UFPI B4-6 e UFPI B7-6 apresentaram NN semelhante entre si, situando-se no mesmo grupo das estirpes UFLA 3-84 e BR 3267 (Tabela 4).

Assim como para o NN, a estirpe inoculante INPA 3-11B promoveu a maior produção de MSN (237 mg planta⁻¹). Entre as cinco estirpes que se destacaram quanto ao NN, apenas a UFPI B3-4 promoveu produção de MSN significativamente superior às estirpes inoculantes UFLA 3-84 e BR 3267. As menores produções de MSN foram obtidas nos tratamentos inoculados com as estirpes UFPI B3-7, UFPI B4-5, UFPI B4-5 e UFPI B7-6, as quais apresentaram comportamento semelhante entre si e inferior às estirpes inoculantes (Tabela 4).

Em relação à MSPA, o tratamento inoculado com a estirpe inoculante INPA 3-11B promoveu produção significativamente superior (3,62 g planta⁻¹) aos demais tratamentos, inclusive a obtida no controle adubado com N mineral

(3,19 g planta⁻¹). As demais estirpes apresentam produção inferior ao controle com N mineral (Tabela 4).

A estirpe inoculante UFLA 3-84, apesar de promover MSPA inferior a INPA 3-11B e ao controle com N mineral, apresentou desempenho superior às demais estirpes. Das 27 estirpes avaliadas, a UFPI B3-4 foi a única que promoveu produção de MSPA semelhante a uma das estirpes inoculantes (BR 3267). Porém, em relação ao controle sem N mineral, 74% das estirpes proporcionaram incrementos significativos na produção de matéria seca da parte aérea (Tabela 4).

Com relação às produções de MSR e MST, variaram de 0,12 a 2,10 g planta⁻¹ e de 0,32 a 5,29 g planta⁻¹ obtidas, respectivamente, nos controles sem N mineral e com N mineral (Tabela 4). Todas as estirpes, incluindo as inoculantes, promoveram produções inferiores ao controle com N mineral. Entre os tratamentos inoculados, a estirpe INPA 3-11B destacou-se estatisticamente das demais tanto para MSR, quanto para MST. A estirpe UFPI B3-4 agrupou-se com a estirpe BR 3267, em relação à MSR, fornecendo produções superiores às outras sete estirpes nodulíferas e à UFLA 3-84. As estirpes nodulíferas UFPI B5-7A, UFPI B3-5 e mais sete das estirpes que não nodularam plantas de feijão-caupi (UFPI B5-4, UFPI B5-6, UFPI B5-8A, UFPI B6-9B, UFPI B7-1, UFPI B7-7B e UFPI B7-8) também proporcionaram produções de MSR superiores à estirpe inoculante UFLA 3-84. Já em relação a MST, a estirpe UFLA 3-84 promoveu maior produção em relação às demais estirpes, à exceção da INPA 3-11B. Em relação ao controle sem N mineral, todas das estirpes avaliadas apresentaram incrementos significativos na produção MST. Entre as estirpes que não nodularam, os incrementos obtidos em relação à MSR e MST do controle sem N mineral foi de até 350 e 192%, respectivamente, no tratamento inoculado com a estirpe UFPI B5-4 (Tabela 4).

Para a EFCN e EFSN, verificou-se uma ampla variabilidade entre as estirpes avaliadas. A estirpe inoculante INPA 3-11B destacou-se das demais, apresentando eficiência semelhante ao controle com N mineral. A estirpe UFLA 3-84, apesar da menor eficiência em relação ao controle com N mineral e a estirpe INPA 3-11B, apresentou eficiência superior às demais estirpes. Entre as 27 estirpes avaliadas, a UFPI B3-4 e a UFPI B3-5 mostraram eficiência significativamente semelhantes entre si e superiores às demais, agrupando-se com estirpe inoculante BR 3267. Em relação ao controle sem N mineral, verificou-se que 92% das estirpes avaliadas promoveram maior eficiência, sendo que os valores médios de EFSN foram superiores a 160% para 20 (74%) das estirpes.

Considerando-se que 25 das estirpes avaliadas no presente experimento foram capazes de nodular plantas de feijão-caupi (ANEXO C) em experimento de autenticação (MARTINS, 2011b), esperava-se maior taxa de nodulação no presente experimento. Essa baixa ocorrência de nodulação pode estar relacionada, entre outros fatores, à interferência das condições ambientais na expressão dos genes responsáveis pela formação e funcionamento dos nódulos, uma vez que o experimento de autenticação e o presente experimento foram conduzidos em diferentes condições ambientais. Dependendo do gênero de bactéria, os genes envolvidos na nodulação podem ser perdidos facilmente em condições adversas. Estirpes dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, que possuem os genes responsáveis pela nodulação localizados nos plasmídeos, apresentam capacidade nodulífera muito mais instável que as estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, em que a maioria dos genes da nodulação localiza-se nos cromossomos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Assim, algumas das estirpes avaliadas no presente experimento podem ter perdido os genes envolvidos na nodulação devido à sua localização nos plasmídeos. No entanto, devem ser realizados alguns testes futuramente, como

por exemplo, a avaliação da presença do gen *nodC* (N-acetylglucosaminyl transferase), para averiguar a capacidade nodulífera ou não dessas estirpes.

A avaliação de algumas variáveis, como o NN, MSN e MSPA é importante no processo de seleção e recomendação de novas estirpes, pois determinam a eficiência agrônômica das estirpes para serem utilizadas como inoculantes comerciais (BRASIL, 2011). No trabalho de Martins (2011b), do qual foram selecionadas as estirpes utilizadas no presente trabalho, verificou-se que todas as estirpes, com capacidade nodulífera, proporcionaram produção de MSN semelhante às estirpes inoculantes UFLA 3-84 e BR 3267, e 18 dessas promoveram desempenho do feijão-caupi equivalentes às plantas que receberam adubação com N mineral. No entanto, no presente trabalho, verificou-se que das 18 estirpes que se destacaram no trabalho de Martins (2011b), apenas duas (UFPI B3-5 e UFPI B5-7A) proporcionaram produções de MSN semelhante a uma das estirpes inoculantes do feijão-caupi (BR 3267), e todas essas estirpes promoveram produção de MSPA inferior às obtidas nas plantas inoculadas com as estirpes recomendadas e nas adubadas com N mineral. Por outro lado, a estirpe UFPI B3-4, que não se destacou no trabalho anterior (MARTINS, 2011b), apresentou, no presente trabalho, desempenho superior às estirpes BR 3267 e UFLA 3-84 quanto ao NN e MSN e equivalente a estirpe BR 3267 em relação à MSPA, apesar da sua menor eficiência em relação ao controle com N mineral e às outras estirpes inoculantes (UFLA 3-84 e INPA 3-11B). As diferentes respostas observadas, nestes experimentos de seleção, podem estar relacionadas, entre outros fatores, à interferência dos fatores ambientais e das condições de cultivo de cada experimento (composição a solução nutritiva, tipo de recipiente e, principalmente, o tempo de condução dos experimentos).

Nóbrega (2006), avaliando a ocorrência e eficiência de bactérias que nodulam feijão-caupi em diferentes sistemas de uso da terra, em trabalho conduzido em vasos de Leonard, obteve valores médios de MSPA superiores ao

presente trabalho para os controles com e sem N mineral e para os tratamentos inoculados com as estirpes UFLA 3-84 e INPA 3-11B. No trabalho de Lima, Pereira e Moreira (2005) foram verificados valores semelhantes aos obtidos por Nóbrega (2006). Em ambos os trabalhos mencionados, ao contrário do presente trabalho, a estirpe UFLA 3-84 se destacou em relação à INPA 3-11B. Já no experimento de Florentino et al. (2010), conduzido em vasos de Leonard, os valores médios de MSPA de plantas de feijão-caupi obtidos nos controles sem N mineral ($0,09 \text{ g planta}^{-1}$) e com N mineral ($3,71 \text{ g planta}^{-1}$) foram semelhantes ao presente trabalho, e a estirpe INPA 3-11B proporcionou maior produção de MSPA em relação à UFLA 3-84, corroborando aos resultados obtidos no presente trabalho. Deve-se ressaltar que, nos dois primeiros trabalhos citados, (LIMA; PEREIRA; MOREIRA, 2005; NÓBREGA, 2006) foi utilizada nos experimentos a solução nutritiva de “Jensen” (JENSEN, 1942), enquanto que, no terceiro trabalho (FLORENTINO et al., 2010), assim como no presente trabalho, foi utilizada solução nutritiva de “Hoagland” na condução do experimento. Esses dados evidenciam que a composição da solução influencia não somente o desempenho das plantas, mas também a eficiência das estirpes de rizóbios.

Entre as estirpes que vêm sendo utilizadas atualmente como inoculantes de feijão-caupi (INPA 3-11B, UFLA 3-84 e BR 3267), deve-se ressaltar a eficiência da INPA 3-11B, a qual apresentou desempenho superior ao controle com N mineral quanto à produção de matéria seca da parte aérea. Esse, portanto, é mais um trabalho que afirma o potencial dessa estirpe para fornecer todo o N necessário ao desenvolvimento do feijão-caupi, sem necessidade do uso de fertilizantes nitrogenados que, além de caros, podem contaminar o meio ambiente quando manejados inadequadamente.

Dentre as estirpes que não nodularam plantas de feijão-caupi, destacaram-se as seguintes: UFPI B5-4, UFPI B5-6, UFPI B5-8A, UFPI B6-9B, UFPI B7-1, UFPI B7-7B e UFPI B7-8 por apresentarem produções de MSR

superiores à estirpe inoculante UFLA 3-84. Esses dados indicam que essas estirpes estimularam o desenvolvimento radicular, através de outros processos biológicos promotores do crescimento vegetal, destacando-se a produção AIA, pois todas essas estirpes, à exceção da UFPI B7-1, apresentaram capacidade para síntese de AIA *in vitro* (Tabela 2). O AIA é um fitohormônio que promove a alongação das células meristemáticas, atuando principalmente na formação das raízes laterais e pelos radiculares, e também na germinação das sementes (BISWAS et al., 2000). Desse modo, na presença de concentrações adequadas desse hormônio, a planta crescerá mais vigorosa devido à sua maior capacidade de aquisição de água e nutrientes pelas raízes. No entanto, deve-se admitir que, além da síntese de AIA, essas bactérias podem ter atuado em outros processos estimuladores do crescimento radicular das plantas de feijão-caupi no presente experimento.

De maneira geral, considerando que 92% das estirpes avaliadas apresentaram maior eficiência em relação ao controle sem N mineral, pode-se inferir que os solos sob cultivo tradicional de feijão-caupi em agroecossistemas de Várzeas do Sudoeste piauiense favorecem a ocorrência de bactérias simbióticas e não simbióticas com potenciais para promoção de crescimento vegetal. Como o presente trabalho também se trata do segundo estágio de seleção de estirpes de BFNNL para serem utilizadas na cultura do feijão-caupi, recomenda-se, em estudos posteriores, a avaliação da estirpe UFPI B3-4, a qual apresentou destaque quanto à nodulação, produção de MSPA e eficiência simbiótica, para verificação da sua capacidade competitiva e eficiência simbiótica em vasos com solo. Sugere-se também a avaliação das estirpes que promoveram maior crescimento radicular (UFPI B5-4, UFPI B5-6, UFPI B5-8A, UFPI B6-9B, UFPI B7-1, UFPI B7-7B e UFPI B7-8) em outras culturas de interesse agrícola e em vasos com solo, para verificação do potencial das mesmas na presença de outros microrganismos.

3.3 Caracterização genética das estirpes

Selecionaram-se as estirpes que apresentaram melhor desempenho na promoção do crescimento de plantas de soja e/ou de feijão-caupi para o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, totalizando 14 estirpes. No entanto, não foi possível fazer a extração do DNA genômico de algumas bactérias com o kit de extração (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ da *Zymo Research*) utilizado; por isso, foram caracterizadas geneticamente apenas 8 estirpes, sendo 3 nodulíferas e 5 não nodulíferas (Tabela 5). As sequências obtidas, a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA, variaram de 723 a 1011 pares de bases, as quais foram submetidas ao banco de dados “*GenBank*” (National Center for Biotechnology Information, 2013) para comparação com as estirpes tipo das espécies depositadas no mesmo. A porcentagem de máxima similaridade variou 99 a 100%, entre as estirpes avaliadas e as estirpes tipo depositadas no *GenBank* (Tabela 5).

Através da comparação das sequências, obtidas com as depositadas no *GenBank*, verificou-se, para todas as estirpes avaliadas, a mesma similaridade para mais de uma espécie, conforme apresentado na Tabela 5. Por esse motivo, serão considerados apenas os gêneros, no presente trabalho. Foi possível a identificação de quatro gêneros: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus* (Tabela 5).

As três estirpes nodulíferas de feijão-caupi submetidas ao sequenciamento do gene 16S rRNA (UFPI B3-7; UFPI B4-3 e UFPI B7-6) foram identificadas (99% de similaridade) como pertencentes ao gênero *Paenibacillus*. Essas estirpes apresentaram baixa capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (Tabela 1), produção de AIA abaixo de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2) e valores de eficiência relativa semelhantes entre si e superiores aos obtidos com as plantas de feijão-caupi sem nitrogênio mineral e sem inoculação, porém, foram bem menos eficientes em relação às estirpes inoculantes do feijão-caupi

(Tabela 4). O gênero *Paenibacillus* não é comumente conhecido como nodulífero de feijão-caupi e/ou outras espécies de leguminosas, no entanto, em alguns trabalhos recentemente já foi detectada a capacidade nodulífera desse gênero em feijão-caupi (JARAMILLO, 2010; MARRA et al., 2012)

As estirpes UFPI B3-1 e UFPI B3-3 foram identificadas, com 100% de similaridade, como pertencentes ao gênero *Bacillus*. Ambas foram capazes de promover o crescimento de plantas de soja e feijão-caupi, resultado em maior produção de MST, em relação ao controle sem N mineral e sem inoculação; no entanto, a UFPI B3-3 foi mais eficiente (Tabelas 3 e 4).

A UFPI B5-6, identificada como *Enterobacter* sp. (99% de similaridade) foi a estirpe que promoveu o maior índice de solubilização de fosfato de cálcio (Tabela 1) e está entre as estirpes com maior capacidade para biossíntese de AIA em meio suplementado com triptofano (Tabela 2). Esta foi capaz de promover o crescimento de plantas de soja e de feijão-caupi, estimulando principalmente o crescimento radicular (Tabelas 3 e 4).

Em relação à estirpe UFPI B5-8A, referida como *Pseudomonas* sp. (99% de similaridade), ela apresentou média capacidade para solubilização de fosfato de cálcio (Tabela 1), produção de AIA abaixo de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2) e se destacou, entre as estirpes não simbióticas, sendo uma das mais eficientes em promover o crescimento de plantas de soja e de feijão-caupi (Tabelas 3 e 4).

A estirpe UFPI B7-9, pertencente ao gênero *Paenibacillus* (99% de similaridade), não foi capaz de realizar nenhum dos processos promotores do crescimento vegetal avaliados no presente trabalho, no entanto, foi capaz de promover o crescimento de plantas de soja e feijão-caupi, com maior efeito sobre o crescimento radicular.

Estirpes não simbióticas, pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Paenibacillus*, têm sido frequentemente isoladas de nódulos de leguminosas (BENHIZIA et al, 2004; LI et al., 2008; MARRA et

al., 2012; PALANIAPPAN et al., 2010), porém, ainda são poucos os estudos que relatam a função dessas bactérias em relação a promoção do crescimento vegetal.

Ressalta-se que o sequenciamento do gene 16S rRNA foi uma técnica eficiente para detectar a diversidade das bactérias avaliadas, ao nível de gênero. No entanto, mostrou-se ineficiente para discriminação ao nível de espécie, corroborando aos resultados encontrados em outros estudos relacionados à diversidade de bactérias (GUIMARÃES et al. 2012; JARAMILLO, 2010).

Tabela 5 Identificação das estirpes, simbióticas e não simbióticas, isoladas de nódulos de feijão-caupi, baseada nas sequências mais similares encontradas no *GenBank* (NCBI)

Estirpes	Nodula- ção	Testes fenotípicos		Número de pares de base	Sequência mais similar encontrada no <i>GenBank</i> (NCBI)		
		ISF (mm)	AIA c/T ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Espécie	% de Simila- ridade	Número de acesso
UFPI B3-1*	-	1,18	3,71	889	<i>Bacillus</i> sp.	100	KC189946.1
				889	<i>Bacillus megaterium</i>	100	JN688166.1
UFPI B3-3*	-	1,23	ND	927	<i>Bacillus</i> sp.	100	KC189946.1
				927	<i>Bacillus megaterium</i>	100	JN210907.1
UFPI B5-6*	-	3,54	51,00	945	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99	HM131221.1
				945	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99	AY335554.1
				945	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	JQ820025.1
UFPI B5-8A*	-	2,32	9,71	723	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	JQ247014.1
				723	<i>Pseudomonas monteilii</i>	99	FJ905913.1
UFPI B7-9*	-	CNS	ND	981	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	99	EU882855.1
				981	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	GU328695.1
UFPI B3-7*	+	1,33	0,41	948	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	99	EU882855.1
				948	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	GU328695.1
UFPI B4-3*	+	1,44	11,33	1011	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	99	JN084141.1
				1011	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	GU328695.1
UFPI B7-6*	+	1,30	0,87	974	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	GU328679.1
				974	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	99	JN084141.1

Testes fenotípicos: ISF = índice de solubilização final; AIA c/T = máxima produção de ácido-3-indol acético (AIA) na presença triptofano; CNS = Cresceu não solubilizou; ND = Não detectado; *Estirpes com a mesma similaridade para mais de uma espécie.

4 CONCLUSÕES

Entre as estirpes avaliadas, 81% foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*, destacando-se a UFPI B5-8A e a UFPI B5-6.

A maior síntese de AIA ocorreu na presença da suplementação com triptofano, nos meios 79 e DYGS, destacando-se a UFPI B5-4, UFPI B5-6 e UFPI B5-7A.

As estirpes UFPI B1-7, UFPI B3-3, UFPI B5-4, UFPI B5-7A e UFPI 5-8A, apesar de não fixarem nitrogênio em simbiose com plantas de soja, destacaram-se na promoção do crescimento dessa espécie vegetal.

A estirpe UFPI B3-4 formou simbiose eficiente com plantas de soja, apresentando desempenho semelhante à estirpe SEMIA 5080 e superior às demais estirpes inoculantes da soja quanto à produção de matéria seca da parte aérea.

A maioria das estirpes promoveu o crescimento de feijão-caupi, porém apresentaram eficiência variável. Entre as estirpes nodulíferas, a UFPI B3-4 destacou-se na produção de matéria seca da parte aérea, apesar da menor eficiência em relação ao tratamento adubado com N mineral e as estirpes UFLA 3-84 e INPA 3-11B.

Três das estirpes nodulíferas, submetidas ao sequenciamento do gene 16S rRNA, foram identificadas como pertencentes ao gênero *Paenibacillus*. Entre as estirpes não nodulíferas promotoras do crescimento vegetal, foi possível a identificação dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus*.

REFERÊNCIAS

- ANJUM, M. A. et al. Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings under axenic conditions. **Soil Environmental**, Pakistan, v. 30, n. 1, p. 18-26, 2011.
- ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 231-237, 2002.
- BALAJI, N. et al. Optimization of fermentation condition for indole acetic acid production by *Pseudomonas* species. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, Chennai, v. 3, p. 4, p. 797 -803, 2012.
- BENHIZIA, Y. et al. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum* . **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p.462-468, 2004.
- BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establishment of indices for the study of phosphate solubilization by soil bacteria. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, p. 399-406, 1976.
- BISWAS, J. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 5, p. 880-886, 2000.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: Dez. 2011.
- CAMACHO, M. et al. Soils of the Chinese Hubei province show a very high diversity of *Sinorhizobium fredii* strains. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, p. 592-602, 2002.
- CARSON, K. C. et al. Siderophore and organic acid production in root nodule bacteria. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 157, p. 264-271, 1992.
- COSTA, E. M. **Eficiência agrônômica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio em feijão-caupi cv. BRS Guariba no Pólo de Produção de Bom Jesus**, PI. 2011. 52 p. Monografia (Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2011.

COSTA, E. M. et al. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, p. 1-7, 2011.

CHUEIRE, L. M. O.; HUNGRIA, M. N₂-fixation ability of Brazilian soybean cultivars with *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium xinjiangensis*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 196, p. 1-5, 1997.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Seropédica, 1995. 60 p.

DREYFUS, B. L.; ELMERICH, C.; DOMMARGUES, Y. R. Free-living rhizobium strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, p. 711-713, 1983.

FAJARDO, J. D. V.; SOUZA, L. A. G.; ALFAIA, S. S. Características químicas de solos de várzeas sob diferentes sistemas de uso da terra, na calha dos rios baixo Solimões e médio Amazonas, **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 4, p. 731-740, 2009.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 143 p.

FLORENTINO, L. A. et al. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 1113-1123, 2010.

GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, 2012.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 343-357, 2004.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizobio oriundos de solos ácidos do município do Rio Preto da Eva, Amazonas. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, n. 48, p. 55-70, 2007.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. T. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experiment Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

HUNG, P. Q. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 155-162, 2007.

JARAMILLO, P. M. D. **Diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob agrofloresta na Amazônia Ocidental usando o caupi como planta isca**. 2010. 66 p. Dissertação (Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

JENSEN, H. L. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, Sydney, v. 66, n. 1, p. 98-102, 1942.

JESUS, A. A. **Caracterização fenotípica e simbiótica de populações e estirpes de bactérias que nodulam *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong no Sudoeste do Piauí**. 2012. 77 p. Dissertação (Mestrado em solos e nutrição de plantas) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2012.

KAN, F. L. et al. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 188, p. 103-115, 2007.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, The Netherlands, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUMAR, P. R.; RAM, M. R. Production of indole acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Vigna trilobata* (L) Verdc. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 6, n. 27, p. 5536-5541, 2012.

KUSS, A. V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LACERDA, A. M. et al. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, p. 67-82, 2004.

LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, p. 298-300, 2000.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Stackebrandt E, Goodfellow M(eds), John Wiley & Sons, New York, NY, 1991, p. 115-148.

LI, J. et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 40, p. 238-246, 2008.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. isoladas de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.

LIMA, A. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under diferente uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 319, p. 127-145, 2009.

LIMA, H. N. et al. Mineralogia e química de três solos de uma topossequência da bacia sedimentar do Alto Solimões, Amazônia ocidental. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 59-68, 2006.

MAGALHÃES, F. et al. A New acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417- 430, 1983.

MANDAL, S. M. et al. Optimization of cultural and nutritional conditions for indole 3-acetic acid (IAA) production by a *Rhizobium* sp. isolated from root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Research Journal of Microbiology**, British, v. 2, p. 239-246, 2007.

MARTINS, L. V. **Eficiência simbiótica de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de solos da Várzea e do Cerrado Piauiense**. 2011b. 50 p. Monografia (Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2011b.

MARTINS, R. N. L. **Bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio em solos sob cultivo de feijão-caupi no Pólo de produção Bom Jesus- PI**. 2011a. 67 p. Dissertação (Mestrado em solos e nutrição de plantas) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2011a.

MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 603-609, 2011.

MARRA, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant Soil**, The Hague, v. 353, p. 289-307, 2012.

MELLONI, R. et al. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 235-246, 2006.

MOREIRA, F. M. S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 1991. 158 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1991.

MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford, CAB International Publishing, 2006, p. 237-270.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MINAMISAWA, K. et al. Preferential nodulation of *Glycine max*, *Glycine soja* and *Macroptilium atropurpureum* by two *Bradyrhizobium* species *japonicum* and *elkanii*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 49-56, 1997.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Lucknow, v. 170, p. 265-270, 1999.

NÓBREGA, R. S. A. **Efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo, ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**. 2006. 188 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NORRIS, D. O.; DATE, R. A. 1976. Legume bacteriology. In: SHAW, N.H.; BRYAN, W.W. (Eds.) **Tropical pasture research-principles and methods**. Brisbane: CAB, 1976.

OLIVEIRA, S. M. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão-caupi, feijão comum e siratro**. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

OLIVEIRA, S. M. **Rizobactérias promovem o crescimento de feijoeiro-comum e de milho por diferentes processos**. 2011. 103 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ONA, O. et al. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters**, Lucknow, v. 246, p. 125-132, 2005.

PALANIAPPAN, P. et al. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 807-816, 2010.

PATIL, N. B. et al. Optimization of Indole 3acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane. **International Journal of Environmental Sciences**, Maharashtra, v. 2, n. 1, 2011.

PEREIRA, C. E. et al. Compatibility among fungicide treatments on soybean seeds through film coating and inoculation with *Bradyrhizobium* strains. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 585-589, 2010.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital capacity of source microbial species. **Microbiologia**, Madrid, v. 17, p. 362-370, 1948.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N. et al. Field assessment and genetic stability of *Sinorhizobium fredii* strain SMH12 for comercial soybean inoculants. **European Journal of Agronomy**, Vatican , v. 19, p. 299-309, 2003.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 172, p. 261-269, 1995.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 658-664, 2008.

SILVA, A. T. **Diversidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de siratro**. 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVA-FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 311-329, 2000.

SOARES, A. L. L. et al. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 795-802, 2006.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V.; YADAV, N. C. S. Phosphate solubilization by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. **Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 2, p. 635-639, 2007.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Quantitative survey of phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of grasses and legumes in the Amazon. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, p. 15-22, 1982.

STROSCHEIN, M. R. D. et al. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1738-1743, 2011.

TAURIAN, T. et al. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, The Hague, v. 329, p. 421-431, 2010.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, p. 571-586, 2003.

VIEIRA NETO, S. L. et al. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 861-870, 2008.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970, 164 p.

YAMADA, E. A. et al. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, p. 423-432, 2003.

ZILLI, J. E. et al. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 281-287, 2004.

CAPÍTULO 3

POTENCIAL DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI NO CERRADO PIAUIENSE

RESUMO

Nos agroecossistemas do Cerrado no Sudoeste piauiense, denominados de Chapadas, pouco se conhece sobre a diversidade e o potencial de promoção do crescimento vegetal de bactérias nativas, seja através da fixação biológica de nitrogênio ou pela atuação em outros processos biológicos fitoestimuladores. Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de promoção do crescimento vegetal por bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos de Chapadas do Sudoeste piauiense; selecionar, entre as nodulíferas, as eficientes em fixar nitrogênio em simbiose com plantas de soja e feijão-caupi e avaliar a diversidade genética das bactérias simbióticas e não simbióticas eficientes na promoção do crescimento vegetal. Além de 23 estirpes oriundas de solos de Chapadas, foram incluídas na avaliação mais 3 estirpes oriundas de solos de Várzeas, totalizando 26 estirpes. Avaliou-se a capacidade dessas estirpes, incluindo simbiótica e não simbiótica, em realizar os seguintes processos: fixação de nitrogênio em vida livre, em meio semi-sólido LO; solubilização de fosfatos inorgânicos de cálcio (em meio NBRIP), alumínio (em meio GES) e ferro (em meio GELP) e produção de ácido-3-indol acético (AIA) em meio 79 e DYGS, na ausência e presença do aminoácido triptofano (100 mg L^{-1}). Das 26 estirpes, 21 foram avaliadas em plantas soja, em experimento conduzido em garrafas *long neck*, e todas foram avaliadas em plantas de feijão-caupi, em experimento conduzido em vasos de Leonard. Para ambos os experimentos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições. Entre as estirpes avaliadas, nenhuma fixou nitrogênio em vida livre em ambas às fontes de carbono adicionadas ao meio LO, 69% foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*. Na presença da suplementação com triptofano, todas as estirpes foram capazes de sintetizar o AIA em meio 79 e 80% o sintetizaram no meio DYGS. Nenhuma estirpe foi capaz de nodular a soja, no entanto, 42% foram capazes de promover o crescimento das plantas dessa espécie. Em relação ao feijão-caupi, apenas quatro estirpes nodularam, porém a maioria (88%) das estirpes promoveu aumento da matéria seca da parte aérea em relação ao controle sem nitrogênio mineral. Entre as nodulíferas, a UFPI CB1-3 foi a que apresentou melhor desempenho, apesar de sua menor eficiência em relação às estirpes inoculantes do feijão-caupi e ao controle adubado com nitrogênio mineral. O sequenciamento do gene 16S rRNA identificou as estirpes nodulíferas como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Bacillus* e *Paenibacillus* e as não nodulíferas promotoras do crescimento vegetal como pertencentes aos gêneros *Citrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Enterobacter*.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Endofíticas. Solubilização de fosfato. Ácido-3-indol acético.

ABSTRACT

In the Cerrado agroecosystems in Piauí Southeast, denominated as highlands, little is known about the diversity and potential of promoting plant growth by bacteria native, through of biological nitrogen fixation or by acting in other biological processes phytostimulators. Thus, the present study aimed evaluate the potential for promotion plant growth by symbiotic and non-symbiotic bacteria isolated from nodules of cowpea grown in highlands soils of Piauí Southwest, select the most efficient in symbiotic N₂ fixation with soybean and cowpea and assess the genetic diversity of symbiotic and non-symbiotic bacteria efficient in promoting plant growth. In addition, twenty-three strains from highland soils were included in the evaluation three strains from floodplains soils, totaling twenty-six strains. We evaluated the ability these strains, including symbiotic and non-symbiotic, to perform the following processes: nitrogen fixation in free-living in semi-solid LO; inorganic phosphates solubilization of calcium (medium NBRIP), aluminum (medium GES) and iron (medium GELP) and production of indole-3-acetic acid (IAA) in medium 79 and DYGS in the absence and presence of tryptophan (100 mg L⁻¹). Of the twenty-six strains, twenty-one were evaluated in soybean plants, in an experiment conducted in bottles *long neck*, and all were evaluated in cowpea plants, in an experiment conducted in Leonard jars. For both experiments, the experimental design was completely randomized design with three replications. Among the strains tested, any fixed nitrogen in free-living on both carbon sources added to the medium LO, 69% were able to solubilize calcium phosphate *in vitro*. In the presence of supplemental tryptophan, all strains were able to synthesize the AIA in medium 79 and 80% synthesized in medium DYGS. Any strain was capable of nodulating soybean, however, 42% were able to promote the plants growth of this species. In relation to cowpea, only four strains nodulate, but most (88%) of the strains caused an increase in shoot dry matter compared the control without mineral nitrogen. Among the nodulating, UFPI CB1-3 showed the best performance, despite their lower efficiency compared to inoculant strains of cowpea and control fertilized with mineral nitrogen. The sequencing of the 16S rRNA gene, identified as nodulating strains belonging to the genera *Bradyrhizobium*, *Bacillus* and *Paenibacillus* and non nodulating promoting of plant growth as belonging to the genera *Citrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* and *Enterobacter*.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Endophytic. Solubilization of phosphate. Indole-3-acetic acid.

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado constitui o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado apenas pela Floresta Amazônica. No estado do Piauí, esse bioma ocupa cerca de 11,5 milhões de hectares, abrangendo a região Sudoeste e parte da região Sul, as quais compõem uma das últimas fronteiras agrícolas nacionais (AGUIAR; MONTEIRO, 2005). Em função da ocupação acelerada para exploração agrícola intensiva, nos últimos anos, a conservação da biodiversidade desse bioma no Estado está sendo cada vez mais ameaçada. Apesar dessa ameaça, nos agroecossistemas do Cerrado piauiense a maior preocupação tem sido em relação à interferência dos sistemas de cultivo sobre os atributos químicos e físicos do solo (CAMPOS et al., 2011; MATIAS et al., 2009; PRAGANA et al., 2012), sendo poucos os estudos que avaliam a função e/ou diversidade dos microrganismos edáficos que ocorrem nesses ambientes (JESUS, 2012; MARTINS, 2011a; ZILLI et al., 2004).

Dentre os diversos grupos de microrganismos edáficos, as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL) têm um papel de destaque na manutenção dos agroecossistemas. No sentido de otimizar o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) para o aumento da produtividade agrícola, têm sido desenvolvidos muitos trabalhos com a finalidade de estudar a diversidade de BFNNL oriundas de diferentes ecossistemas (GUIMARÃES et al., 2012; LIMA et al., 2009; MOREIRA et al., 1993; MELLONI et al., 2006; NÓBREGA, 2006), buscando entender suas relações ecológicas e evolutivas e selecionar estirpes eficientes, visando a produção de inoculantes eficientes para culturas de interesse agrônomo.

Além das BFNNL, o interesse pelo estudo das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) conhecidas como PGPR – “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria” tem crescido cada vez mais, pois estas são capazes de

promover o crescimento vegetal através de diferentes mecanismos, incluindo a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis, produção de fitohormônio, fixação de nitrogênio em vida livre e produção de sideróforos, entre outros. As RPCPs são encontradas entre as bactérias de vida livre, associativas e/ou endofíticas. Essas últimas são capazes de colonizar as raízes das plantas (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989) e, no caso das leguminosas, são capazes de coabitar com as BFNNL dentro dos nódulos (KAN et al., 2007; LI et al., 2008; LIMA et al., 2009; SILVA, 2012).

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa de grande importância agrícola, por ser uma das principais fontes de proteína vegetal e contribuir de forma significativa para geração de emprego e renda no campo. Essa espécie é capaz de beneficiar-se amplamente da FBN e tem sido bastante utilizada como planta-isca em estudos de diversidade de BFNNL, devido à sua promiscuidade (GUIMARÃES et al., 2012; MARTINS, 2011a; MOREIRA, 2006; NÓBREGA, 2006; ZHANG et al., 2007). Além da captura de diversos gêneros e/ou espécies de BFNNL, tem sido relatado também o isolamento de bactérias não simbióticas endofíticas dos nódulos de feijão-caupi com grande potencial de promoção do crescimento vegetal (MARRA et al., 2012).

Nos agroecossistemas do Cerrado no Sudoeste piauiense, denominados de Chapadas, o feijão-caupi vem sendo explorado há mais de 10 anos, após a colheita da cultura do arroz ou da soja, mas pouco se conhece em relação à eficiência e diversidade de BFNNL nativas (MARTINS, 2011a; MARTINS, 2011b; ZILLI et al., 2004). No trabalho de Martins (2011a), verificou-se a ocorrência de populações de BFNNL nativas eficientes na FBN usando o feijão-caupi como planta-isca, e entre os isolados obtidos foi verificada alta diversidade fenotípica. Já em relação às RPCPs nativas, ainda não há estudos nesses agroecossistemas. Portanto, o estudo da eficiência e diversidade genética de

BFNNL e/ou RPCPs oriundas dos agroecossistemas de Chapadas do Sudoeste piauiense é de extrema importância para o conhecimento taxonômico e seleção de estirpes eficientes na FBN e/ou em outros processos promotores do crescimento vegetal, adaptadas às condições de estresse predominantes nessa região, como altas temperaturas.

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de promoção do crescimento vegetal por bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos de Chapadas do Sudoeste piauiense; selecionar, entre as nodulíferas, as eficientes em fixar nitrogênio em simbiose com plantas de soja e feijão-caupi e avaliar a diversidade genética das bactérias mais eficientes na promoção do crescimento vegetal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das estirpes e características culturais das estirpes

Utilizou-se 26 estirpes oriundas da Universidade Federal do Piauí (UFPI), as quais foram isoladas de nódulos de plantas de feijão-caupi (cultivar BR 17 Gurguéia) cultivadas em amostras de solos do Sudoeste piauiense no Pólo de Produção de Bom Jesus (MARTINS, 2011a). Dessas 23 são oriundas de solos de Chapadas e 3 são oriundas de solos de Várzeas. A identificação dos pontos de coleta, classe de solo, histórico das áreas e caracterização química das amostras de solos encontram-se em anexo (ANEXOS A e B). Para seleção dessas estirpes, utilizou-se como critério a capacidade nodulífera (ANEXO C), eficiência simbiótica e/ou capacidade de estimular o crescimento das plantas de feijão-caupi (BR 17 Gurguéia) em experimento de autenticação (MARTINS, 2011b) conduzido em garrafas de vidro do tipo *long neck* (500 ml).

As características culturais de cada estirpe, previamente caracterizadas por Martins (2011a) (ANEXO C), foram confirmadas em placas de petri contendo meio de cultura 79 sólido (FRED; WAKSMAN, 1928). Foram observados: tempo de crescimento, medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (rápido: 2 a 3 dias; intermediário: 4 a 5 dias; lento: 6 a 10 dias; muito lento: acima de 10 dias); modificação do pH do meio (acidificação, alcalinização e neutralização); coloração das colônias; diâmetro médio das colônias isoladas e absorção de indicador, conforme Moreira (1991).

2.2 Processos promotores do crescimento vegetal

As 26 estirpes selecionadas foram avaliadas quanto aos seguintes processos promotores do crescimento vegetal: fixação de nitrogênio em vida livre, em meio LO (DREYFUS; ELMERICH; DOMMERGUES, 1983), sendo testado tanto o lactato, como o manitol como fonte de carbono; capacidade de solubilizar fosfatos de cálcio (P-Ca) em meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999), de alumínio (P-Al) em meio GES (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982) e de ferro (P-Fe) em meio GELP (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982) e produção de ácido-3-indol acético (AIA) em meio “79” sem o corante azul de bromotimol e em meio DYGS, na ausência e presença da suplementação com triptofano (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Como controle positivo, utilizou-se a estirpe BR 5401^T (*Azorhizobium doebereineri*) para fixação de nitrogênio em vida livre, a estirpe UFLA 03 09 (*Acinetobacter* sp.) para solubilização de fosfato de cálcio (MARRA et al., 2012) e a estirpe BR 11001^T (*Azospirillum brasilense*) para produção de AIA. Os procedimentos metodológicos para avaliação desses processos encontram-se descritos no capítulo 2.

Os experimentos para avaliação da síntese de AIA, na ausência e presença da suplementação com triptofano, foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, e os tratamentos arranjados em esquema fatorial: 27 estirpes x 2 meios de cultura (79 e DYGS). Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

2.3 Avaliação da eficiência das estirpes em promover o crescimento de plantas de soja e feijão-caupi

2.3.1 Experimento em garrafas *long neck* com plantas de soja

No período de 15/05/2012 a 16/06/2012 foi conduzido um experimento em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG, com objetivo de avaliar a capacidade nódulífera, eficiência simbiótica e/ou capacidade promotora do crescimento vegetal de 21 das estirpes selecionadas, em simbiose ou associação com plantas de soja.

O experimento foi constituído por 27 tratamentos, com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado, sendo 21 correspondentes às inoculações com estirpes isoladas de solos de Chapadas do Sudoeste piauiense, 4 controles positivos, referentes à inoculação com estirpes inoculantes da soja, SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 5080 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkanii*) e SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), e 2 controles negativos sem inoculação, um com nitrogênio (N) mineral e o outro com baixa concentração de N mineral, considerado, neste trabalho, como controle sem N. Para a condução do experimento utilizaram-se garrafas recicláveis de 500 mL do tipo “long neck” revestidas com papel alumínio e contendo solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950), diluída quatro vezes. Nos tratamentos inoculados e no controle sem inoculação e sem N mineral, foi utilizada solução nutritiva Hoagland com baixa concentração de nitrogênio ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$). No controle sem inoculação e com N mineral foi utilizada a solução de Hoagland completa, com $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrogênio.

Os procedimentos de preparo da solução nutritiva, esterilização das garrafas contendo a solução nutritiva, preparo dos inoculantes, desinfestação e inoculação das sementes foram os mesmos descritos no capítulo 2.

Aos 30 dias, após a instalação do experimento, as plantas foram coletadas para avaliação do número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR),

matéria seca total (MST) e eficiência em relação ao controle sem inoculação e com N mineral (EFCN) e em relação ao controle sem inoculação e sem N mineral (EFSN). A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada pela seguinte fórmula: $EFCN = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ com N}) \times 100$ e $EFSN = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ sem N}) \times 100$.

Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância empregando-se o programa de análise estatística SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Para as variáveis NN e MSN os dados foram transformados pela raiz quadrada de $Y + 0,5$.

2.3.2 Experimento em vasos de Leonard com plantas feijão-caupi

No período de 10/09/2012 a 10/11/2012, foi conduzido um experimento na casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do DCS da UFLA, em Lavras, MG, para avaliação da eficiência simbiótica e/ou capacidade das estirpes em promover o crescimento de plantas de feijão-caupi (cultivar BR 17 Gurguéia) cultivadas em vasos de Leonard (VINCENT, 1970). Nesse experimento, foram utilizadas as 26 estirpes, sendo 23 oriundas de solos de Chapadas e 3 estirpes oriundas de solos de Várzeas do Sudoeste piauiense (UFPI B5-1, UFPI B4-9, UFPI B3-9), 3 controles positivos, referentes às inoculações com três estirpes atualmente autorizadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento como inocuantes para feijão-caupi, INPA 3-11B (*Bradyrhizobium elkani*), UFLA 3-84 (*Bradyrhizobium* sp.), BR 3267 (*Bradyrhizobium japonicum*) e 2 controles negativos sem inoculação, um sem N mineral e o outro com N mineral, totalizando 31 tratamentos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições.

Nos tratamentos inoculados e no controle sem inoculação e sem N mineral, foi utilizada solução nutritiva Hoagland com baixa concentração de nitrogênio ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$) e no controle sem inoculação e com N mineral foi utilizada a solução completa, com $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N. Os procedimentos para o preparo da solução, preparo dos vasos, esterilização da solução nutritiva, desinfestação das sementes de feijão-caupi (cultivar BR 17 Gurguéia), preparo dos inoculantes e inoculação encontram-se descritos no capítulo 2. Durante a condução do experimento, a solução nutritiva foi preparada, autoclavada e reposta nos vasos periodicamente, de acordo com a taxa de absorção das plantas.

As plantas foram coletadas aos 60 dias após a semeadura para avaliação do número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca de raiz (MSR), matéria seca total (MST) e eficiência em relação ao controle com N mineral (EFCN) e em relação ao controle sem N mineral (EFSN). Para a determinação da MSN e MSPA, EFCN e EFSN foram realizados os mesmos procedimentos descritos para o experimento com soja.

Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância empregando-se o programa de análise estatística SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os dados de NN e MSN foram transformados em raiz quadrada de $Y + 0,5$.

2.4 Caracterização genética das estirpes

As estirpes que apresentaram melhor desempenho nos experimentos conduzidos em vasos de Leonard e garrafas do tipo “*long neck*”, utilizando as plantas hospedeiras feijão-caupi e soja, respectivamente, foram selecionadas para o sequenciamento do gene 16S rRNA. A extração foi realizada com o kit de extração do DNA genômico bacteriano (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™

da *Zymo Research*) após o crescimento das bactérias em meio “79” líquido a 28°C pelo tempo de crescimento de cada uma, avaliado anteriormente. Para a amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foi utilizado o mesmo procedimento descrito no capítulo 2. As sequências obtidas foram submetidas ao “*Basic Local Alignment Search Tool*”- BLAST para comparação com as estirpes tipo das espécies depositadas no banco de dados *GenBank*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Processos promotores do crescimento vegetal

Quanto à capacidade de fixação de nitrogênio em vida livre, nenhuma das estirpes formou película sobre a superfície do meio LO, em ambas as fontes de carbono utilizadas (lactato e manitol). A estirpe BR 5401^T (*Azorhizobium doebereineri*), controle positivo, formou película até o sétimo dia após a inoculação, no meio LO com lactato de sódio. Resultados semelhantes foram verificados para as estirpes avaliadas no capítulo 2. Por outro lado, no trabalho de Oliveira (2009), foi verificada a formação de película, por bactérias nodulíferas e associativas, sobre a superfície do meio LO com lactato, e também com manitol.

Além do meio LO, existem outros meios para avaliação da fixação do N₂ em vida livre, a exemplo do JNFb, NFb e Fam (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995; MAGALHÃES et al., 1983), os quais não foram avaliados no presente trabalho. Assim, sugere-se, em trabalhos futuros, a avaliação das bactérias utilizadas no presente trabalho nesses meios de cultivo.

3.1.1 Solubilização de fosfatos de cálcio, alumínio e ferro insolúveis

Quanto à capacidade solubilizadora de fosfatos inorgânicos insolúveis, das 26 estirpes avaliadas, 18 (69%) foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio no meio NBRIP. Já nos meios contendo fosfato de alumínio (meio GES) e fosfato de ferro (meio GELP), nenhuma das estirpes foi capaz de solubilizar, sendo que apenas duas cresceram no primeiro meio (UFPI CB-6 e UFPI CB10-9) e todas cresceram no segundo meio (Tabela 1).

Tabela 1 Solubilização de CaHPO_4 , $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ e $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense

Estirpes	CaHPO_4		CS ²	$\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	I.S. ¹			I.S.	I.S.
	Inicial (Dias)	Final		-	-
UFPI CB-5	1,17 (3)	1,45	Baixa	NC	CNS
UFPI CB-6	1,26 (3)	1,31	Baixa	CNS	CNS
UFPI CB1-3	CNS	CNS	-	NC	CNS
UFPI CB1-8	1,25 (6)	2,02	Média	NC	CNS
UFPI CB2-9	CNS	CNS	-	NC	CNS
UFPI CB4-1	1,16 (9)	1,23	Baixa	NC	CNS
UFPI CB4-1A	1,24 (6)	1,54	Baixa	NC	CNS
UFPI CB7-1	1,32 (6)	1,35	Baixa	NC	CNS
UFPI CB7-8	CNS	CNS	-	NC	CNS
UFPI CB8-1	1,24 (6)	1,25	Baixa	NC	CNS
UFPI CB8-4	1,18 (3)	1,34	Baixa	NC	CNS
UFPI CB9-2	CNS	CNS	-	NC	CNS
UFPI CB9-6	1,26 (3)	1,56	Baixa	NC	CNS
UFPI CB10-1	1,14 (3)	1,44	Baixa	NC	CNS
UFPI CB10-2	1,11 (6)	1,21	Baixa	NC	CNS
UFPI CB10-6B	CNS	CNS	-	NC	CNS
UFPI CB10-7	1,14 (3)	1,35	Baixa	NC	CNS
UFPI CB10-9	1,49 (3)	1,66	Baixa	CNS	CNS
UFPICB113-3B	CNS	CNS	-	NC	CNS
UFPI CB11-4	1,20 (3)	1,42	Baixa	NC	CNS
UFPI CB11-6B	1,24 (3)	1,42	Baixa	NC	CNS
UFPI CB11-7B	1,22 (3)	1,41	Baixa	NC	CNS
UFPI CB11-9A	1,25 (3)	1,45	Baixa	NC	CNS
UFPI B3-9	CNS	CNS	-	NC	CNS
UFPI B4-9	CNS	CNS	-	NC	CNS
UFPI B5-1	1,40 (9)	1,48	Baixa	NC	CNS
UFLA 03 09*	2,00 (3)	2,23	Média	NC	CNS

¹Índice de solubilização (I.S.) = Ø halo (mm) / Ø colônia (mm); ²capacidade de solubilização; Inicial = leitura feita no dia inicial da solubilização; Final = leitura feita após 15 dias de incubação; NC= Não cresceu; CNS= Cresceu e não solubilizou; * *Acinetobacter* sp. (controle positivo de solubilização de CaHPO_4).

Na Figura 1, é possível visualizar o halo de solubilização em meio NBRIP (contendo P-Ca) e o crescimento sem halo de solubilização nos meios GES (contendo P-Al) e GELP (contendo P-Fe) pela estirpe UFPI CB10-9.

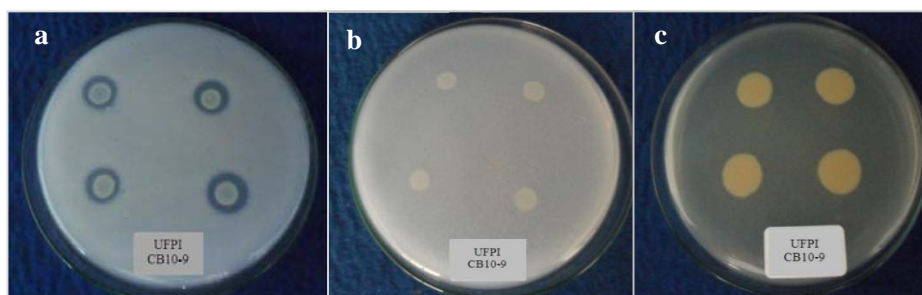


Figura 1 Halo de solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP (a), crescimento sem halo de solubilização em meio GES contendo fosfato de alumínio (b) e, em meio GELP contendo fosfato de ferro (c) pela estirpe UFPI CB10-9, incubada por 15 dias, a 28°C

Em relação aos índices de solubilização finais em meio NBRIP, nenhuma estirpe apresentou alto índice ($IS > 4$) e a maioria (94%) apresentou baixo índice, variando de 1,21 a 1,66 mm para as estirpes UFPI CB10-2 e UFPI CB10-9, respectivamente (Tabela 1). A estirpe UFPI CB1-8 destacou-se das demais, pois foi a única que apresentou média capacidade solubilizadora de P-Ca, comportando-se semelhante à estirpe controle positivo (UFLA 03 09). Dentre as estirpes que solubilizaram o P-Ca, a maioria (61%) se comportou como precoce, iniciando a solubilização até o terceiro dia após a inoculação (Tabela 1).

Uma importante parcela da comunidade microbiana do solo, incluindo bactérias e fungos, possui a habilidade de solubilizar fontes de fósforo de baixa solubilidade, por meio de diferentes mecanismos, especialmente pela produção de ácidos orgânicos (HALDER et al., 1990; LIN et al., 2006; VESSEY, 2003),

resultando em aumento no fornecimento de fósforo prontamente disponível para absorção pelas plantas.

A capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis por fungos, bactérias de vida livre no solo e/ou associativas é bem documentada. No entanto, ainda são poucos os estudos que avaliam essa capacidade por bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas, incluindo simbióticas e não simbióticas (HARA; OLIVEIRA, 2005; MARRA et al., 2012; OLIVEIRA, 2009; PIEX et al., 2001; SILVA, 2012).

A capacidade solubilizadora de P-Ca das estirpes avaliadas, no presente trabalho, está de acordo com os resultados obtidos em outros estudos envolvendo bactérias endofíticas de nódulos, simbióticas e não simbióticas, em que a maioria promoveu baixo índice de solubilização (HARA; OLIVEIRA, 2005; MARRA et al., 2012; SILVA, 2012).

No trabalho de Hara e Oliveira (2005), em que foi avaliada a capacidade solubilizadora de P-Ca por 30 estirpes de rizóbios isoladas de nódulos de feijão-caupi, em meio de cultura GES (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982), verificou-se que 57% das estirpes foram capazes de solubilizar, sendo que todas apresentaram baixo índice de solubilização e 65% se comportaram como precoce. Marra et al. (2012), trabalhando com 78 bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi, incluindo simbióticas e não simbióticas, em meio de cultura GELP (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982), verificaram que 77% das estirpes que solubilizaram P-Ca apresentaram baixo índice de solubilização e as demais apresentaram índice médio, sendo que nenhuma apresentou alto índice. No estudo conduzido por Silva (2012), de 29 estirpes avaliadas em meio NBRIP, incluindo simbióticas e não simbióticas de plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*), apenas 10 foram capazes de solubilizar P-Ca e, dentre essas, apenas uma apresentou índice médio de solubilização e as demais apresentaram baixo índice. Por outro lado, alguns estudos têm relatado a ocorrência de

bactérias oriundas de nódulos de leguminosas, com alta capacidade de solubilização de P-Ca ($IS \geq 4$ mm), porém, em proporção bem menor em relação às bactérias com capacidade média e baixa (HARA e OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA, 2009). Entre os gêneros com alta capacidade de solubilização de P-Ca, destacaram-se *Rhizobium* e *Burkholderia* no trabalho de OLIVEIRA (2009).

Em relação ao P-Al, são poucos os trabalhos, na literatura, que relatam alta ocorrência de bactérias com capacidade para solubilizar esse tipo de fosfato (HARA; OLIVEIRA, 2004; 2005). No presente trabalho, como também verificado no estudo de Silva (2012), nenhuma das estirpes avaliadas foi capaz de solubilizar o P-Al. Porém, mesmo não apresentando essa capacidade, duas das estirpes avaliadas, UFPI CB-6 e UFPI CB 10-9 (Figura 1b), foram capazes de crescer no meio contendo P-Al, sugerindo que as mesmas são tolerantes ao baixo pH e toxidez por alumínio, condições predominantes nos solos do Cerrado brasileiro. Desse modo, recomenda-se a avaliação das mesmas quanto à realização de outros processos biológicos, que possam contribuir com o crescimento vegetal, principalmente em solos ácidos.

Quanto ao P-Fe, verificou-se que nenhuma das bactérias avaliadas apresentou halo de solubilização no meio GELP (Tabela 1). Considerando que o P-Fe constitui uma das formas predominantes de fosfatos inorgânico insolúveis nos solos tropicais agricultáveis (RAIJ et al., 1991), alguns estudos visando à seleção de microrganismos com capacidade para solubilizar esse tipo de fosfato têm sido realizados. Porém, dependendo da composição e do estado físico do meio de cultura e do mecanismo de solubilização envolvido, a capacidade solubilizadora de P-Fe por bactérias pode ser subestimada. Marra et al. (2011), ao avaliarem a capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis por sete estirpes tipo e inoculantes de leguminosas em meio GELP sólido e líquido, verificaram que nenhuma conseguiu solubilizar P-Fe no meio sólido; já no meio líquido, duas das estirpes, CIAT 899^T (*Rhizobium tropici*) e UFLA 02-

100 (*Rhizobium etli*), foram capazes solubiliza-lo, liberando maiores concentrações de fósforo, em relação às obtidas quando essas estirpes foram inoculadas no meio GELP líquido contendo P-Ca. Resultados semelhantes foram obtidos por Marra et al. (2012), em que das 78 bactérias avaliadas, nenhuma foi capaz de solubilizar o P-Fe em meio GELP sólido, enquanto no meio líquido, 34% dessas estirpes foram capazes de solubiliza-lo. Segundo esses autores, o meio líquido favorece uma maior difusão dos ácidos orgânicos, resultando em maior solubilização.

Já no meio sólido, segundo Li et al. (2008), a produção de exopolissacarídeos pelas bactérias constitui um importante mecanismo de solubilização, pois estes permanecem concentrados no local da inoculação, favorecendo a formação do halo de solubilização ao redor da colônia bacteriana. Para Souchie et al. (2005), a pureza e a composição dos fosfatos podem afetar a avaliação visual da formação do halo em meio sólido. Além disso, no meio sólido pode ocorrer uma menor solubilização sem formação do halo ao redor da colônia (PEREZ et al., 2007) ou interferência na visualização do halo em função do rápido crescimento das bactérias, o que possivelmente poderá ter ocorrido no presente trabalho para algumas bactérias (Figura 1c). Diante dessas implicações, considerando-se os diferentes mecanismos envolvidos, sugere-se em estudos relacionados à solubilização de fosfatos inorgânicos que a avaliação seja feita tanto em meio sólido, quanto no meio líquido.

O fósforo (P) é um dos macronutrientes mais limitantes ao crescimento vegetal, devido a sua baixa disponibilidade nos solos. Para atender à demanda nutricional das plantas, o P é geralmente adicionado em grandes quantidades, via fertilizantes fosfatados, os quais são sintetizados sob um alto custo energético, e possuem pequena eficiência de utilização pelas plantas, devido à rápida fixação no solo (MALAVOLTA, 1980). No sentido de diminuir o uso e/ou otimizar o aproveitamento dos fertilizantes fosfatados, a inoculação com microrganismos

solubilizadores de fosfatos pouco solúveis representa uma importante estratégia (CHABOT et al., 1998; OLIVEIRA, 2011; PIEX et al., 2001), além de aumentar a sustentabilidade dos agroecossistemas. No presente trabalho, a estirpe UFPI CB1-8 apresentou bom desempenho em relação à solubilização de P-Ca *in vitro*, sendo indicada para futuros experimentos *in vivo* para avaliação de sua contribuição em relação disponibilidade de fósforo para as plantas em solos alcalinos.

3.1.2 Produção de Auxina (ácido-3-indol acético – AIA)

Na avaliação da capacidade de síntese de AIA pelas bactérias, houve interação significativa entre as estirpes e os meios de cultivo (79 e DYGS), na presença e ausência da suplementação com triptofano (Tabela 2).

Na ausência da suplementação com triptofano, 20 estirpes (77%), juntamente com o controle positivo (BR 11001^T) apresentaram habilidade para sintetizar o AIA, quando inoculadas no meio DYGS. Já no meio 79, apenas 5 estirpes, incluindo a BR 11001^T, foram capazes de sintetizar o AIA, sendo que estas produziram quantidades significativamente inferiores em relação às obtidas no meio DYGS.

As concentrações de AIA no meio DYGS, sem suplementação com triptofano, variaram de 0,63 a 12,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtidas com as estirpes UFPI CB4-1 e UFPI CB2-9 respectivamente. Dentre as 20 estirpes que sintetizaram o AIA nesse meio, a UFPI CB2-9 apresentou produção estatisticamente superior às demais, incluindo o controle positivo (BR 11001^T), o qual sintetizou 6,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA. Já no meio 79, sem suplementação com triptofano, a maior síntese foi de 0,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtida com a estirpe BR 11001^T (Tabela 2).

Tabela 2 Produção de ácido-3-indol acético (AIA) por estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense, cultivadas em meio 79 e em meio DYGS

Estirpes	Meio 79	Meio DYGS
AIA - sem triptofano ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹		
UFPI CB-5	0,00 cB*	2,44 fA
UFPI CB-6	0,00 cB	3,59 dA
UFPI CB1-3	0,27 cB	2,82 eA
UFPI CB1-8	0,00 cB	5,80 cA
UFPI CB2-9	0,00 cB	12,70 aA
UFPI CB4-1	0,00 cB	0,63 lA
UFPI CB4-1A	0,00 cB	2,33 fA
UFPI CB7-1	0,00 cB	2,80 eA
UFPI CB8-1	0,00 cB	2,09 gA
UFPI CB8-4	0,00 cB	1,59 iA
UFPI CB9-2	0,41 bB	1,73 hA
UFPI CB9-6	0,00 cB	1,78 hA
UFPI CB10-2	0,00 cB	1,45 iA
UFPI CB10-7	0,00 cB	1,49 iA
UFPI CB10-9	0,00 cB	2,31 fA
UFPI CB11-7B	0,00 cB	1,18 jA
UFPI CB11-9A	0,00 cB	1,05 jA
UFPI B3-9	0,60bB	1,35iA
UFPI B4-9	0,47bB	0,82lA
UFPI B5-1	0,00cB	1,15jA
BR 11001 ^{T**}	0,86 aB	6,14 bA
AIA - com triptofano ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ²		
UFPI CB-5	1,90 mA	1,96 gA
UFPI CB-6	18,06 eA	0,54 lB
UFPI CB1-3	0,68 nB	3,73 eA
UFPI CB1-8	2,23 lB	9,49 bA
UFPI CB2-9	0,14 oB	8,70 cA
UFPI CB4-1	27,03 dA	1,73 hB
UFPI CB4-1A	1,82 mA	1,35 iB
UFPI CB7-1	2,60 jB	3,87 eA
UFPI CB7-8	47,68 aA	2,16 gB
UFPI CB8-1	3,31 iA	0,28 lB
UFPI CB8-4	3,70 iA	0,27 lB
UFPI CB9-2	28,64 cA	0,98 jB
UFPI CB9-6	6,95 gA	0,89 jB
UFPI CB10-1	3,59 iA	0,00 mB

Tabela 2, continua

Estirpes	Meio 79	Meio DYGS
UFPI CB10-2	2,19 IA	0,50 IB
UFPI CB10-6B	4,86 hA	0,00 mB
UFPI CB10-7	3,88 iA	0,00 mB
UFPI CB10-9	35,00 bA	2,94 fB
UFPICB113-3B	0,21 oB	1,65 hA
UFPI CB11-4	3,55 iA	0,07 mB
UFPI CB11-6B	3,39 iA	2,12 gB
UFPI CB11-7B	0,16 oA	0,30 lA
UFPI CB11-9A	2,76 jB	4,19 dA
UFPI B3-9	3,75iA	3,22 eB
UFPI B4-9	10,21fA	0,00 mB
UFPI B5-1	0,06 oA	0,00 mA
BR 11001 ^T	5,06 hB	14,24 aA

*Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; ***Azospirillum brasilense* (controle positivo); ¹Coefficiente de variação (%) = 11,68; ²Coefficiente de variação (%) = 2,54.

Na presença da suplementação com triptofano, todas as estirpes foram capazes de sintetizar o AIA em meio 79, e 21 estirpes (80%) o sintetizaram no meio DYGS. Entre as 26 estirpes avaliadas, apenas 3 (UFPI CB-5; UFPI CB11-7B e UFPI B5-1) sintetizaram quantidades de AIA semelhantes entre os meios de cultivo e 17 (65%) apresentaram produções significativamente superiores quando inoculadas no meio 79. No meio DYGS, 6 estirpes (UFPI CB1-3; UFPI CB1-8; UFPI CB2-9; UFPI CB7-1; UFPI CB11-3B; UFPI CB11-9A), juntamente com a BR 11001^T, produziram quantidades significativamente superiores, em relação às obtidas no meio 79 inoculado com essas estirpes (Tabela 2).

A maior síntese de AIA no meio 79, suplementado com triptofano, foi de 47,68 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtida com a estirpe UFPI CB7-8, a qual destacou-se significativamente das demais. As estirpes UFPI CB10-9, UFPI CB 9-2, UFPI CB4-1, UFPI CB-6, UFPI B4-9 e UFPI CB9-6 também apresentaram bom

desempenho em relação à produção de AIA nesse meio de cultivo, em que as concentrações foram significativamente superiores a obtida com a estirpe BR 11001^T (Tabela 2).

Quanto à síntese de AIA no meio DYGS suplementado com triptofano, as concentrações variaram de 0,27 a 14,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo a mínima obtida com a estirpe UFPI CB8-4 e máxima com a estirpe BR 11001^T. Entre as 26 estirpes avaliadas nesse meio de cultivo, destacaram-se a UFPI CB1-8 e a UFPI CB 2-9, com produções de AIA significativamente superiores as demais estirpes (Tabela 2).

A habilidade de sintetizar o AIA, fitohormônio pertencente ao grupo das auxinas, é amplamente difundida entre bactérias associadas a plantas, tanto simbióticas, como não simbióticas. No entanto, a quantidade de AIA sintetizada é bastante variável inter e intra-gêneros e espécies (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2005; OLIVEIRA, 2009; SCHLINDWEIN et al., 2008; SILVA, 2012).

As concentrações de AIA obtidas (0,63 a 12,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no meio DYGS sem adição de triptofano, no presente trabalho, estão próximas às encontradas para as bactérias avaliadas no capítulo 2, e em outros estudos. Ahmad, Ahmad e Khan (2005) registraram concentrações de AIA variando de 2,68 a 10,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para isolados de *Azotobacter*, e de 5,34 a 22,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para isolados de *Pseudomonas*, em meio Jensen, na ausência de triptofano. Em estudo conduzido por Kuss et al. (2007), o controle positivo BR 11001^T (*Azospirillum brasilense*) promoveu produção intermediária (5,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA) em meio DYGS, sem triptofano, corroborando ao presente trabalho. No trabalho de Oliveira (2009), foram encontradas concentrações de AIA, sintetizadas por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro, variando de 0,23 a 12,59 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA em meio DYGS não suplementado com triptofano, sendo a máxima concentração obtida com a estirpe J6-96-1-3 (*Rhizobium* sp.). No entanto, no meio DYGS com 100 mg L^{-1}

de triptofano, a autora encontrou valores superiores ao presente trabalho, com produção de até $42,28 \mu\text{g mL}^{-1}$, obtida com a estirpe UFLA 04-0321 (*Bradyrhizobium japonicum*). Pedrinho et al. (2010), trabalhando com bactérias endofíticas de raízes de milho, também detectaram maiores produções em meio DYGS com triptofano, em que variou de 30 a $72 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA para as estirpes R4-17 (*Pantoea* sp.) e R4-1 (*Sphingomonas* sp.), respectivamente.

Em relação às concentrações de AIA obtidas no meio 79 sem suplementação com triptofano, no presente trabalho, foram inferiores às registradas no trabalho de Anjum et al. (2011), em que variou de 8,80 a $38,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ entre 44 isolados de nódulos de *Vigna radiata* L., também cultivados em meio 79 sem suplementação com triptofano. No trabalho de Silva (2012), assim como no presente estudo, verificou-se baixa ocorrência de estirpes com habilidade de sintetizar AIA em meio 79 sem suplementação com triptofano, sendo que de 29 bactérias avaliadas, apenas duas apresentaram essa habilidade, porém as quantidades sintetizadas foram bem superiores.

Por outro lado, as concentrações de AIA obtidas no meio 79 suplementado com triptofano, no presente trabalho, foram superiores às registradas por Palaniappan et al. (2010), trabalhando com bactérias endofíticas de nódulos de *Lespedeza* sp., em que a máxima concentração foi de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ em meio 79 com 100 mg L^{-1} de triptofano.

De maneira geral, conforme também verificado no capítulo 2, na presença da suplementação com triptofano, no meio 79, um maior número de estirpes apresentou habilidade de síntese de AIA, e em maior quantidade, em relação as obtidas nesse meio sem triptofano (Tabela 2), corroborando resultados encontrados em vários outros estudos (ANJUM et al., 2011; CHAGAS JÚNIOR, OLIVEIRA; OLIVIERA, 2009; PATIL et al., 2011; SILVA, 2012). Chagas Júnior, Oliveira e Oliviera (2009), avaliando a produção de AIA por 92 isolados de nódulos de feijão-caupi, em diferentes concentrações de triptofano,

verificaram que 52 isolados aumentaram a síntese de AIA significativamente com um aumento na concentração do triptofano de 10 a 100 mg mL⁻¹, em meio 79. Nos trabalhos de Anjum et al. (2011) e de Silva (2012), assim como no presente trabalho, todas as estirpes de bactérias avaliadas apresentaram maior síntese de AIA no meio 79 quando este foi suplementado com 100 mg mL⁻¹.

A maior síntese de AIA na presença da suplementação com aminoácido triptofano, no presente trabalho e nos demais citados, pode estar relacionada ao fato desse aminoácido constituir um dos precursores mais conhecidos para as vias de biossíntese do AIA em bactérias, no entanto, há outras vias de biossíntese, independentes de triptofano, cujo precursor ainda é desconhecido (LAMBRECHT et al., 2000; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Assim, tem sido sugerido que as bactérias que não sintetizam o AIA, na ausência da suplementação com triptofano, é porque estas são dependentes desse aminoácido para expressar a habilidade de síntese (OLIVEIRA, 2009).

Apesar de todas as estirpes avaliadas, no presente trabalho, terem apresentado maior capacidade de sintetizar o AIA no meio 79, quando este foi suplementado com 100 mg mL⁻¹ de triptofano, isso não ocorreu no meio DYGS. Das 21 estirpes que sintetizaram AIA no meio DYGS, na presença da suplementação com triptofano, 9 apresentaram menor produção em relação às obtidas no meio DYGS sem adição de triptofano (Tabela 2). Além disso, três estirpes (UFPI CB10-7; UFPI B4-9 e UFPI B5-1) que sintetizaram o AIA no meio DYGS sem adição de triptofano, não foram capazes de sintetizar, quando o meio foi suplementado com triptofano, sugerindo que a concentração de triptofano utilizada pode ter suprimido a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de AIA nessas bactérias. Ona et al. (2005) verificaram que a expressão do gene *ipdC*, envolvido na biossíntese de AIA em *Azospirillum brasilense* (Sp245), foi reduzida na concentração de 200 µg mL⁻¹ de triptofano, após 18 horas de crescimento. Segundo esses autores, na presença de elevadas

concentrações de triptofano, há um aumento da síntese de AIA na fase inicial do crescimento bacteriano que pode ser letal, no entanto, esse elevado nível de AIA sintetizado inicialmente poderá atuar como um sinalizador para redução da expressão dos genes envolvidos na síntese de AIA e o excesso de triptofano poderá ser metabolizado para crescimento celular.

Alguns trabalhos têm mostrado que, além da presença e/ou concentração de triptofano, vários outros fatores podem interferir tanto na capacidade de síntese, como na quantidade de AIA produzido em meio de cultura, incluindo, temperatura, pH, concentrações e fontes de carbono e/ou outros nutrientes (MANDAL et al., 2007; ONA et al., 2005; PATIL et al., 2011), entre outros. No presente trabalho, foi claramente evidenciado que, além da concentração de triptofano, as composições dos meios de cultivo utilizados interferiram significativamente na capacidade de síntese de AIA pelas bactérias avaliadas. Por exemplo, na presença da suplementação com triptofano, as duas estirpes que sintetizaram maiores quantidades de AIA no meio 79, UFPI CB7-8 ($47,68 \mu\text{g mL}^{-1}$) e UFPI CB10-9 ($35,00 \mu\text{g mL}^{-1}$), produziram baixíssimas quantidades quando inoculadas no meio DYGS ($2,16$ e $2,94 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente), e já o controle positivo BR 11001^T inoculado no meio DYGS, sintetizou mais que o dobro da quantidade de AIA sintetizada no meio 79 (Tabela 2). Esse comportamento reflete as diferentes exigências nutricionais dessas estirpes para expressarem a habilidade de síntese de AIA, e pode estar relacionado às diferenças genotípicas e/ou origem das mesmas. Patil et al. (2011), avaliando a interferência de diferentes concentrações e fontes de carbono, na síntese de AIA por estirpes de *Acetobacter diazotrophicus* isoladas de cana de açúcar, verificaram máxima produção na concentração de 12 g L^{-1} usando glicose como fonte de carbono, e sugeriram que esse melhor desempenho pode ser devido à glicose constituir a principal fonte de carbono encontrado no habitat natural dessas estirpes. Ona et al. (2005) constataram que a estirpe Sp245 (*Azospirillum*

brasiliense) exige baixa disponibilidade carbono para a maior biossíntese de AIA, sendo que entre as concentrações de malato utilizadas (2,5, 5 e 10 g L⁻¹), a maior síntese de AIA ocorreu na presença de 2,5 g L⁻¹.

Considerando essas interferências nutricionais, nos estudos relacionados à seleção de bactérias produtoras de AIA, é importante a utilização de mais de um meio de cultura, como no caso do presente trabalho, para que se obtenham informações mais concretas em relação à capacidade de síntese de AIA pelas bactérias avaliadas. Dependendo das concentrações de AIA sintetizadas, estas poderão estimular (BISWAS et al., 2000; PATIL et al., 2011; PEDRINHO et al., 2010), inibir (PATIL et al., 2011; SARWAR; KREMER, 1995; SCHLINDWEIN et al., 2008) ou não exercer nenhum efeito (LI et al., 2008) sobre o crescimento vegetal.

Geralmente, a fitoestimulação ocorre quando a planta é exposta a baixas concentrações de AIA, enquanto a inibição é verificada na presença de altas concentrações. Porém, não existe uma faixa de concentração benéfica ou tóxica comum a todas as espécies vegetais, pois cada genótipo responde de maneira diferenciada quando exposto ao AIA exógeno bacteriano. Para a cultura do milho, foi verificado que a inoculação com uma estirpe do gênero *Sphingomonas*, produzindo 72 µg mL⁻¹ de AIA, resultou em maior altura das plantas e produção de matéria seca da parte aérea e raiz, em relação ao controle sem inoculação (PEDRINHO et al., 2010). No entanto, em outras espécies vegetais, pequenas quantidades de AIA podem exercer efeitos tóxicos, conforme verificado no trabalho de Ahmad, Ahmad e Khan (2005), em que a inoculação com estirpes de *Pseudomonas*, produzindo AIA nas concentrações de 14,7 a 24,8 µg mL⁻¹, mostrou efeitos inibitórios sobre o crescimento radicular de *Sesbania aculeata* e *Vigna radiata*.

No presente trabalho, as concentrações de AIA sintetizadas foram bastante variáveis entre as estirpes avaliadas, indicando que as mesmas

apresentam diferentes potenciais para promoção do crescimento vegetal. Porém, o efeito fitoestimulador poderá ser maximizado dependendo da combinação entre a espécie vegetal e as concentrações de AIA sintetizadas pelas estirpes inoculantes.

3.2 Eficiência das estirpes em promover o crescimento de plantas de soja e feijão-caupi

3.2.1 Experimento com plantas de soja

Os tratamentos influenciaram significativamente sobre o NN, MSN, MSPA, MSR, MST, EFCN e EFSN (Tabela3). As estirpes inoculantes da soja, SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019, nodularam eficientemente, indicando que as condições foram favoráveis à ocorrência da nodulação e FBN durante o período experimental. Nenhuma das 21 estirpes avaliadas foi capaz nodular as plantas de soja. Também não ocorreu nodulação nos controles negativos, sem N mineral e com N mineral, indicando que não houve contaminação no experimento.

A produção de MSPA variou de 0,14 a 1,45 g planta⁻¹, respectivamente, para o tratamento inoculado com a estirpe UFPI CB10-7 e o controle adubado com N mineral. Todas as estirpes, incluindo as inoculantes da soja, apresentaram produções de MSPA inferior ao controle com N mineral.

Dentre as estirpes avaliadas, apesar da incapacidade de nodular a soja, cinco (UFPI CB-6, UFPI CB1-8, UFPI CB4-1, UFPI CB7-1 e UFPI CB11-3B) se destacaram significativamente das demais, promovendo produção de MSPA superior a duas das estirpes inoculantes da soja (SEMIA 5019 e SEMIA 587) e ao controle sem N mineral.

Tabela 3 Número de nódulo (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), eficiência em relação ao controle nitrogenado (EFCN) e ao controle sem nitrogênio mineral (EFSN) obtidos em plantas de soja inoculadas com estirpes isoladas de solo do Sudoeste piauiense

Tratamentos	NN -	MSN mg planta ⁻¹	MSPA ----- g planta ⁻¹	MSR ----- g planta ⁻¹	MST ----- g planta ⁻¹	EFCN ----- %	EFSN ----- %
UFPI CB-5	0 c*	0 d	0,24 e	0,06 d	0,28 e	15 e	55 d
UFPI CB-6	0 c	0 d	0,60 b	0,24 b	0,84 b	40 b	153 b
UFPI CB1-8	0 c	0 d	0,61 b	0,23 b	0,84 b	43 b	158 b
UFPI CB2-9	0 c	0 d	0,51 c	0,20 b	0,71 c	35 c	130 b
UFPI CB4-1	0 c	0 d	0,61 b	0,21 b	0,82 b	41 b	157 b
UFPI CB4-1A	0 c	0 d	0,52 c	0,21 b	0,74 c	36 c	133 b
UFPI CB7-1	0 c	0 d	0,58 b	0,18 b	0,76 c	40 b	148 b
UFPI CB7-8	0 c	0 d	0,49 c	0,19 b	0,67 c	34 c	125 b
UFPI CB8-1	0 c	0 d	0,26 e	0,12 c	0,36 e	17 e	60 d
UFPI CB8-4	0 c	0 d	0,26 e	0,10 c	0,37 e	19 e	67 d
UFPI CB9-6	0 c	0 d	0,25 e	0,11 c	0,35 e	17 e	63 d
UFPI CB10-1	0 c	0 d	0,26 e	0,08 d	0,34 e	18 e	67 d
UFPI CB10-2	0 c	0 d	0,35 d	0,12 c	0,48 d	24 d	89 c
UFPI CB10-6B	0 c	0 d	0,23 e	0,12 c	0,36 e	16 e	61 d
UFPI CB10-7	0 c	0 d	0,14 e	0,04 d	0,18 f	10 e	35 d
UFPI CB10-9	0 c	0 d	0,54 c	0,22 b	0,74 c	37 c	134 b
UFPI CB11-3B	0 c	0 d	0,58 b	0,21 b	0,79 b	40 b	147 b
UFPI CB11-4	0 c	0 d	0,32 d	0,15 c	0,47 d	23 d	83 c
UFPI CB11-6B	0 c	0 d	0,34 d	0,12 c	0,46 d	23 d	89 c
UFPI CB11-7B	0 c	0 d	0,22 e	0,10 c	0,32 e	15 e	56 d
UFPI CB11-9A	0 c	0 d	0,22 e	0,11 c	0,33 e	15 e	55 d
SEMIA 5019	27 b	32 c	0,48 c	0,20 b	0,68 c	34 c	123 b
SEMIA 5079	59 a	43 b	0,60 b	0,19 b	0,80 b	42 b	154 b
SEMIA 587	29 b	39 b	0,51 c	0,22 b	0,73 c	35 c	131 b
SEMIA 5080	22 b	54 a	0,65 b	0,18 b	0,84 b	45 b	166 b
CN	0 c	0 d	1,45 a	0,55 a	2,00 a	100 a	372 a
SN	0 c	0 d	0,39 d	0,15 c	0,54 d	27 d	100c
CV (%)	43,44	16,90	12,12	13,75	10,28	13,25	17,38

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As estirpes, UFPI CB2-9, UFPI CB4-1A, UFPI CB7-8 e UFPI CB10-9, também apresentaram bom desempenho, agrupando-se com as estirpes inoculantes da soja, SEMIA 5019 e SEMIA 587, e apresentando produções de matéria seca da parte aérea superior ao controle sem N mineral (Tabela 3). Os incrementos de MSPA, em relação ao controle sem N mineral, variaram de 25 a 58%, para os tratamentos inoculados com as estirpes UFPI CB7-8 e UFPI CB1-8, respectivamente (Tabela 3).

Verificou-se que as nove estirpes que promoveram maior produção de MSPA também se destacaram na produção MSR e MST, as quais apresentaram comportamentos estatisticamente superiores às demais estirpes e ao controle sem N mineral, e semelhantes às estirpes inoculantes da soja, sendo que para MST às estirpes UFPI CB-6, UFPI CB1-8, UFPI CB4-1 e UFPI CB11-3B agruparam-se as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080, enquanto as estirpes UFPI CB2-9, UFPI CB4-1A, UFPI CB7-1, UFPI CB7-8 e UFPI CB10-9 ficaram no mesmo grupo que as estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587 (Tabela 3).

Em relação à EFCN, todas as estirpes avaliadas, juntamente com as estirpes inoculantes da soja, apresentaram menor eficiência em relação ao controle adubado com N mineral. No entanto, para EFSN, 42% das estirpes apresentaram eficiência significativamente superior em relação ao controle sem N mineral. Dentre as estirpes que apresentaram maior eficiência, destacam-se a UFPI CB-6, UFPI CB4-1 e UFPI CB1-8, cujos incrementos foram de 53, 57 e 58%, em relação ao controle sem N mineral. Por outro lado, algumas estirpes, principalmente a UFPI CB7-10, suprimiram o crescimento das plantas, resultando em menor desempenho em relação ao controle sem N mineral (Tabela 3).

A incapacidade nodulífera em soja das 13 estirpes que apresentaram autenticação positiva em plantas de feijão-caupi (ANEXO C) pode estar relacionada à incompatibilidade entre o macro e microsimbionte para o

estabelecimento da simbiose, além da interferência das condições climáticas. As etapas desde a pré-infecção até a formação e funcionamento dos nódulos dependem e podem variar em função dos genótipos da planta e da estirpe envolvida (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Além disso, nos estudos relacionados à nodulação em soja, são poucos os que relatam a formação de nódulos com gêneros e/ou estirpes de crescimento rápido (CAMACHO et al., 2002; CHUEIRE e HUNGRIA, 1997), sendo que a maioria demonstram uma eficiente nodulação com estirpes de crescimento lento, principalmente as pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (MINAMISAWA et al., 1997; SOLOMON, PANT; ANGAW et al., 2012; VIEIRA NETO et al., 2008). Como a maioria das estirpes avaliadas no presente trabalho são de crescimento rápido já era mesmo esperado que ocorresse pouca ou nenhuma nodulação.

Porém, mesmo não ocorrendo nodulação, 42% das estirpes foram eficientes em promover o crescimento das plantas de soja, possivelmente através da atuação em outros processos biológicos fitoestimuladores, como por exemplo, a síntese de AIA, que foi detectada para todas essas estirpes no presente trabalho (Tabela 2). Verificou-se que a maioria das estirpes que se destacaram em relação à produção de MSPA, MSR e MST, estão entre as que sintetizaram maiores quantidade de AIA, incluindo a UFPI CB1-8, UFPI CB2-9, UFPI CB-6, UFPI CB4-1, CB10-9 e UFPI CB7-8 (Tabela 2). No entanto, outras estirpes (UFPI CB11-3B, UFPI CB4-1A e CB7-1), mesmo produzindo pequenas quantidades de AIA também estimularam significativamente o crescimento das plantas, sugerindo, que além da síntese de AIA, outros processos biológicos fitoestimuladores, que não foram avaliados no presente trabalho, podem ter contribuído com crescimento das plantas de soja. Uma característica importante dessas bactérias, que deve ser ressaltada, é a capacidade das mesmas em sobreviver e expressar o potencial de promoção do crescimento vegetal mesmo em solução nutritiva com baixa concentração de nitrogênio mineral. Assim,

pode-se inferir que estas são potenciais candidatas para estudos de coinoculação em soja e em outras leguminosas.

Alguns estudos têm mostrado efeitos benéficos da coinoculação de leguminosas com estirpes de rizóbios e bactérias que atuam em outros processos biológicos diferentes da FBN, tais como: produção de fitohormônios, solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis, produção de sideróforos, entre outros. A coinoculação de leguminosas com estirpes de rizóbio e bactérias produtoras de AIA pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, resultou em maior número de nódulos, peso fresco dos nódulos e produção de matéria seca da parte aérea, em comparação às plantas inoculadas somente com rizóbio (ARAÚJO et al., 2010; JANGU; SINDHU, 2011; YAHALOM; OKON; DOVRAT, 1990). Na cultura da soja, a coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com estirpes de *Serratia proteamaculans* e *S. liquefaciens*, produtoras de sideróforos, aumentou significativamente o número de nódulos, produção de matéria seca da parte aérea e eficiência da fixação de nitrogênio (BAI et al., 2002).

Embora a maioria dos trabalhos abordem apenas efeitos benéficos, algumas bactérias, além de sintetizarem substâncias promotoras do crescimento vegetal, são capazes de produzir também fitotoxinas que suprimem o crescimento das plantas (BELIMOV et al., 2007). No presente trabalho, verificou-se que algumas estirpes, mesmo apresentando-se positivas quanto aos processos promotores do crescimento vegetal avaliados *in vitro* (Tabelas 1 e 2), promoveram redução significativa na produção de matéria seca das plantas de soja (Tabela 3), possivelmente devido à liberação de compostos fitotóxicos.

De maneira geral, deve-se considerar que os resultados aqui apresentados foram obtidos em condições axênicas, podendo não ocorrer a mesma resposta em solo. Desse modo, as estirpes que apresentam maior capacidade em promover o crescimento de plantas de soja devem ser avaliadas

futuramente em experimentos com solo para verificação de sua eficiência na presença de outros microrganismos edáficos. É interessante também a avaliação dessas estirpes em testes de coinoculação na cultura da soja e/ou de outras leguminosas nodulíferas.

3.2.2 Experimento com plantas de feijão-caupi

Houve efeito significativo dos tratamentos sobre o NN, MSN, MSPA, MSR, MST, EFCN e EFSN no experimento conduzido em vaso de Leonard com plantas de feijão-caupi (Tabela 4). Não foi verificada ocorrência de nodulação nos controles negativos (sem N mineral e com N mineral), indicando que não houve contaminação no experimento.

Entre as 26 estirpes avaliadas, somente quatro promoveram nodulação nas plantas de feijão-caupi, sendo duas oriundas de solos de Várzeas (UFPI B5-1 e UFPI B4-9) e duas oriundas de solos de Chapadas (UFPI CB9-2 e UFPI CB1-3). O NN variou entre 113,66 a 193,33 nódulos planta⁻¹ para os tratamentos inoculados com as estirpes UFPI CB9-2 e INPA 3-11B, respectivamente (Tabela 4). A estirpe UFPI CB1-3 destacou-se, promovendo NN semelhante às estirpes inoculantes INPA 3-11B e BR 3267, e significativamente superior às demais estirpes. Os tratamentos inoculados com as estirpes UFPI CB 9-2, UFPI B5-1 e UFPI B4-9, apresentaram NN estatisticamente semelhantes entre si, agrupando-se com a estirpe inoculante UFLA 3-84 (Tabela 4).

Em relação a MSN, as maiores produções foram obtidas nos tratamentos inoculados com as estirpes UFPI CB1-3 (238 mg planta⁻¹) e BR 3267 (258 mg planta⁻¹), as quais diferiram estatisticamente das demais. A estirpe UFPI B5-1 agrupou-se com as estirpes inoculantes UFLA 3-84 e INPA 3-11B, promovendo produção de MSN superior às estirpes UFPI CB 9-2 e UFPI B4-9 (Tabela 4).

Tabela 4 Número de nódulo (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), eficiência em relação ao controle nitrogenado (EFCN) e ao controle sem nitrogênio mineral (EFSN) obtidos em plantas de feijão-caupi inoculadas com estirpes isoladas de solos do Sudoeste piauiense

Tratamento	NN	MSN	MSPA	MSR	MST	EFCN	EFSN
	-	mg	---- g planta ⁻¹ ----		----	---- % ----	
UFPI CB-5	0 c*	0 e	0,16 h	0,15 h	0,31 i	6 i	130 i
UFPI CB-6	0 c	0 e	0,16 h	0,20 g	0,36 i	6 i	128 i
UFPI CB1-8	0 c	0 e	0,23 g	0,24 f	0,48 h	9 h	191 h
UFPI CB2-9	0 c	0 e	0,16 h	0,19 g	0,36 i	6 i	133 i
UFPI CB4-1	0 c	0 e	0,24 g	0,21 g	0,46 h	9 h	199 h
UFPI CB4-1A	0 c	0 e	0,22 g	0,23 f	0,45 h	8 h	181 h
UFPI CB7-1	0 c	0 e	0,24 g	0,22 f	0,47 h	9 h	200 h
UFPI CB7-8	0 c	0 e	0,13 h	0,12 h	0,26 i	5 j	108 j
UFPI CB8-1	0 c	0 e	0,24 g	0,24 f	0,48 h	9 h	192 h
UFPI CB8-4	0 c	0 e	0,15 h	0,15 h	0,30 i	6 i	124 i
UFPI CB9-6	0 c	0 e	0,23 g	0,27 e	0,50 h	8 h	185 h
UFPI CB10-1	0 c	0 e	0,16 h	0,15 h	0,32 i	6 i	130 i
UFPI CB10-2	0 c	0 e	0,13 h	0,12 h	0,25 i	5 j	108 j
UFPI CB10-6B	0 c	0 e	0,20 g	0,27 e	0,47 h	7 h	163 h
UFPI CB10-7	0 c	0 e	0,16 h	0,20 g	0,36 i	6 i	135 i
UFPI CB10-9	0 c	0 e	0,12 h	0,12 h	0,24 i	4 j	95 j
UFPI CB11-3B	0 c	0 e	0,21 g	0,28 e	0,49 h	8 h	169 h
UFPI CB11-4	0 c	0 e	0,23 g	0,22 f	0,45 h	8 h	185 h
UFPI CB11-6B	0 c	0 e	0,22 g	0,20 g	0,42 h	8 h	176 h
UFPI CB11-7B	0 c	0 e	0,26 g	0,25 f	0,51 h	10 h	213 h
UFPI CB11-9A	0 c	0 e	0,15 h	0,17 g	0,32 i	6 i	123 i
UFPI CB9-2	114 b	26 d	0,22 g	0,20 g	0,42 h	8 h	178 h
UFPI CB1-3	156 a	238 a	0,94 d	0,53 d	1,46 e	36 d	763 d
UFPI B5-1	130 b	180 b	0,58 f	0,30 e	0,89 g	22 f	479 f
UFPI B4-9	137 b	90 c	0,75 e	0,29 e	1,04 f	28 e	612 e
UFPI B3-9	0 c	0 e	0,33 g	0,30 e	0,63 h	12 g	264 g
BR 3267	171 a	258 a	1,26 c	0,64 c	1,89 c	48 c	1030 c
UFLA 3-84	118 b	146 b	1,17 c	0,52 d	1,68 d	44 c	952 c
INPA 3-11B	193 a	180 b	1,84 b	0,74 b	2,58 b	70 b	1498 b
CN	0 c	0 e	2,66 a	1,60 a	4,20 a	100 a	2177 a
SN	0 c	0 e	0,12 i	0,13 h	0,25 i	5 j	100j
CV (%)	35,16	1,41	13,20	11,65	11,33	5,19	8,24

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Quanto à produção de MSPA, entre os tratamentos inoculados, variou de 0,12 a 1,84 g planta⁻¹, sendo esses valores obtidos com as estirpes UFPI CB10-9 e INPA 3-11B, respectivamente (Tabela 4). Nenhuma estirpe, incluindo as inoculantes do feijão-caupi, promoveu produção de MSPA semelhante ou superior ao controle com N mineral, o qual produziu 2,66 g planta⁻¹. A estirpe INPA 3-11B destacou-se estatisticamente das demais estirpes inoculantes e das outras avaliadas no presente estudo. As estirpes UFLA 3-84 e BR 3267 promoveram produções semelhantes entre si, e também superiores às estirpes avaliadas (Tabela 4).

Entre as quatro estirpes que nodularam, a UFPI CB1-3 foi a que promoveu maior produção de MSPA (0,94 g planta⁻¹), seguida da UFPI B4-9 (0,75 g planta⁻¹). A estirpe UFPI B5-1 promoveu menor produção em relação a UFPI CB1-3 e UFPI B4-9, porém, se destacou em relação à estirpe nodulífera UFPI CB9-2 e as demais estirpes que não apresentaram capacidade nodulífera. Além das quatro que nodularam, doze estirpes que não nodularam, proporcionaram produção de MSPA significativamente superior ao controle sem N mineral (Tabela 4).

As produções de MSR e MST variaram de 0,12 a 1,60 g planta⁻¹ e de 0,23 a 4,26 g planta⁻¹ obtidas no tratamento inoculado com a estirpe UFPI CB10-9 e no controle com N mineral, respectivamente. Nenhuma estirpe promoveu produção de MSR e MST semelhante ou superior ao controle com N mineral. A estirpe inoculante INPA 3-11B promoveu produções significativamente superiores às demais estirpes. Entre as quatro estirpes que nodularam, a UFPI CB1-3, destacou-se significativamente das demais tanto na produção de MSR, como de MST, e seu comportamento foi semelhante à estirpe inoculante UFLA 3-84 para MSR, porém inferior em relação a MST. As estirpes nodulíferas UFPI B5-1 e UFPI B4-9 apresentam produção de MSR semelhantes entre si e agruparam-se as quatro estirpes que não nodularam (UFPI CB9-6, UFPI CB10-

6B, UFPI CB11-3B e UFPI B3-9), mas que, no entanto, promoveram maior produção de MSR, em relação ao controle sem N, cujos incrementos variaram de 108 a 130%, respectivamente, para os tratamentos inoculados com as estirpes UFPI CB10-6B e UFPI B3-9 (Tabela 4).

Quanto à EFCN, todas as estirpes apresentaram eficiência inferior ao controle com N mineral. Para a EFSN, entre os tratamentos inoculados, a INPA 3-11B apresentou eficiência estatisticamente superior (Tabela 4). As estirpes BR 3267 e UFLA 3-84 apresentaram eficiência semelhante entre si e superiores às demais estirpes avaliadas, a exceção da INPA 3-11B. De maneira geral, a maioria das estirpes (88%) apresentou eficiência significativamente superior ao controle sem N mineral, porém com desempenhos variáveis. Entre as 4 estirpes que nodularam, os valores de EFSN variaram de 178 a 763%, para as estirpes UFPI CB9-2 e UFPI CB1-3 respectivamente, e entre as não nodulíferas o maior valor foi de 213%, obtido no tratamento inoculado com a estirpe UFPI CB11-7B (Tabela 4).

A baixa ocorrência de nodulação verificada, no presente trabalho, não era esperada, uma vez que 16 das estirpes avaliadas, 13 oriundas de solos de Chapadas e mais 3 oriundas de solos de Várzeas, apresentaram autenticação positiva em experimento utilizando feijão-caupi (BR 17 Gurguéia) como planta hospedeira (MARTINS, 2011b). Este fato pode estar relacionado a interferências das condições ambientais, uma vez que o experimento de autenticação e o presente experimento foram realizados em diferentes regiões. Entre os fatores ambientais, destacam-se os limites críticos de temperatura. Gibson (1971) considera 27 a 40°C como limites máximos de temperatura para uma eficiente nodulação e FBN em leguminosas tropicais. Altas temperaturas podem afetar a sobrevivência da bactéria, o processo de infecção, a formação dos nódulos e ainda a atividade da FBN. No entanto, baixas temperaturas podem também resultar no atraso da infecção, redução da formação dos nódulos e da fixação de

N₂, sendo que abaixo de 8°C a atividade da nitrogenase pode, praticamente, cessar (BORDELEAU; PREVOST, 1994), apesar de algumas estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas serem tolerantes a baixas temperaturas (MARSH et al., 2006). No presente trabalho, foram registrados, na fase inicial do período experimental, limites de temperatura de 7 a 36°C (<<http://www.inmet.gov.br>>) na estação meteorológica próxima a casa de vegetação, podendo ter interferido na capacidade nodulífera de algumas estirpes. Considerando que as bactérias avaliadas, no presente experimento, são oriundas de uma região quente, possivelmente as baixas temperaturas foram mais prejudiciais. Porém, devem ser realizados outros testes, como, por exemplo, a avaliação da presença do gen *nodC* (N-acetylglucosaminyl transferase), para verificar a capacidade nodulífera dessas bactérias.

A tolerância a uma ampla faixa de temperatura é uma importante característica a ser considerada em programas de seleção de rizóbios, uma vez que as estirpes inoculantes são autorizadas para utilização em todas as regiões brasileiras. Assim, pode-se considerar que estirpes que nodularam (UFPI CB9-2; UFPI CB1-3; UFPI B5-1; UFPI B4-9), incluindo as inoculantes (BR 3267; UFLA 3-84; INPA 3-11B) são tolerantes a uma ampla faixa de temperatura para expressar a habilidade de nodular. No entanto, em relação à produção de MSPA e MSR, a estirpe INPA 3-11B destacou-se significativamente das demais (Tabela 4), comprovando a eficiência simbiótica dessa estirpe atualmente autorizada como inoculante para feijão-caupi, conforme também verificado no capítulo 2.

A nodulação, assim como a produção de matéria seca da parte aérea, constituem importantes parâmetros no processo de seleção de rizóbios e recomendação de inoculantes. No presente trabalho, verificou-se que, entre as estirpes avaliadas, a UFPI CB1-3 foi a que apresentou melhor performance, com nodulação semelhante às estirpes BR 3267 e INPA 3-11B e superior a estirpe

UFLA 3-84. No entanto, em relação à produção de matéria seca da parte aérea, ela apresentou menor desempenho em relação às estirpes inoculantes, porém, superior às demais estirpes que nodularam (Tabela 4).

Os valores médios de NN, MSN e MSPA obtidos, no presente trabalho, com as estirpes BR 3267, UFLA 3-84 e INPA 3-11B foram próximos aos encontrados por Soares (2009) e superiores aos encontrados por Marra et al., (2012), em trabalhos conduzidos em vasos de Leonard com plantas de feijão-caupi. No entanto, Lima, Pereira e Moreira (2005) e Nóbrega (2006), em trabalhos também conduzidos com feijão-caupi em vasos de Leonard, registraram valores médios de MSPA superiores ao presente trabalho para as estirpes UFLA 3-84 e INPA 3-11B e para os controles sem N mineral e com N mineral. Considerando que o tempo de condução do presente trabalho (60 dias) e dos demais mencionados foi semelhante, essas diferenças podem ser consequência da interferência das condições ambientais, uso de soluções nutritivas diferentes e também da cultivar de feijão-caupi utilizada, que diferem entre alguns estudos.

Das 10 estirpes que não apresentaram nodulação positiva (ANEXO C), no experimento de autenticação, mas que atuaram na promoção do crescimento das plantas de feijão-caupi (MARTINS, 2011b), 6 estirpes (UFPI CB1-8, UFPI CB4-1, UFPI CB11-3B, UFPI CB11-4, UFPI CB11-6B e UFPI CB11-7B) mantiveram boa performance como promotoras do crescimento dessa espécie, proporcionando produção de matéria seca total semelhante a uma das estirpes nodulíferas (UFPI CB9-2). Além das estirpes mencionadas, outras estirpes que não nodularam também apresentaram bom desempenho na promoção do crescimento de feijão-caupi, destacando-se as seguintes: UFPI CB4-1A, UFPI CB7-1, UFPI CB8-1, UFPI CB9-6 e UFPI CB10-6B. Esses dados sugerem que a promoção do crescimento vegetal por essas estirpes pode estar relacionada à atuação das mesmas em outros processos biológicos fitoestimuladores, que não a

FBN. Todas essas estirpes mostram-se positivas quanto à capacidade de síntese de AIA *in vitro* (Tabela 2), o que pode ter contribuído para promoção do crescimento das plantas, porém, as concentrações de AIA sintetizadas por foram bastante variáveis, de 0,30 (UFPI CB 11-7B) a 27,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (UFPI B4-1), indicando que algumas estirpes podem também ter atuado em outros processos, os quais não foram avaliados no presente trabalho. Além da capacidade de síntese de AIA *in vitro*, verificou-se que a maioria das estirpes que promoveram o crescimento das plantas de feijão-caupi foi capaz de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* em meio NBRIP (Tabela 1), porém, não há como relacionar essa capacidade com o crescimento das plantas, uma vez que as fontes de fósforo utilizadas na solução nutritiva são solúveis.

Considerando-se que a maioria das estirpes avaliadas, no presente experimento, promoveu o crescimento das plantas de feijão-caupi, seja pela atuação na FBN e/ou em outros processos fitoestimuladores, pode-se inferir que os solos sob cultivo de feijão-caupi, nos agroecossistemas de Chapadas do Cerrado piauiense, constituem importantes fontes de recursos genéticos com potencial biotecnológico.

3.3 Caracterização genética das estirpes

As estirpes mais eficientes em promover o crescimento de plantas de soja e feijão-caupi nos experimentos conduzidos em garrafas do tipo “*long neck*” e vasos de Leonard, respectivamente, foram selecionadas para o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Porém, para algumas estirpes, principalmente aquelas com elevada produção de goma, não foi possível fazer extração com kit de extração do DNA genômico bacteriano (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ da *Zymo Research*) utilizado. As sequências obtidas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA variaram de

480 a 969 pares de bases e foram submetidas ao banco de dados “*GenBank*” (National Center for Biotechnology Information, 2013). A porcentagem de máxima similaridade entre as estirpes avaliadas e as estirpes tipo depositadas no *GenBank* variou de 85 a 100% (Tabela 5).

Através da comparação das sequências obtidas com as depositadas no “*GenBank*” foi possível a identificação de 6 gêneros: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Citrobacter*, *Brevibacillus*, *Enterobacter* e *Bradyrhizobium* (Tabela 5).

Dentre as onze estirpes avaliadas, apenas para três foi possível à discriminação ao nível de espécie: UFPI CB2-9 (*Brevibacillus brevis*), UFPI CB4-1 (*Paenibacillus rigui*) e UFPI CB7-8 (*Paenibacillus rigui*). Para as demais, houve a mesma similaridade para mais de uma espécie, ou só foi possível a identificação ao nível de gênero (Tabela 5); por isso, no presente trabalho, serão considerados apenas os gêneros para essas estirpes.

Das quatro estirpes que nodularam plantas de feijão-caupi, foi possível obter o sequenciamento do gene 16S rRNA de três, as quais foram identificadas, com 99% de similaridade, como pertencentes aos gêneros *Paenibacillus* (UFPI B4-9), *Bradyrhizobium* (UFPI B5-1) e *Bacillus* (UFPI CB1-3) (Tabela 5). Entre essas, a UFPI CB1-3 (*Bacillus* sp.) foi a mais eficiente em simbiose com plantas de feijão-caupi (Tabela 4).

Vários trabalhos, na literatura, têm relatado a identificação de estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, provenientes de nódulos de feijão-caupi, a partir da análise do gene 16S rRNA (GUIMARÃES et al., 2012; JARAMILLO, 2010; SOARES, 2009). Já os gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* não são comumente nodulíferos de leguminosas, no entanto, já foi relatada a nodulação em feijão-caupi por esses dois gêneros (JARAMILLO, 2010; MARRA et al., 2012). No trabalho de Marra et al. (2012), dos 15 isolados de nódulos de feijão-caupi que foram submetidos ao sequenciamento do gene 16S rRNA, 8 foram identificados (99 a 100% de similaridade) como pertencentes ao

gênero *Paenibacillus*, sendo 4 isolados nodulíferos e 4 não nodulíferos. Nesse trabalho verificou-se que a estirpe UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*) foi muito eficiente na nodulação e fixação de N₂, apresentando comportamento semelhante às estirpes inoculantes do feijão-caupi, que são pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*.

As estirpes UFPI CB4-1 e UFPI CB7-8, pertencentes à espécie *Paenibacillus rigui* (98% de similaridade), a UFPI CB2-9, pertencente à espécie *Brevibacillus brevis* (99% de similaridade) e as estirpes UFPI CB10-9 e UFPI CB-6 identificadas como pertencentes aos gêneros *Enterobacter* (100% de similaridade) e *Citrobacter* (85% de similaridade), respectivamente, estão entre as estirpes que sintetizaram maiores quantidades de AIA (Tabela 2). Elas foram eficientes na promoção do crescimento de plantas de soja, no entanto, não exerceram nenhum efeito sobre a produção de MSPA e MST de plantas de feijão-caupi, à exceção da estirpe UFPI CB4-1 (Tabelas 3 e 4).

As estirpes UFPI CB1-8, UFPI CB4-1A e UFPI CB7-1, identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* (99% de similaridade), foram capazes de solubilizar o fosfato de cálcio, porém, apresentaram produção de AIA abaixo de 10 µg mL⁻¹. Elas estão entre as que apresentaram maior destaque na promoção do crescimento de plantas de soja e feijão-caupi (Tabelas 3 e 4).

De maneira geral, assim como verificado no capítulo 2, o sequenciamento do gene 16S rRNA não foi uma ferramenta muito útil para discriminação ao nível de espécie, porém, mostrou-se eficiente para identificação ao nível de gênero. No trabalho de Guimarães et al., (2012), também foi verificado que o sequenciamento do 16S rRNA não foi suficiente para identificação, ao nível de espécie, da maioria das estirpes avaliadas, sendo que para uma única estirpe, foi constatado 100% de similaridade com quatro espécies de *Bradyrhizobium*.

Tabela 5 Identificação das estirpes, simbióticas e não simbióticas, isoladas de nódulos de feijão-caupi, baseada nas sequências mais similares encontradas no *GenBank* (NCBI)

Estirpe	Nodula- ção	Testes fenotípicos		Número de pares de base	Sequência mais similar encontrada no <i>GenBank</i> (NCBI)		
		ISF (mm)	AIA c/T ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Espécie	% de Simila ridade	Número de acesso
UFPI CB-6	-	1,45	18,06	480	<i>Citrobacter</i> sp.	85	HE575902.1
UFPI CB1-8*	-	2,02	9,49	764	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	CP003838.1
				764	<i>Bacillus</i> sp.	99	JX094297.1
UFPI CB2-9	-	CNS	8,70	963	<i>Brevibacillus brevis</i>	99	HQ143578.1
UFPI CB4-1	-	1,16	27,03	938	<i>Paenibacillus rigui</i>	98	EU939688.1
UFPI CB4-1A*	-	1,24	1,82	796	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ726625.1
				796	<i>Bacillus tequilensis</i>	99	JN700167.1
UFPI CB7-1*	-	1,32	3,87	901	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	CP003838.1
				901	<i>Bacillus</i> sp.	99	JX094297.1
UFPI CB7-8	-	CNS	47,68	880	<i>Paenibacillus rigui</i>	98	EU939688.1
UFPI CB10-9	-	1,49	35,00	947	<i>Enterobacter</i> sp.	100	HQ122932.1
UFPI B4-9 *	+	CNS	10,21	969	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	GU328690.1
				969	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	99	JN084141.1
UFPI B5-1*	+	CNS	ND	939	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	99	AB698736.1
				939	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	AB220164.1
UFPI CB1-3*	+	CNS	3,73	641	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ308580.1
				641	<i>Bacillus</i> sp.	99	JQ419636.1

Testes fenotípicos: ISF = índice de solubilização final; AIA c/T = máxima produção de ácido-3-indol acético (AIA) na presença triptofano; CNS = Cresceu não solubilizou; ND = Não detectado; *Estirpes com a mesma similaridade para mais de uma espécie.

4 CONCLUSÕES

A maioria das estirpes avaliadas (69%) mostrou capacidade para solubilização de fosfato de cálcio *in vitro*.

Na presença da suplementação com triptofano, todas as estirpes sintetizaram o AIA em meio 79, destacando-se a UFPI CB7-8, e no meio DYGS, 80% o sintetizaram, destacando-se a estirpe BR 11001^T.

Nenhuma estirpe foi capaz de nodular plantas de soja, no entanto, 42% promoveram maior produção de matéria seca da parte aérea e da raiz em relação ao controle sem inoculação e sem nitrogênio mineral.

Entre as estirpes inoculadas em feijão-caupi, somente quatro nodularam, destacando-se a UFPI CB1-3, porém, a maioria (88%) apresentou desempenho superior ao controle sem inoculação e sem nitrogênio mineral quanto à produção de matéria seca da parte aérea.

As estirpes nodulíferas foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Bacillus* e *Paenibacillus*, e as não nodulíferas promotoras do crescimento vegetal como pertencentes aos gêneros *Citrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Enterobacter*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos solos sob cultivo de feijão-caupi, em agroecossistemas de Várzeas e Chapadas do Sudoeste piauiense, há ocorrência de bactérias com capacidade de atuação em diferentes processos biológicos (fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de AIA) que podem resultar na melhoria da nutrição das plantas, contribuindo para sustentabilidade agrícola.

A capacidade solubilizadora de fosfato de cálcio foi detectada em um maior número de estirpes oriundas de solos de Várzeas, em relação às oriundas de solos de Chapadas; enquanto a síntese de AIA, na ausência da suplementação com triptofano, ocorreu em um maior número de estirpes oriundas de solos de Chapadas.

De maneira geral, foi verificada ampla variabilidade na capacidade de síntese de AIA entre as bactérias oriundas de solos de Várzeas e de Chapadas, indicando que as mesmas apresentam potencial para promoção do crescimento de diferentes culturas agrícolas, uma vez que as concentrações de AIA fitoestimuladoras variam inter e intra espécies vegetais.

A estimulação do crescimento de plantas de soja e feijão-caupi promovida pelas bactérias simbióticas e não simbióticas, em condições axênicas, poderá não ocorrer quando inoculadas em solo, havendo a necessidade de novos estudos para verificar a verdadeira contribuição dessas bactérias, na presença da interação com outros microrganismos e demais componentes do solo, e também, em outras culturas de interesse agrícola.

Os gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* identificados como nodulíferos de feijão-caupi, oriundos de solos de Várzeas e Chapadas, respectivamente, ainda não são consolidados na literatura como nodulíferos de leguminosas, sendo necessário a realização de mais testes moleculares, como a verificação da presença do gene *nodC*, para confirmar a capacidade nodulífera nesses gêneros de bactérias.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T. J. A.; MONTEIRO, M. S. L. Modelo agrícola e desenvolvimento sustentável: A ocupação do Cerrado piauiense. **Ambiente e Sociedade**, Campinas, v. 8, p. 1-18, 2005.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN M. S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 29, p. 29-34, 2005.
- ANJUM, M. A. et al. Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings under axenic conditions. **Soil Environmental**, Pakistan, v. 30, n. 1, p. 18-26, 2011.
- ARAÚJO, A. S. F. et al. Coinoculação de rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre anodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, 2010.
- BAI, Y. et al. Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean [*Glycine max* (L.) Merr] grown in soil-less media. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 34, p. 1953-1957, 2002.
- BELIMOV, A. A. et al. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 1485-1495, 2007.
- BISWAS, J. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 5, p. 880-886, 2000.
- BORDELEAU, L. M.; PREVOST, D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. **Plant and Soil**, The Hague, v. 161, p. 115-125, 1994.
- CAMACHO, M. et al. Soils of the Chinese Hubei province show a very high diversity of *Sinorhizobium fredii* strains. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, p. 592-602, 2002.
- CAMPOS, L. P. et al. Atributos químicos de um latossolo amarelo sob diferentes sistemas de manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1681-1689, 2011.

CHABOT, R. et al. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 30, p. 1615-1618, 1998.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVIERA, A. N. Produção de ácido indol acético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 6, p. 812-817, 2009.

CHUEIRE, L. M. O.; HUNGRIA, M. N₂-fixation ability of Brazilian soybean cultivars with *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium xinjiangensis*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 196, p. 1-5, 1997.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Seropédica, 1995. 60 p.

DREYFUS, B. L.; ELMERICH, C.; DOMMARGUES, Y. R. Free-living rhizobium strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, p. 711-713, 1983.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 143 p.

GIBSON, A. H. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. **Plant Soil**, The Hague, (Spec. Vol.), v. 139-152, 1971.

GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, 2012.

HALDER, A. K. et al. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Journal Genetics Applied Microbiology**, Tokyo, v. 36, p. 81-92, 1990.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 343-357, 2004.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizobio de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 667-672, 2005.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. T. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experiment Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

JANGU, O. P.; SINDHU, S. S. Differential response of inoculation with indole acetic acid producing *Pseudomonas* sp. In Green Gram (*Vigna radiata* L.) and Black Gram (*Vigna mungo* L.). **Micobiology Journal**, New York, v. 1, n. 5, p. 159-173, 2011.

JARAMILLO, P. M. D. **Diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob agrofloresta na Amazônia Ocidental usando o caupi como planta isca**. 2010. 66 p. Dissertação (Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

JESUS, A. A. **Caracterização fenotípica e simbiótica de populações e estirpes de bactérias que nodulam *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong no Sudoeste do Piauí**. 2012. 77 p. Dissertação (Mestrado em solos e nutrição de plantas) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2012.

KAN, F. L. et al. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 188, p. 103-115, 2007.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 39-44, 1989.

KUSS, A. V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indol acético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, p. 298-300, 2000.

LI, J. H. et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 40, p. 238-246, 2008.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. isoladas de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.

LIMA, A. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under diferente uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 319, p. 127-145, 2009.

LIN, T. F. et al. The protons of glucônico acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Tecnology**, Tainan, v. 97, p. 957-960, 2006.

MAGALHÃES, F. M. et al. A New acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251p.

MANDAL, S. M. et al. Optimization of cultural and nutritional conditions for indole 3-acetic acid (IAA) production by a *Rhizobium* sp. isolated from root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Research Journal of Microbiology**, British, v. 2, p. 239-246, 2007.

MARTINS, L. V. **Eficiência simbiótica de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de solos da Várzea e do Cerrado Piauiense**. 2011b. 50 p. Monografia (Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2011b.

MARTINS, R. N. L. **Bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio em solos sob cultivo de feijão-caupi no Pólo de produção Bom Jesus- PI**. 2011a. 67 p. Dissertação (Mestrado em solos e nutrição de plantas) - Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2011a.

MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 603-609, 2011.

MARRA, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant Soil**, The Hague, v. 353, p. 289-307, 2012.

MARSH, L. E. et al. Temperature effects on *Bradyrhizobium* spp. growth and symbiotic effectiveness with pigeonpea and cowpea. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 29, p. 331-346, 2006.

MATIAS, M. C. B. et al. Propriedades químicas em Latossolo Amarelo de Cerrado do Piauí sob diferentes sistemas de manejo. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 40, p. 356-362, 2009.

MELLONI, R. et al. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 235-246, 2006.

MINAMISAWA, K. et al. Preferential nodulation of *Glycine max*, *Glycine soja* and *Macroptilium atropurpureum* by two *Bradyrhizobium* species *japonicum* and *elkanii*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 49-56, 1997.

MOREIRA, F. M. S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 1991. 158 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1991.

MOREIRA, F. M. S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, n. 1, p. 135-146, 1993.

MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Soil biodiversity in**

Amazonian and other Brazilian ecosystems. Wallingford, CAB International Publishing, 2006, p. 237-270.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Lucknow, v. 170, p. 265-270, 1999.

NÓBREGA, R. S. A. **Efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo, ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).** 2006. 188 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

OLIVEIRA, S. M. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão-caupi, feijão comum e siratro.** 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

OLIVEIRA, S. M. **Rizobactérias promovem o crescimento de feijoeiro-comum e de milho por diferentes processos.** 2011. 103 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ONA, O. et al. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters**, Lucknow, v. 246, p. 125-132, 2005.

PALANIAPPAN, P. et al. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 807-816, 2010.

PATIL, N. B. et al. Optimization of Indole 3 acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane. **International Journal of Environmental Sciences**, Maharashtra, v. 2, n. 1, 2011.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

PEREZ, E. et al. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 2905-2914, 2007.

PIEX, A. et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 33, n. 1, p. 103-110, 2001.

PRAGANA, R. B. et al. Qualidade física de Latossolos amarelos sob plantio direto na região do cerrado piauiense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 1591-1600, 2012.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo, Ceres, 1991. 343p.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 172, p. 261-269, 1995.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 658-664, 2008.

SILVA, A. T. **Diversidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de siratro**. 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SOARES, B. L. **Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio de diferentes procedências em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e sua identificação**. 2009. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SOLOMON, T.; PANT, L. M.; ANGAW, T. Effects of inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains on nodulation, nitrogen fixation, and yield of soybean (*Glycine max* L. Merrill) varieties on nitisols of Bako, Western Ethiopia. **International Scholarly Research Network**, Benin, v. 26, n. 8, 2012.

SOUCHIE, E. L. et al. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 1149-1152, 2005.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Quantitative survey of phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of grasses and legumes in the Amazon. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, p. 15-22, 1982.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, p. 571-586, 2003.

VIEIRA NETO, S. L. et al. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 861-870, 2008.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970, 164 p.

YAHALOM, E.; OKON, Y.; DOVRAT, A. Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the root morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 10-14, 1990.

ZHANG, W. T. et al. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 201-210, 2007.

ZILLI, J. E. et al. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 281-287, 2004.

ANEXOS

- A** Origem das estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos de Várzeas e Chapadas sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense (Dados extraídos de MARTINS, 2011a).....146
- B** Caracterização química das amostras de solo, profundidade de 0-0,2 m, das áreas de Várzeas e Chapadas do Sudoeste piauiense. pH em água, acidez potencial (H+Al), acidez trocável (Al⁺³), saturação por alumínio (m), soma de bases (SB), CTC efetiva (t), CTC potencial (T) e saturação por bases (V) (Dados extraídos de Martins, 2011a).....147
- C** Características culturais das estirpes de bactérias, isoladas de amostras de solos de Várzeas e Chapadas sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense (Dados extraídos de MARTINS, 2011a e b).....148

ANEXO A Origem das estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos de Várzeas e Chapadas sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense (Dados extraídos de MARTINS, 2011a)

Área	Coordenadas		Produtividade	Classificação do solo
Várzea				
B1	S - 09° 32' 23"	W - 44° 35' 40"	> 600 kg ha ⁻¹	Neossolo flúvico
B2	S - 09° 40' 34"	W - 44° 37' 32"	< 300kg há ⁻¹	
B3	S - 09° 31' 20"	W - 44° 33' 21"	> 600 kg ha ⁻¹	
B4	S - 09° 32' 37"	W - 44° 38' 16"	< 300kg há ⁻¹	
B5	S - 09° 27' 22"	W - 44° 35' 36"	> 600 kg ha ⁻¹	
B6	S - 09° 27' 21"	W - 44° 34' 50"	< 300kg há ⁻¹	
B7	S - 09° 12' 13"	W - 44° 34' 18"	Mata Nativa	
Cerrado				
CB	S - 09° 15' 06"	W - 44° 53' 45"	1.200 kg ha ⁻¹	Latossolo Amarelo
CB1	S - 09° 17' 34"	W - 45° 00' 33"	1.200 kg ha ⁻¹	
CB2	S - 09° 14' 48"	W - 44° 50' 52"	1.200 kg ha ⁻¹	
CB3	S - 09° 13' 20"	W - 44° 25' 16"	1.200 kg ha ⁻¹	
CB4	S - 09° 11' 58"	W - 44° 53' 56"	1.200 kg ha ⁻¹	
CB5	S - 09° 20' 63"	W - 44° 56' 45"	1.200 kg ha ⁻¹	
CB6	S - 09° 14' 60"	W - 44° 53' 56"	Mata Nativa	
CB7	S - 09° 13' 12"	W - 44° 53' 33"	1.200 kg ha ⁻¹	
CB8	S - 09° 17' 34"	W - 45° 00' 33"	1.200 kg ha ⁻¹	
CB9	S - 09° 15' 06"	W - 44° 53' 45"	>1.200 kg ha ⁻¹	
CB10	S - 09° 19' 00"	W - 44° 49' 98"	>1.200 kg ha ⁻¹	
CB11	S - 09° 20' 63"	W - 44° 56' 45"	>1.200 kg ha ⁻¹	

¹Cultivo do feijão-caupi por mais de 30 anos, sem utilização de corretivos, fertilizantes minerais e inoculantes microbianos; ²Cultivo do feijão-caupi após a colheita do arroz e, ou em rotações com a soja, em condição de sequeiro, por mais de 10 anos, com utilização de corretivos, fertilizantes minerais e inoculantes recomendados para soja.

ANEXO B Caracterização química das amostras de solo, profundidade de 0-0,2m, das áreas de Várzea e Cerrado do Sudoeste piauiense. pH em água, acidez potencial (H+Al), acidez trocável (Al^{+3}), saturação por alumínio (m), soma de bases (SB), CTC efetiva (t), CTC potencial (T) e saturação por bases (V) (Dados extraídos de MARTINS, 2011a)

Área	pH H ₂ O	H+Al cmol _c cm ⁻³	Al ⁺³ cmol _c cm ⁻³	m (%)	SB cmol _c cm ⁻³	t cmol _c cm ⁻³	T cmol _c cm ⁻³	V (%)
Várzea								
B1	6,6	1,1	0,0	0,0	11,8	11,8	12,9	91,4
B2	6,8	0,9	0,0	0,0	9,8	9,8	10,6	91,7
B3	6,2	1,3	0,0	0,0	11,9	11,9	13,2	89,7
B4	5,1	4,2	0,0	0,0	14,6	14,7	18,8	77,6
B5	6,6	0,8	0,0	0,0	6,7	6,7	7,5	88,8
B6	6,3	1,0	0,0	0,0	8,3	8,3	9,4	88,9
B7	6,6	0,9	0,0	0,0	5,0	5,0	5,8	84,8
Chapada								
CB	4,7	4,6	0,2	10,4	2,9	3,1	7,5	36,7
CB1	4,8	4,5	0,4	20,7	1,5	1,9	6,0	25,4
CB2	4,5	4,7	0,0	0,0	4,3	4,3	9,0	47,9
CB3	4,7	4,6	0,3	15,5	2,2	2,5	6,8	36,7
CB4	5,3	3,9	0,3	3,7	7,8	8,1	12	66,7
CB5	5,0	5,1	0,5	6,3	7,4	7,9	13	59,2
CB6	4,5	4,9	1,3	71,5	0,5	1,8	5,4	9,56
CB7	5,0	6,5	0,0	0,0	0,8	0,8	7,3	10,4
CB8	5,5	3,6	0,0	0,0	3,5	3,5	7,1	49,1
CB9	5,5	2,6	0,2	5,3	3,6	3,8	6,2	57,9
CB10	4,7	6,3	0,0	0,0	2,3	2,3	8,6	27,1
CB11	5,6	3,0	0,0	0,0	3,0	3,0	6,0	49,9

ANEXO C Características culturais e nodulação das estirpes de bactérias, isoladas de amostras de solos de Várzeas e Chapadas sob cultivo de feijão-caupi no Sudoeste piauiense (Dados extraídos de MARTINS, 2011a e b)

Estirpes	Caracterização cultural ¹					Nodulação ⁷
	T.C ²	pH ³	Cor ⁴	Abs.Ind. ⁵	Diam ⁶	
Várzeas						
UFPI B1-5	RP	AC	AU	SIM	3	+
UFPI B1-7	RP	NT	AM	SIM	1	+
UFPI B1-8	RP	AL	CR	NÃO	3	+
UFPI B1-9	RP	NT	AU	SIM	4	+
UFPI B3-1	RP	AL	CR	SIM	3	+
UFPI B3-3	RP	AL	CR	SIM	1	+
UFPI B3-4	IT	AL	CR	SIM	1	+
UFPI B3-5	RP	AL	AU	SIM	1	+
UFPI B3-7	RP	AL	AU	SIM	1	+
UFPI B4-3	RP	AL	AU	NÃO	>3	+
UFPI B4-5	RP	AL	AU	SIM	2	+
UFPI B4-6	RP	AL	AU	SIM	3	+
UFPI B4-7	RP	AL	AU	SIM	4	+
UFPI B5-4	RP	AC	AU	NÃO	5	-
UFPI B5-6	RP	AC	AU	SIM	>3	+
UFPI B5-7A	RP	AC	AU	NÃO	3	+
UFPI B5-8A	LT	NT	CR	NÃO	<1	+
UFPI B6-1	RP	AC	CR	SIM	3	-
UFPI B6-3	RP	AC	CR	SIM	3	+
UFPI B6-9B	RP	NT	CR	NÃO	<1	+
UFPI B7-1	IT	AL	AU	SIM	3	+
UFPI B7-3	RP	AC	AU	SIM	3	+
UFPI B7-5	RP	AL	AU	SIM	4	+
UFPI B7-6	RP	AC	AU	SIM	4	+
UFPI B7-7B	RP	AC	AU	NÃO	2	+
UFPI B7-8	RP	AC	AU	NÃO	4	+
UFPI B7-9	RP	AC	AU	NÃO	1	+
UFPI B3-9	RP	AC	AM	SIM	1	+
UFPI B4-9	RP	AL	AU	SIM	4	+
UFPI B5-1	RP	AC	AU	NÃO	4	+
Chapadas						
UFPI CB-5	RP	AC	CR	NÃO	1	+
UFPI CB-6	RP	AC	AU	NÃO	>3	+
UFPI CB1-3	RP	NT	CR	NÃO	<1	+

ANEXO C, continua

Estirpes	Caracterização cultural ¹				Diam ⁶	Nodulação ⁷
	T.C ²	pH ³	Cor ⁴	Abs.Ind. ⁵		
UFPI CB1-8	IT	NT	CR	NÃO	1	-
UFPI CB2-9	RP	NT	CR	NÃO	<1	-
UFPI CB4-1	RP	NT	CR	NÃO	<1	-
UFPI CB4-1A	RP	AL	CR	NÃO	1	+
UFPI CB7-1	RP	AL	CR	NÃO	<1	+
UFPI CB7-8	RP	NT	CR	NÃO	<1	+
UFPI CB8-1	IT	NT	CR	NÃO	<1	+
UFPI CB8-4	IT	NT	CR	NÃO	<1	-
UFPI CB9-2	IT	NT	CR	NÃO	<1	+
UFPI CB9-6	RP	NT	AU	SIM	<1	+
UFPI CB10-1	RP	AL	AU	SIM	3	-
UFPI CB10-2	IT	NT	AU	SIM	3	+
UFPI CB10-6B	IT	NT	CR	NÃO	<1	+
UFPI CB10-7	IT	NT	AU	NÃO	4	+
UFPI CB10-9	RP	AL	AU	NÃO	<1	+
UFPI CB11-3B	RP	AC	AU	SIM	1	-
UFPI CB11-4	RP	AL	AU	NÃO	1	-
UFPI CB11-6B	RP	AL	AM	SIM	1	-
UFPI CB11-7B	RP	AC	AM	NÃO	2	-
UFPI CB11-9A	RP	AC	AU	SIM	2	-

¹Caracterização cultural (Martins, 2011a), ²Tempo de crescimento: (RP) rápido, (IT) intermediário, (LT) lento, ³pH do meio: (AC) ácido, (NT) neutro, (AL) alcalino; ⁴Cor: (AM) amarelo, (AU) amarelo ouro, (CR) creme; ⁵Absorção de indicador; ⁶Diâmetro da colônia (mm), ⁷Nodulação de feijão-caupi em experimento de autenticação (Martins, 2011b).