

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO**

**NAYARA MORENO MARTINS**

**Caracterização morfofisiológica de rizóbios simbioses de guandu, feijão-de-porco, crotalária, mucuna-cinza e mucuna-preta**

**DOURADOS/MS**

**2014**

**NAYARA MORENO MARTINS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade da Universidade Federal da Grande Dourados, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Geral/Bioprospecção.

Área de concentração: Bioprospecção

Orientador: Dr. Fábio Martins Mercante

**Dourados**

**2014**

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

M386c Martins, Nayara Moreno.  
Caracterização morfofisiológica de rizóbios simbiotes de guandu, feijão-de-porco, crotalária, mucuna-cinza e mucuna-preta. / Nayara Moreno Martins – Dourados, MS: UFGD, 2014.  
104f.

Orientador: Dr. Fábio Martins Mercante.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1.Caracterização fenotípica. 2.Simbiose. 3.Adubo verde. 4. Fixação biológica de nitrogênio. I. Título.

CDD –631.8

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

“CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE RIZÓBIOS SIMBIONTES DE GUANDU, FEIJÃO-DE-PORCO, CROTALÁRIA, MUCUNA-CINZA E MUCUNA-PRETA.”

POR

NAYARA MORENO MARTINS

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: “BIOPROSPECÇÃO”.

PROF. DR. FÁBIO MARTINS MERCANTE  
ORIENTADOR – EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE

DR. OSCAR FONTÃO DE LIMA FILHO  
MEMBRO TITULAR – EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE

PROF. DR. ROGÉRIO FERREIRA DA SILVA  
MEMBRO TITULAR – UEMS/CAMPUS GLÓRIA DE DOURADOS

APROVADA EM 17 DE JULHO DE 2014

*Aos meus pais, que sempre me apoiaram nos estudos, dedico.*

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente *Deus*, que por ser a inteligência suprema e a causa primária de todas as coisas, está sempre presente na minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Fábio Martins Mercante, pelas orientações, dicas, contribuições e principalmente por ter a paciência de me ensinar coisas que levarei para a vida.

À minha família – meu pai, minha mãe, meu irmão e minha avó – que sempre me deu suporte físico e emocional para concluir essa caminhada.

Agradeço aqueles que não passaram em minha vida por acaso: “amigos, amo todos vocês, obrigada pelas ‘saídas de segunda’, obrigada pelas ‘quartas insanas’ e obrigada pelos ‘puxões de orelha’, vocês foram essenciais, guardo tudo no coração!”.

“Alessandra, Bruno, meus companheiros de mestrado, obrigada por estarem sempre junto comigo, me apoiando e me ajudando”.

Agradecimentos à galera do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Agropecuária Oeste (Gustavo, Michel, Lucas, Simone, Fabiana e Vladimir) e aos agregados (Choco, Felipe, Janaína e Rafaela): “Sem vocês, eu não conseguiria concluir este trabalho”.

Com palavras não consigo agradecer a ajuda imensurável do funcionário mais dedicado da unidade da Embrapa em Dourados. “Gabriel, você faz jus ao seu nome, um verdadeiro anjo. Obrigada!”.

Obrigado ao pessoal do Laboratório de Solos (Willian, Paulo, Mário, Aroldo, Matheus, Albert, Andrew, Carla, Andréia) por ter me auxiliado com as análises de quantificação de nitrogênio.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal) e à Embrapa Agropecuária Oeste, por me fornecerem todo o suporte financeiro e infraestrutura para a realização deste trabalho.

Agradeço à Maira por ter me ajudado a interpretar a árvore fenotípica.

Obrigada a todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da UFGD: Professores, coordenadora e um obrigado especial ao secretário, Paulo Henrique Figueiredo, por ter me passado todas as informações importantes e sempre estar disposto a ajudar.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Quanto mais aumenta o nosso conhecimento mais evidente fica nossa ignorância.”*

*John Fitzgerald Kenned*

## Resumo

MARTINS, N. M. **Caracterização morfofisiológica de rizóbios simbiotes de guandu, feijão-de-porco, crotalária, mucuna-cinza e mucuna-preta.** 2014. 104p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

As leguminosas (Fabaceae) têm sido amplamente utilizadas como adubo verde principalmente pelo fato de apresentarem a capacidade de associar-se simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio, trazendo muitos benefícios para melhoria da qualidade do solo. Dessa forma, torna-se necessário um trabalho contínuo de seleção de rizóbios, com alta eficiência simbiótica e competitividade, para as diferentes espécies utilizadas como adubo verde, nas diversas regiões do País. O presente estudo foi realizado com objetivo de avaliar a eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio, nativas de solos do Cerrado de Mato Grosso do Sul, associadas a diferentes espécies de adubo verde, bem como realizar a caracterização morfofisiológica dos rizóbios avaliados. O trabalho foi desenvolvido na Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados/MS. Inicialmente, procedeu-se a caracterização fenotípica dos isolados e, em seguida, foram realizados os testes de eficiência simbiótica em condições de casa de vegetação. Foram testados 94 isolados de rizóbio, em substrato esterilizado (areia + vermiculita, 1:1, v:v) e aqueles que mostraram-se promissores foram submetidos a testes em vasos com solo (não esterilizado). Sob condições não esterilizadas, foram testados cinco isolados em crotalária (*Crotalaria juncea* L.) e feijão-de-porco [*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.], e quatro para as demais espécies: guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], mucuna-preta [*Mucuna aterrima* (L.) (Piper & Tracy)], Holland] e quatro isolados simbiotes de mucuna-cinza [*Mucuna nivea* (L.) D.C.]. Nas duas etapas de seleção, foram incluídos tratamentos sem inoculação, com e sem adubação nitrogenada ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), além de tratamentos com estirpes comercialmente recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil. Os isolados de rizóbios nativos de solos de Cerrado de Mato Grosso do Sul apresentaram grande diversidade fenotípica e alto potencial para a fixação biológica de nitrogênio em adubos verdes, podendo-se destacar os seguintes isolados: CPAO 86.1, para crotalária; CPAO 104.3 e CPAO 76.2, para feijão-de-porco; CPAO 2.1CMIGU, para guandu; CPAO 124.1, para mucuna-preta e CPAO 117.1, para mucuna-cinza; tais isolados de rizóbio são, considerados promissores para a obtenção de inoculantes mais eficazes para estas espécies de adubo verde.

**Palavras-chave:** caracterização fenotípica. simbiose. adubo verde e fixação biológica de nitrogênio.

## Abstract

MARTINS, N. M. **Morphophysiological characterization symbiotic rhizobia of *Cajanus cajan* (L.), *Canavalia ensiformis* (L.), *Crotalaria juncea* (L.), [*Mucuna aterrima* (L.) (Piper & Tracy) (Holland)] and *Mucuna nivea* (L.) DC.** 2014. 104p. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

Legumes (Fabaceae) have been widely used as green manure mainly because they had the ability to associate symbiotically with nitrogen fixing bacteria, bringing many benefits to improving soil quality. Thus, it becomes necessary ongoing work of selecting rhizobia, symbiotic with high efficiency and competitiveness for the different species used as green manure in different regions of the country. Present study was conducted to evaluate the symbiotic effectiveness of nitrogen fixing bacteria, the native of Cerrado soils of Mato Grosso do Sul State, associated with different species of green manure, as well as perform morphophysiological characterization of rhizobia evaluated. The study was conducted at Embrapa Western Region Agriculture in Dourados/MS. Initially proceeded to phenotypic characterization of the isolates and then tests symbiotic efficiency in greenhouse conditions were conducted. 94 rhizobia in sterilized substrate (sand, vermiculite, 1:1, v:v) and those who have shown promise underwent tests in pots with soil (non-sterile). Under non-sterile conditions, five isolates were tested in hemp (*Crotalaria juncea* L.), and *Canavalia ensiformis* (L.) DC. and four other species pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], *Mucuna aterrima* (L.) (Piper & Tracy) (Holland) and four strains of symbionts *Mucuna nivea* (L.) DC. In both stages of selection, without inoculation treatments, with and without N fertilizer (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) were included, as well as treatments with commercially recommended strains for production inoculants in Brazil. Isolates of native rhizobia in soils of Cerrado of Mato Grosso do Sul showed great phenotypic diversity and high potential for biological nitrogen fixation of green manure can highlight the isolates CPAO 86.1 to sun hemp, CPAO 104.3, CPAO 76.2 for jack bean, CPAO 2.1CMIGU for pigeon pea, CPAO 124.1 for *Mucuna aterrima* (L.) DC. and CPAO 117.1 for *Mucuna nivea* (L.) DC. considered promising for obtaining more effective inoculants for these species of green manure.

**Keywords:** Phenotypic characterization; symbiosis; green manure and biological nitrogen fixation.

## Índice de figuras

- Figura 1.** Representação simplificada do material orgânico e das substâncias húmicas presentes no solo .....17
- Figura 2.** Representação do processo de infecção da raiz por rizóbios .....25
- Figura 3.** Fenograma obtido pela análise das características culturais dos isolados de rizóbios simbiotes de diferentes espécies utilizadas como adubo verde.....86

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Relação das espécies de adubo verde e rizóbios utilizados como referência no estudo.....	44
<b>Tabela 2.</b> Atributos químicos do solo utilizado no ensaio em condições controladas de casa de vegetação em vasos com solo não esterilizado.....	46
<b>Tabela 3.</b> Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e nitrogênio da parte aérea total de crotalaria ( <i>Crotalaria juncea</i> L.), inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação utilizando vasos de “Leonard”.....	50
<b>Tabela 4.</b> Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de feijão-de-porco ( <i>Canavalia ensiformes</i> L.) inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação utilizando vasos de “Leonard”.....	53
<b>Tabela 5.</b> Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de guandu ( <i>Cajanus cajan</i> L.), inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação utilizando vasos de “Leonard”.....	55
<b>Tabela 6.</b> Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e nitrogênio da parte aérea total de guandu ( <i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.) inoculado com diferentes estirpes/isolados de rizóbio e índices de eficiência relativa.....	57
<b>Tabela 7.</b> Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de mucuna-preta [ <i>Mucuna aterrima</i> L.(Piper & Tracy) Holland], inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação utilizando vasos de “Leonard”.....	59
<b>Tabela 8.</b> Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de mucuna-cinza [ <i>Mucuna nivea</i> L. (D.C.)] inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação utilizando vasos de “Leonard”.....	61
<b>Tabela 9.</b> Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e nitrogênio total da parte aérea de crotalaria ( <i>Crotalaria juncea</i> L.), inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em vasos com solo não esterilizados.....	63
<b>Tabela 10.</b> Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de feijão-de-porco ( <i>Canavalia ensiformes</i> (L.) D.C.), inoculado com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em vasos com solo não esterilizados.....	65

**Tabela 11.** Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio total da parte aérea de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp. inoculado com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em vasos com solo não esterilizados.....67

**Tabela 12.** Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio total da parte aérea de mucuna-preta [*Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Holland], inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em vasos com solo não esterilizados .....69

**Tabela 13.** Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de mucuna-cinza (*Mucuna nivea* (L.) D.C.) inoculada com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em vasos com solo não esterilizados.....70

**Tabela 14.** Características culturais de isolados de rizóbios nativos de solos de Mato Grosso do Sul e estirpes de rizóbios recomendadas comercialmente para produção de inoculantes para espécies adubo verde. ....82

## Sumário

1. Introdução Geral .....	14
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos Específicos .....	15
3. CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica .....	16
3.1 Espécies vegetais utilizadas como adubo verde .....	16
3.2 Manejo de espécies de adubo verde .....	20
3.2.1 Utilização de adubo verde em consórcios.....	21
3.2.2 Utilização como culturas antecessoras às culturas principais.....	23
3.3 A fixação biológica de nitrogênio em espécies de adubo verde.....	24
3.3.1 Taxonomia de bactérias fixadoras de N <sub>2</sub> (FBN) em espécies de adubo verde .....	27
3.3.2 Contribuição da FBN por espécies de adubo verde.....	30
Referências.....	31
4. CAPÍTULO II: Eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio inoculadas em diferentes espécies de adubo verde .....	40
4.1 Introdução .....	42
4.2 Material e métodos.....	43
4.3 Resultados e discussão .....	47
4.3.1 Condições esterilizadas .....	47
4.3.2 Condições não esterilizadas .....	61
4.4 Conclusões .....	71
Referências.....	72
5. CAPÍTULO III: Diversidade fenotípica de rizóbios nativos de solos do Mato Grosso do Sul isolados de diferentes espécies de adubo verde.....	77
5.1 Introdução .....	79
5.2. Material e métodos.....	80
5.3. Resultados e discussão .....	81
5.4 Conclusão .....	87
Referências.....	88
Considerações finais .....	91
Anexos.....	92

## 1. Introdução Geral

A matéria orgânica do solo desempenha papel fundamental na manutenção dos sistemas agrícolas, melhorando sua estrutura física, química e biológica. A adubação verde é uma opção que vem sendo utilizada principalmente para manter a cobertura do solo, evitando assim maiores desgastes. Além disso, cada espécie pode contribuir de uma forma específica para o sistema, proporcionando inúmeros benefícios para manutenção da fertilidade do solo (PAULUS *et al.*, 2000).

A prática da adubação pode ser uma forma racional e benéfica, pois consiste em introduzir, em um sistema de produção, a espécie apropriada para depositar sobre o solo ou incorporar nele sua massa vegetal, gerando benefícios que se relacionam diretamente com o ganho de matéria orgânica no sistema (MIYASAKA, 1983; WUTKE *et al.*, 2009). As espécies mais utilizadas como adubo verde são as leguminosas da família Fabaceae, por possuírem características que propiciam o uso dessas plantas para esse propósito, como: a grande produção de biomassa, que proporciona cobertura ao solo; o desenvolvimento de raízes profundas que fazem a descompactação dos solos, evitando o uso de arados ou grades e, principalmente, a capacidade de associarem-se simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio (GALVÃO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2009; TEODORO *et al.*, 2011).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo mediado por bactérias que possuem um complexo enzimático denominado nitrogenase. Neste processo, ocorre a transformação do nitrogênio do ar ( $N_2$ ) em estruturas assimiláveis por outros organismos, especialmente os vegetais, por meio de bactérias, principalmente, da ordem Rhizobiales. A FBN em espécies utilizadas como adubo verde é uma alternativa para disponibilizar este nutriente aos sistemas agrícolas, de forma menos poluente ao meio ambiente, ou seja, sem o uso da adubação nitrogenada (YOUNG, 1996; HUNGRIA *et al.*, 2001).

Embora já existam algumas estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio, recomendadas para a produção de inoculantes em adubos verdes no Brasil, muitas vezes, há respostas pouco significativas à inoculação, possivelmente por não se adaptarem as condições de edafoclimáticas de determinada região. Dessa forma, há

necessidade crescente de se obter isolados de rizóbio com alta eficiência simbiótica para as diversas regiões do País.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Caracterizar morfofisiologicamente e selecionar estirpes de rizóbios com elevada eficiência simbiótica para inoculação em diferentes espécies de adubo verde.

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1. Caracterizar morfofisiologicamente isolados de rizóbio pertencentes à Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Agropecuária Oeste simbiontes de diferentes espécies de adubo verde;

2.2.2. Realizar a seleção preliminar de rizóbios isolados de solos do Cerrado de Mato Grosso do Sul com elevada eficiência simbiótica para inoculação em crotalária, feijão-de-porco, guandu, mucuna-preta e mucuna-cinza.

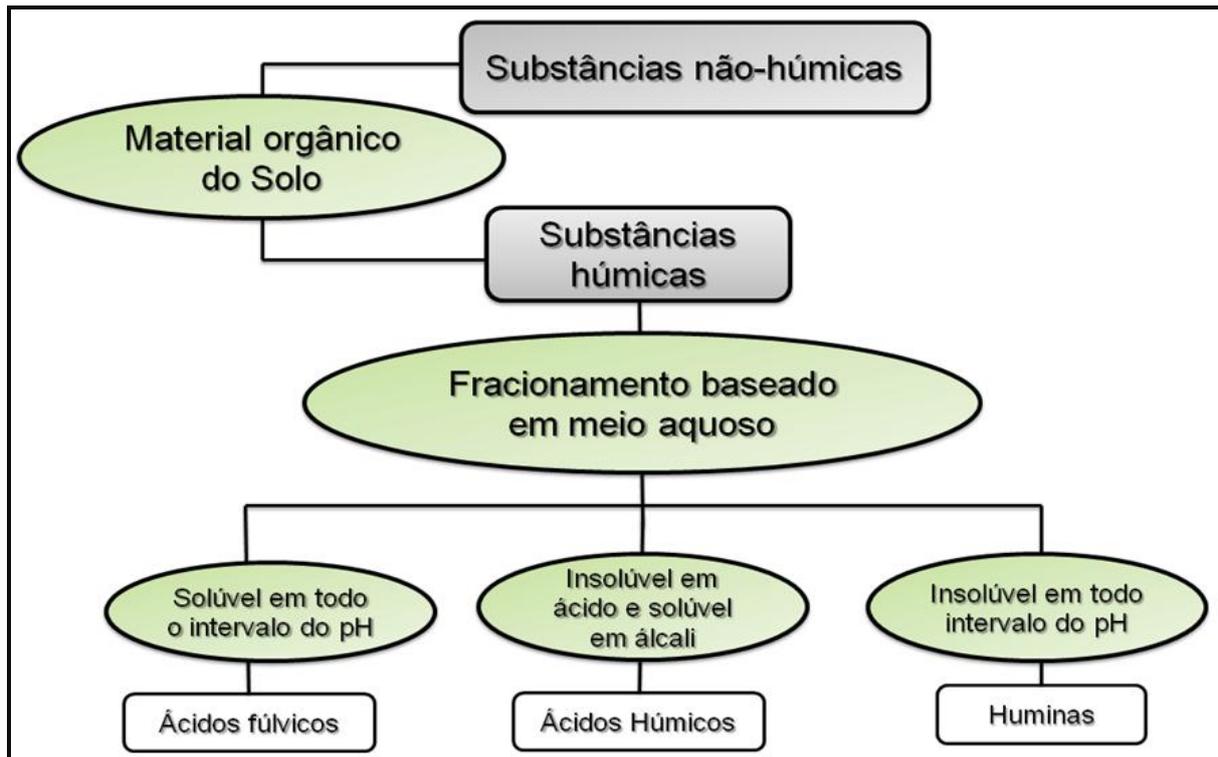
### 3. CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Espécies vegetais utilizadas como adubo verde

A degradação dos solos está associada à perda da sua capacidade em continuar produtivo. A degradação biológica está associada à redução da matéria orgânica do solo. Assim, a degradação química é reflexo da retirada ou saída de nutrientes do solo ou, ainda acúmulo de elementos tóxicos ou desbalanceados que são prejudiciais ao crescimento da planta (OLIVEIRA, 2006; MAZOYER; ROUDART, 2010).

A matéria orgânica presente nos solos consiste em uma mistura de produtos em vários estágios de decomposição (Figura 1), resultantes da degradação química e biológica de resíduos vegetais e animais e da atividade de microrganismos. Neste contexto, os benefícios da adição de compostos à matéria orgânica ao solo devem ser considerados relevantes, pois o incremento e o dinamismo dessa adição beneficiam e melhoram a estrutura do solo, de forma que haja permanência dos nutrientes, diminuindo as perdas por lixiviação. A matéria orgânica é um dos melhores indicadores de qualidade do solo, pois se relaciona com inúmeras propriedades físicas, químicas e biológicas desse sistema (REICHERT *et al.*, 2003).

Há uma técnica bastante utilizada por pequenos produtores e na agricultura orgânica que pode contribuir para esse processo: a adubação verde, um tipo especial de adubação orgânica que consiste em cultivar plantas que podem servir como cobertura do solo até serem decompostas ou incorporadas ao solo (ESPÍNDOLA *et al.*, 2005). Assim, a adubação verde assume um papel de destaque na mitigação e na reversão dos problemas associados ao modelo de agricultura convencional predominante. O uso dessa prática resulta em alterações desejáveis no solo e está sendo reconhecido como alternativa viável para amenizar os impactos negativos causados pela agricultura levando a cultura principal a se beneficiar de tais mudanças. (SAN MARTIN *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Representação simplificada do material orgânico e das substâncias húmicas presentes no solo (Extraído de ROSA, 1998).

Para a adubação verde, tem sido sugerido o uso de leguminosas herbáceas de ciclo anual ou perene, em sistemas de rotação de culturas ou em consórcio com culturas de interesse econômico. Porém, espécies de outras famílias também são utilizadas como adubo verde, formando assim uma diversificação de famílias de plantas. Desta forma, cada espécie é usada com uma finalidade para que possam promover uma melhor exploração da superfície e profundidade do solo, resultando em uma maior reciclagem de nutrientes e rápidas coberturas do solo, que auxiliarão no controle de plantas espontâneas, além de outros atributos (GUILHERME *et al.*, 2007).

Segundo Rossi e Castro (2012), outras características que devem ser levadas em consideração para utilização de espécies de leguminosas para adubação verde são: adaptação a condições adversas, ou seja, suportar estresses hídricos e térmicos; possuírem sistema radicular profundo e bem desenvolvido, que auxiliará principalmente na aeração do solo; produção de grande quantidade de matéria verde e matéria seca, que servirão como cobertura do solo, além de contribuir para

obtenção de incrementos nos teores de nitrogênio na fitomassa e principalmente por apresentarem como particularidade o fato de formar associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio. A fixação biológica de nitrogênio é baseada no fato de que alguns microrganismos, conhecidos como diazotróficos, são capazes de quebrar a ligação que une os dois átomos de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ). Esse elemento é convertido em compostos nitrogenados (amônio ou nitrato) usados em diversos processos químicos e biológicos do solo, importantes para a nutrição de plantas. Se a associação entre estes microrganismos e as plantas forem eficientes são fixadas elevadas quantidades de N contribuindo para a nutrição de alguns vegetais, oferecendo, assim, vantagens econômicas e ecológicas. O exemplo mais conhecido consiste na simbiose de bactérias da ordem Rhizobiales, denominadas rizóbios, com plantas da família Leguminosae, a qual pertencem a soja, o feijão e várias espécies utilizadas como adubo verde (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

Como resultado da simbiose, quantidades expressivas de nitrogênio (N) tornam-se disponíveis após o corte da leguminosa, podendo acarretar autossuficiência em N, contribuindo para a diminuição da utilização de adubos minerais (GUERRA *et al.*, 2007). Os principais efeitos da adubação verde para melhoria da qualidade do solo estão associados a alterações nas propriedades químicas, como, por exemplo, disponibilidade de nutrientes, capacidade de troca de cátions (CTC) efetiva do solo, favorecimento da formação de ácidos orgânicos e aumento do teor de matéria orgânica. As alterações das propriedades físicas e biológicas do solo também podem ocorrer com a prática da adubação verde, além de efeitos sobre a infestação de plantas espontâneas nos sistemas de produção (ANDREOLA; FERNANDES, 2007).

Segundo Minatel *et al.* (2006), os macroporos exercem influência sobre o desenvolvimento das plantas. A diminuição dessas estruturas contribui para a formação de uma camada compacta no solo, aumentando a resistência mecânica à penetração vertical das raízes da maioria das culturas, além de reduzir a infiltração de água. Entretanto, o adubo verde pode ser utilizado como medida biológica para amenizar os efeitos nocivos da compactação do solo, por reduzir a sua resistência à penetração. O sistema radicular desenvolvido provoca desarranjos no solo ao penetrar nas camadas compactadas e, ao sofrer decomposição, deixa canais que

contribuem para a infiltração de água e difusão de gases, melhorando a qualidade física do solo (BENNIE, 1996; FOLONI *et al.*, 2006).

Uma das propriedades químicas do solo que pode ser beneficiada pela adubação verde é a dinâmica da matéria orgânica no solo, que pode ser observada a partir da relação C/N, um indicador importante da decomposição da matéria orgânica do solo, fornecendo informação sobre o estado de humificação. Essa relação é importante para a determinação da competição entre os nutrientes essenciais para a atividade dos microrganismos do solo. Portanto, as leguminosas, de modo geral, possuem capacidade de fixar N atmosférico em simbiose com bactérias pertencentes principalmente, mas não exclusivamente, à ordem Rhizobiales (LUCHESE *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2013).

A presença de material orgânico fornecido pelos adubos verdes favorece a atividade dos organismos do solo, uma vez que seus resíduos servem como fonte de energia e nutrientes. Sagrilo *et al.* (2009) mencionam que a presença de matéria orgânica no solo, fornecida principalmente pelos resíduos dos adubos verdes, servem como fonte de energia e nutrientes para os organismos do solo. As propriedades biológicas do solo estão relacionadas com as formas de vida existentes no mesmo, sendo que o uso da adubação verde exerce efeitos no incremento das atividades dos microrganismos (FERREIRA *et al.*, 2012). A manutenção da cobertura vegetal permite reduzir as oscilações de temperatura e umidade, favorecendo o desenvolvimento e a atividade biológica dos organismos do solo. Do mesmo modo, a sobrevivência dos organismos da fauna edáfica também é beneficiada, uma vez que a manutenção da cobertura vegetal permite reduzir as oscilações térmicas e de umidade do solo. Steffen *et al.* (2007) acrescentam que a fauna edáfica e os microrganismos são partes integrantes do solo, sendo capazes de modificar as características biológicas do ecossistema.

A grande quantidade de biomassa vegetal produzida pelos adubos verdes pode ser incorporada ao solo, contribuindo para o processo de ciclagem de nutrientes e conseqüentemente para a recuperação da fertilidade dos solos (ALCÂNTARA *et al.*, 2000). Porém, essa biomassa produzida pode também ser mantida na superfície do solo, resultando em importantes vantagens como: proteção contra chuvas fortes e erosão, contribuição para a retenção de água no solo,

contribuição para a diminuição da radiação solar e controle de plantas daninhas (CARVALHO *et al.*, 1999).

### **3.2 Manejo de espécies de adubo verde**

Manter a superfície do solo permanentemente coberta por material vegetal em fase vegetativa ou com resíduos é efetivamente o manejo mais recomendado para a proteção do solo. A adubação verde pode ser utilizada de formas diferentes, em vários tipos de manejo, como, por exemplo, a rotação, no plantio consorciado com culturas principais anuais e perenes; em áreas de descanso temporário ou ainda em sucessão, em épocas chuvosas ou em períodos secos (ALVARENGA *et al.*, 1995).

A introdução do adubo verde nos sistemas deve ser prática previamente planejada, considerando as diferentes características das espécies que apresentam potencial para esse fim. Também é preciso levar em consideração a forma de cultivo (consórcio ou antecessoras as culturas principais) e a capacidade produtiva do solo, o qual o adubo verde será plantado. Segundo Barradas (2010), a espécie escolhida deve ser apta ao cultivo na época em que o produtor normalmente deixa suas terras em pousio. Assim, o produtor não estará deixando de obter remuneração da propriedade.

Quando plantados no final do período chuvoso, os adubos verdes podem auxiliar na redução da infestação por plantas daninhas pelo fato de proporcionarem maior cobertura ao solo, caracterizando um efeito físico de controle. A cobertura morta pode interferir na germinação e na taxa de sobrevivência das plântulas de algumas espécies de plantas daninhas (ERASMO *et al.*, 2004). Esse tipo de manejo pode contribuir para uma produção de culturas sem herbicidas.

A partir de trabalhos realizados por Carvalho *et al.* (1999), com manejos de adubos verdes no Cerrado, concluiu-se que a maioria deles, quando plantados no período chuvoso, acumula maior quantidade de biomassa na parte aérea, devido à maior disponibilidade de água. Conseqüentemente, eles apresentam potencial mais elevado para fornecer esses nutrientes à cultura que será implantada posteriormente. Essa forma de manejo contribui para a redução do uso de

fertilizantes, principalmente os nitrogenados. Os pesquisadores ainda ressaltam que a maior produção de biomassa vegetal é produzida em períodos chuvosos, a cultura principal atinge altos níveis de produtividade também na época das chuvas, então, os adubos verdes devem ser semeados em consócio no período chuvoso e solteiros na entressafra. O cultivo nessas condições pode ser vantajoso, uma vez que essas plantas podem restituir quantidades consideráveis de nutrientes aos cultivos e absorver nutrientes das camadas subsuperficiais do solo, liberando-os posteriormente, na camada superficial, pela decomposição dos seus resíduos (DUDA *et al.*, 2003).

No período seco, a decomposição dos resíduos de adubos verdes é mais lenta. No estudo realizado por Santos *et al.* (2009), no qual foi avaliada a taxa de decomposição e liberação de nutrientes de duas espécies utilizadas como adubo verde, o labe-labe (*Dolichos lab lab* L.) e o feijão-de-porco [*Canavalia ensiformes* (L.) D.C.], foi mencionado que a decomposição do feijão-de-porco é mais lenta, devido à estrutura mais lenhosa de seus resíduos.

A adubação verde vem sendo utilizada também na recuperação de áreas degradadas, pois a falta de matéria orgânica representa um dos principais problemas em áreas sob recuperação. Assim, o plantio de leguminosas arbóreas de crescimento rápido é capaz de formar, em curto prazo, uma boa cobertura vegetal, sendo uma prática viável para o processo de restauração ambiental (LONGO, 2011). Nesse cenário de degradação ambiental, a adubação verde é uma alternativa potencial para que mais rapidamente se dê a recolonização vegetal da área, pelo restabelecimento das propriedades do solo (MOREIRA, 2004).

### **3.2.1 Utilização de adubo verde em consórcios**

Estudos recentes têm demonstrado que sistemas de produção baseados em rotação de culturas, consórcios e integração lavoura-pecuária, apresentam algumas vantagens quando comparados aos cultivos solteiros e monoculturas. Assim, muitos produtores rurais optam por plantar os adubos verdes em consócio para aumentar o aporte de nitrogênio no solo (TELHADO, 2007).

A prática de consórcio com culturas de interesse econômico baseia-se, principalmente, na semeadura da espécie destinada a servir como adubo verde na entrelinha da cultura de interesse econômico, não havendo redução da área plantada. Esse sistema é utilizado, principalmente, em pequenas propriedades, onde o solo precisa ser usado de forma intensiva, visando a produção de uma cultura que garanta renda para o produtor e produção da massa vegetal para a adubação verde (NEVES, 2007).

Contudo, a utilização do consórcio possibilita a pronta disponibilidade de N para a cultura principal no momento do corte da leguminosa. Neste caso, a cultura principal beneficia-se do N<sub>2</sub> fixado pela leguminosa, seja pela excreção direta de compostos nitrogenados e pela decomposição dos nódulos e raízes, ou mais intensamente pelo corte da parte aérea da leguminosa, que irá se decompor e liberar nutrientes durante o desenvolvimento da cultura principal (LEAL, 2006). Como exemplo desse tipo de associação, destaca-se a cultura do milho consorciada com o feijão-de-porco. No trabalho de Collier *et al.* (2011), foi avaliado o potencial do consórcio de milho e feijão-de-porco como alternativa de cultivo sob plantio direto. Estes autores avaliaram ainda o acúmulo de macronutrientes no solo e concluíram que essa leguminosa associada ao milho gerou benefícios ao sistema, entre eles, a diminuição da acidez do solo. Essa técnica é importante tanto para a disponibilização imediata de nutrientes, quanto para a cultura sucessora. A técnica de consórcio tem como finalidades o controle das plantas espontâneas, a proteção e adubação do solo, assim como menor variação da temperatura e da umidade do solo, proporcionando ambiente adequado ao crescimento de organismos benéficos às culturas de valor econômico.

Em estudos de Mercante *et al.* (2012), foi avaliado o rendimento de grãos de milho cultivado em consórcio com adubos verdes sob condições de baixa aplicação de insumos, em dois locais diferentes, os resultados mostram que o consórcio de milho com guandu, crotalária e feijão-de-porco, de maneira geral, mostraram-se superiores ao monocultivo, sendo esta, uma importante prática para a produção de grãos e utilização de manejos que contribuem para a conservação do solo.

O consórcio de adubos verdes com culturas perenes é uma modalidade de manejo, onde o adubo verde é cultivado entre as linhas de plantas perenes. Uma

das principais vantagens da adoção dessa prática está relacionada à formação de uma cobertura viva permanente, sem que haja necessidade de novos plantios a cada ano. A proteção do solo contra as chuvas, o controle de ervas, a recuperação de nutrientes que se encontram em camadas profundas e o enriquecimento do solo, principalmente com nitrogênio, que é um dos nutrientes mais usados pelas plantas são as principais vantagens que adubação verde pode proporcionar ao solo (ESPÍNDOLA *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm sido conduzidos com diferentes consórcios, como exemplo, nos trabalhos de Gama-Rodrigues (2007), foram estimadas as taxas de decomposição e liberação de nutrientes de resíduos culturais provenientes de plantas de cobertura na cultura do maracujá e verificou-se que as coberturas vegetais apresentaram distintas taxas de decomposição e liberação de nutrientes para o solo. Araújo e Balbino (2007) avaliaram a época de máxima produção de fitomassa pelo guandu, visando a antecipar o manejo do adubo verde para reduzir a competição. Segundo Carvalho *et al.* (1999), o uso de adubos verdes consorciados com culturas perenes pode trazer uma série de vantagens, que devem refletir-se no rendimento e na qualidade do produto final das culturas, além de contribuir para a redução dos custos de produção.

### **3.2.2 Utilização como culturas antecessoras às culturas principais**

A utilização de adubos verdes aliada à sucessão de culturas contribui para a adição regular de resíduos de adubos verdes aos vários solos e ambientes, e está sendo considerada uma prática cada vez mais usual. O cultivo de diferentes espécies de plantas de cobertura possibilita a melhoria e a conservação do solo e da matéria orgânica, além de promover consideráveis aumentos de rendimento nas culturas subsequentes e apresentar, também, significativa viabilidade econômica (LÁZARO *et al.*, 2013).

Os adubos verdes podem ser plantados logo após a colheita da cultura principal, assim, servem como cobertura viva, e, posteriormente, com o acúmulo de palhada, beneficiam o sistema de semeadura direta, por exemplo. Essa prática

desempenha um papel fundamental na ciclagem de nutrientes, tanto daqueles adicionados por meio de fertilizantes minerais e não aproveitados pelas culturas comerciais, quanto daqueles provenientes da mineralização da matéria orgânica do solo (TORRES *et al.*, 2008).

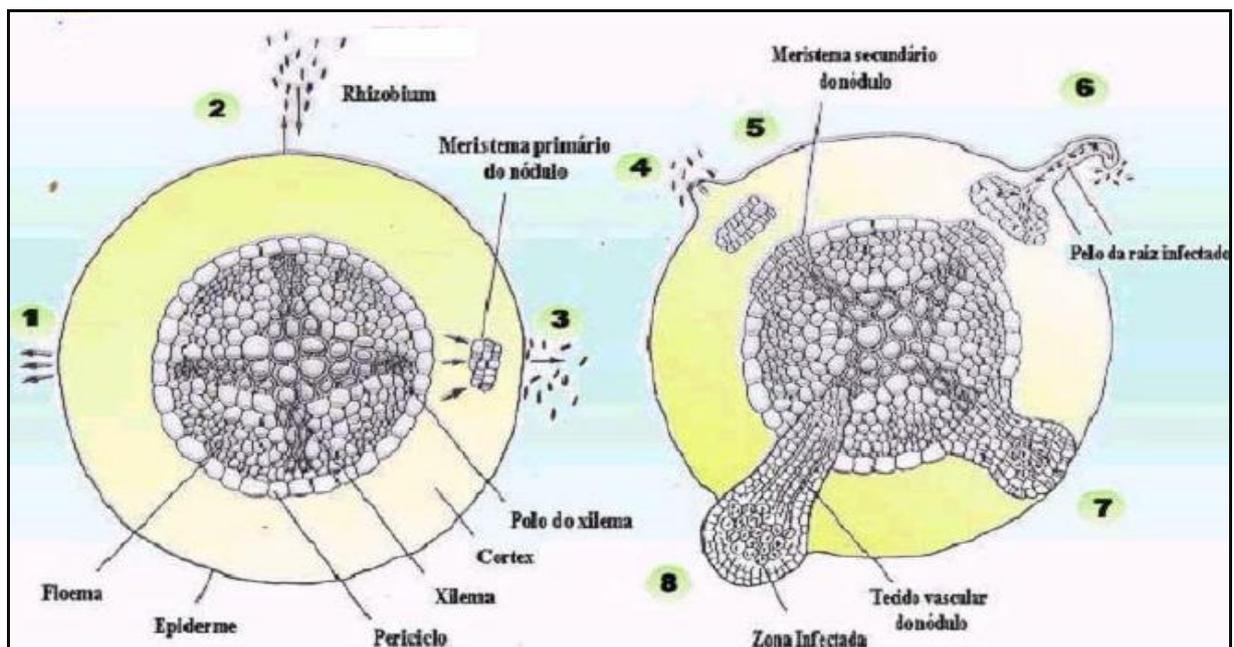
Quanto à disponibilização de nutrientes, principalmente o N, para a cultura principal, existem várias formas de utilização de leguminosas como fonte de N para o solo. A forma mais comum é a sua utilização em pré-cultivo, em que o adubo verde precede a cultura principal, que se beneficia posteriormente com a mineralização deste nutriente (CASTRO *et al.*, 2004). Segundo Séguy *et al.* (1997) a mineralização acelerada, provocada por condições tropicais úmidas, pode comprometer essa prática, limitando o fornecimento de N em virtude das altas temperaturas e umidade excessiva. Se a cultura sucessora não tem sua demanda sincronizada com a mineralização do N do adubo verde, perdas significativas podem ocorrer e tornar a prática ineficiente como alternativa de adubação.

### **3.3 A fixação biológica de nitrogênio em espécies de adubo verde**

O nitrogênio é um nutriente de importância fundamental para todos os seres vivos. Na natureza, esse elemento é encontrado em 78 % da composição da atmosfera terrestre, na forma gasosa (N<sub>2</sub>), não sendo disponível para a maioria dos vegetais (CARVALHO; ZABOT, 2012).

Apesar de se conhecer três tipos de fixação de N<sub>2</sub> na atmosfera, a biológica (Figura 2) ainda é a principal forma, seguida da industrial e por descargas elétricas. A estimativa é que cerca de 70% do total de N introduzido nos sistemas agrícolas do mundo seja devido à fixação biológica (REIS *et al.*, 2006). O processo biológico de transformação do nitrogênio atmosférico elementar (N<sub>2</sub>) em compostos assimiláveis pelas plantas ocorre devido a um processo de associação simbiótica entre plantas da família Fabaceae e microrganismos pertencentes, principalmente, mas não exclusivamente, à ordem Rhizobiales. Essa é uma das principais características que algumas leguminosas utilizadas como adubo verde possuem (FERREIRA *et al.*, 2013).

A associação simbiótica rizóbio-leguminosa é mediada por uma troca de sinais moleculares entre as partes, através de liberações de determinados compostos, como por exemplo, flavonóides, exsudados pelas plantas, que facilitam a aderência nas raízes, desencadeando o processo de nodulação, a partir da ativação de genes específicos no microrganismo (HUNGRIA, 1994; MERCANTE *et al.*, 2002). Após a liberação dos compostos, há o encurvamento do pelo radicular provocado por moléculas liberadas pelas bactérias. As enzimas bacterianas degradam parte da parede celular e permitem a entrada da bactéria no pelo radicular; em seguida, forma-se o cordão de infecção que vai em direção ao córtex da raiz; as células do córtex dividem-se e as bactérias são liberadas no citoplasma e estimulam a divisão de algumas células, levando-as à proliferação dos tecidos, formando o nódulo maduro. A partir disso, inicia-se o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) graças a um complexo enzimático denominado nitrogenase, onde a planta recebe o nitrogênio fixado; em troca, a planta fornece carboidratos à bactéria (MERCANTE *et al.*, 2002; RIBEIRO JUNIOR; RAMOS, 2006).



**Figura 2.** Representação do processo de infecção da raiz por rizóbios (Extraído de VILAS BÔAS; MOREIRA, 2012).

A associação simbiótica entre rizóbio-leguminosa, além de representar um processo de grande importância para o meio ambiente, é responsável pela

incorporação de quantidades consideráveis do N atmosférico, em sistemas agrícolas (SANTOS *et al.*, 2007). Atualmente, a produtividade está cada vez mais aliada à sustentabilidade. Para que os sistemas sejam sustentáveis em longo prazo, é necessário repor as reservas de nutrientes que são removidos. No caso do nitrogênio, as entradas para os sistemas agrícolas podem estar sob a forma de fertilizantes nitrogenados, ou através da fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico, principalmente. Portanto, o uso de adubos verdes, capazes de realizar a FBN eficientemente, pode representar contribuições consideráveis nos sistemas de produção, principalmente por reduzir a necessidade da aplicação de N sintético nos sistemas (BODDEY *et al.*, 1994; PEOPLES *et al.*, 1995). Neste sentido, a capacidade de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio é o principal benefício decorrente do uso de espécies leguminosas como adubo verde.

De maneira geral, as leguminosas utilizadas como adubo verde possuem baixa especificidade hospedeira, podendo ser nodulada por rizóbios de crescimento rápido e lento, porém, a FBN bem sucedida depende da seleção e especificidade simbiótica na interação entre o rizóbio e a planta hospedeira (HARTWIG, 1998). As estirpes recomendadas comercialmente para essas espécies de leguminosas, utilizadas como adubo verde foram selecionadas há vários anos e são as mesmas recomendadas para outras culturas (LIMA, 2009). Diversos estudos têm sido realizados para a seleção de novas estirpes de rizóbios para estas espécies. Em trabalhos com estirpes recomendadas comercialmente para feijão-de-porco, caupi e guandu, Barreto e Fernandes (1998), e Fernandes (2000) e Fernandes *et al.* (2003) observaram que a inoculação nas sementes não tem resultado em incrementos no crescimento vegetativo, nos teores de N na planta e nem na nodulação das raízes em solos dos Tabuleiros Costeiros de Sergipe, mostrando a necessidade de buscar novos isolados que apresentam eficiência simbiótica elevada, pois o solo existente naquela região apresenta altos teores de Alumínio (Al), caracterizando acidez do solo. Estes autores relatam que as estirpes contidas nos produtos comerciais não respondem positivamente à inoculação, por não se adaptarem às condições edafoclimáticas da região.

### 3.3.1 Taxonomia de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> (FBN) em espécies de adubo verde

A diversidade fenotípica das bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> pode ser estudada a partir de avaliações das características culturais dos isolados. Segundo Santos *et al.* (2007), o estudo da diversidade das bactérias envolve parâmetros, como o tempo que as bactérias levam para formar colônias individuais em meio de cultura, o diâmetro das colônias, a forma, a cor e a produção de muco. Esses métodos fenotípicos de análise de características culturais de microrganismos são utilizados nas primeiras etapas da identificação de um isolado e são considerados extremamente úteis (NÓBREGA *et al.*, 2004). Características como testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, simbióticos, taxa de crescimento em meio de cultura que contém manitol, habilidade em utilizar fontes de carbono, capacidade de nodular leguminosas hospedeiras, dentre outros, são, tradicionalmente, utilizadas para classificar espécies de rizóbios distintas. Porém, a posterior identificação genética e molecular é necessária para identificar a posição taxonômica dos isolados (CHUEIRE *et al.*, 2003).

As características culturais das bactérias fixadoras de nitrogênio estão relacionadas com a sua sobrevivência no solo; o crescimento rápido parece conferir certa vantagem competitiva na rizosfera. Alguns trabalhos mostram que, em regiões áridas onde a característica predominante do solo é a acidez, os rizóbios com crescimento rápido aparecem com mais frequência (NORRIS, 1965; SPRENT 1994; FIGUEIREDO *et al.*, 1996). Medeiros *et al.* (2009), em estudos com morfofisiologia de rizóbios, concluíram que há uma elevada diversidade morfológica na população nativa de rizóbio nas regiões semi-áridas. Esses autores ainda relataram que o meio com que elas se utilizam para adaptar-se a essas condições é a produção de muco, que também está associada à resistência a altas temperaturas (OSA-AFIANA; ALEXANDER, 1982). Martins *et al.* (1997a), analisando as características culturais de isolados de rizóbios que nodulam caupi provenientes de solos do nordeste do Brasil, observaram que um grupo formado por 27 isolados de rizóbios nativos apresentaram crescimento rápido, embora essa espécie de leguminosa seja comumente nodulada por *Bradyrhizobium* sp.

Uma das características que se observa na avaliação morfofisiológica de rizóbios é a alteração de pH do meio de cultura com indicador, podendo ser separados em três tipos: rizóbios que alcalinizam o meio, os que acidificam e os que não alteram o pH do meio YMA com azul de bromotimol. Martins *et al.* (1997b) associam essas características ao crescimento das bactérias; esses autores relatam que os rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio de cultura, causando uma mudança de cor para azul, enquanto que os rizóbios de crescimento rápido acidificam o meio, mudando sua cor para amarelo.

Melloni *et al.* (2006), em estudos sobre a diversidade de bactérias que nodulam leguminosas e fixam N<sub>2</sub> atmosférico em solos de áreas de mineração de bauxita, utilizaram caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) como plantas-isca. Os autores observaram a ocorrência de bactérias com características culturais semelhantes às da estirpe de *Bradyrhizobium*, apresentando crescimento lento e caráter alcalinizante. Chagas Junior *et al.* (2010), estudando a caracterização fenotípica de rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia que nodulam caupi, observaram que estes isolados apresentaram diversidade quanto às características morfológicas e fisiológicas avaliadas. Esses autores relatam ainda que a caracterização morfofisiológica possibilitou um maior conhecimento da população de rizóbio daqueles solos.

Segundo Vieira (2007), os estudos de identificação de rizóbios têm como ponto de partida os estudos realizados em 1988, os quais se tratavam de estudos com microrganismos que nodulavam raízes de leguminosas, denominados inicialmente como *Rhizobium leguminosarum*. A princípio, esta bactéria era responsável por toda a FBN em leguminosas (FRANK, 1889; VIEIRA, 2007).

De acordo com essa classificação inicial, havia apenas um gênero, *Rhizobium*, dentro do qual foram reconhecidas seis espécies, *Rhizobium leguminosarum* (nodula *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* e *Lens*), *R. trifolii* (*Trifolium*), *R. phaseoli* (*Phaseolus*); *R. meliloti* (*Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*), *R. japonicum* (*Glycine max*) e *R. lupini* (*Lupinus*) (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999).

Löhnis e Hansen (1921) propuseram a divisão em dois grupos de rizóbios, de acordo com as características culturais apresentadas por essas bactérias: as de crescimento rápido e as de crescimento lento. Já em 1984, dois gêneros foram

descritos, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, sendo este último englobando todas as estirpes de crescimento lento. Posteriormente, as pesquisas com o genoma dos rizóbios foi possível perceber que havia diferenças de fato (VIEIRA, 2007).

A divisão dos grupos de rizóbios inicialmente baseava-se em características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular algumas leguminosas, porém essas técnicas vêm sendo substituídas por métodos que se apóiam em características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares e particularmente nas últimas duas décadas, as técnicas de biologia molecular baseadas no gene ribossomal 16S, vêm ganhando um espaço crescente nos estudos de taxonomia, competitividade e ecologia de rizóbio (BATISTA *et al.*, 2007).

Atualmente, com o avanço da taxonomia moderna e a grande biodiversidade encontrada nos solos, a tendência é que novas bactérias sejam identificadas. Como resultado do nível elevado de informação proporcionado por análises, há dez anos, estavam definidas quatro famílias (*Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*), seis gêneros (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), mais de 30 espécies e vários biovares, todos na ordem Rhizobiales (CHUEIRE *et al.*, 2003). Hoje, o gênero *Rhizobium* apresenta 33 espécies descritas (RIVAS *et al.*, 2009), o gênero *Bradyrhizobium* possui oito espécies descritas, que inclui espécies utilizadas para a fabricação de inoculantes para soja (*Glycine max*).

De maneira geral, a classificação atual dos rizóbios é definida como: Domínio: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Classe: *Alphaproteobacteria*; Ordem: *Rhizobiales*; com a distribuição nas famílias *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae* e *Rhizobiaceae*. Com estudos avançados de taxonomia, identificaram-se algumas espécies de rizóbios eficientes na simbiose com diversas leguminosas utilizadas como adubo verde, dentre elas estão: *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. e *Bradyrhizobium elkanii* (RIBEIRO, 2011; MERCANTE *et al.*, 2014).

A identificação de estirpes mais eficientes no processo de FBN possui uma grande importância nas pesquisas brasileiras. No Brasil, a Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE), que é uma associação, criada em

1998 com sede em Londrina, no estado do Paraná, tem como objetivo propor tecnologias de uso, produção e divulgação de inoculantes, além de sugerir ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) as normas técnicas para recomendação de estirpes de rizóbios ou outros microrganismos para produção de inoculantes, baseadas em dados de pesquisa apresentados e aprovados em suas assembleias. A RELARE também pode propor e subsidiar, quando for o caso, a legislação e as normas de fiscalização dos inoculantes junto ao MAPA (HUNGRIA *et al.*, 2014; MERCANTE *et al.*, 2014).

### 3.3.2 Contribuição da FBN por espécies de adubo verde

A FBN é, depois da fotossíntese, o processo biológico mais importante no planeta, sendo fundamental para a vida na Terra (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Inúmeros trabalhos têm sido conduzidos a respeito da contribuição desse processo para a incorporação de N via fixação biológica em solos com adubo verde, tanto em cultivos isolados como em consórcios (BODDEY *et al.*, 1997; SHARMA *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2003; AMBROSANO *et al.*, 2011).

Dentre as técnicas utilizadas para quantificar a FBN em condições de campo, a diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  é vista como uma das mais confiáveis, uma vez que, se cuidadosamente utilizada, ela permite estimar a proporção do N da planta que foi obtido via FBN durante todo o ciclo da cultura (VIEIRA-VARGAS *et al.*, 1995). Embora essa técnica possa ser empregada baseando-se apenas em variações na abundância natural em  $^{15}\text{N}$ , o seu uso em trabalhos de pesquisa ainda é limitado no Brasil, já que são necessários equipamentos caros e com elevado grau de precisão (PERIN *et al.*, 2004). Com essa técnica, é possível saber a quantidade de N que está sendo fornecida ao sistema via FBN. Perin *et al.* (2004) avaliaram o acúmulo de nutrientes e a FBN por adubos verdes em cultivos isolados e consorciados e observaram que o feijão-de-porco [*Canavalia ensiformes* (L.) D.C.] foi capaz de incorporar ao solo, via FBN, cerca de 173 kg/ha de N. Esses autores concluíram que esta pode ser uma excelente estratégia de fornecimento de N ao solo.

Ambrosano *et al.* (1997) e Ambrosano *et al.* (2003) realizaram trabalhos para avaliar a técnica de marcação dos adubos verdes *Crotalaria juncea* (L.) e *Mucuna*

*aterrima* (Piper & Tracy) com  $^{15}\text{N}$  para estudos de dinâmica do nitrogênio no ambiente. Os autores concluíram que é possível utilizar o material marcado para estudos de dinâmica do nitrogênio no solo.

Em estudos com sistemas de aleias no Rio de Janeiro, Oliveira *et al.* (2006) relataram que a FBN pôde contribuir com  $72 \text{ kg ha}^{-1}$  de N, do total de  $159 \text{ kg ha}^{-1}$  de N aportados ao sistema por meio do guandu cultivados em aleias no Rio de Janeiro.

A contribuição da FBN por leguminosas arbóreas utilizadas como adubos verdes, como o guandu, pode ser verificada no trabalho de Dakora e Keya (1997). Segundo esses autores, espécies arbóreas como o guandu podem fixar de 44 a  $581 \text{ kg ha}^{-1}$  de N no sistema.

## Referências

ALCÂNTARA, F. A.; NETO, A. E. F.; PAULA, M. B.; MESQUITA, H. A.; MUNIZ, J. A. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um Latossolo Vermelho Escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.277-288, 2000.

ALVARENGA, R. C.; COSTA, L. M.; MOURA FILHO, W.; REGAZZI, A. J. Características de alguns adubos verdes de interesse para a conservação e recuperação de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.175-185, 1995.

AMBROSANO, E. J.; TRIVELIN, P. C. O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G. M. B.; SCHAMMASS, E. A.; MURAOKA, T.; ROSSI, F. Aproveitamento do nitrogênio-15 da adubação verde e do sulfato de amônio pela soqueira da cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, v.68, p.361-368, 2011.

AMBROSANO, J. E.; TRIVELIN, P. C. O.; CANTARELLA, H.; ROSSETO, R. MURAOKA, T.; BENDASSOLI, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; TAMISSO, L. G.; VIEIRA, F. C.; PRADA NETO, I. Nitrogen-15 labeling of *Crotalaria juncea* green manure. **Scientia Agricola**, v.60, p.181-184, 2003.

AMBROSANO, J. E.; TRIVELIN, P. C. O.; MURAOKA, T. Técnica para marcação dos adubos verdes *crotalaria juncea* e *mucuna-preta* com  $^{15}\text{N}$  para estudos de dinâmica do nitrogênio. **Bragantia [on-line]**, v.56, 1997.

ANDREOLA, F. e FERNANDES, S. A. P. Microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas. In: SILVEIRA, A. P. D. e FREITAS, S. S. **Microbiota e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007, p.21-39.

ARAÚJO, J. B. S. e BALBINO, M. S. Manejo de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) sob dois tipos de poda em lavoura cafeeira. **Coffee Science**, v.2, p.61-68, 2007.

- BARRADAS, C. A. A. **Adubação verde**. Niterói: Programa Rio Rural, 2010. 10p. (Secretaria de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento. Manual Técnico, n.25).
- BARRETO, A. C. e FERNANDES, M. F. Recomendação de leguminosas para adubação verde em solos dos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.835-842, 2003.
- BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. **Microbial Ecology**, v.2, p.270-284, 2007.
- BENNIE, A. T. P. Growth and mechanical impedance. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A. e KAFKAFI, U. (Ed.). **Plant roots**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.453-470.
- BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas utilizando o isótopo <sup>15</sup>N. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa Arroz e Feijão, 1994. p.471-494.
- BODDEY, R. M.; SÁ, J. C. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.787-799, 1997.
- CARVALHO, A. M.; BURLE, M. L., PEREIRA, J.; SILVA, M. A. **Manejo de adubos verdes no Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999. 28p. (Embrapa Cerrados. Circular Técnica, n.4).
- CARVALHO, N. L. e ZABOT, V. Nitrogênio: nutriente ou poluente? **Revista eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.6, p.960-974, 2012. Disponível em: <<http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/reget/index>>. Acessado em: 13 jan. 2014.
- CASTRO, M. C.; ALVES, B. J. R.; ALMEIDA, D. L. A.; RIBEIRO, R. L. D. R. Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.779-785, 2004.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, p.161-169, 2010.
- CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J., PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 833-840, 2003.

COLLIER, L. S.; KIKUCHI, F. Y.; BENÍCIO, L. P. F.; SOUSA, S. A. Consórcio e sucessão de milho e feijão-de-porco como alternativa de cultivo sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.41, p.306-313, 2011.

DAKORA, F. D; KEYA, S. O. Nitrogen fixation in sustainable agriculture: the African experience. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.809-818, 1997.

DUDA, G. P.; GUERRA, J. G. M.; MONTEIRO, M. T.; DE-POLLI, H.; TEIXEIRA, M. G. Perennial herbaceous legumes as live soil mulches and their effects on C, N and P of the microbial biomass. **Scientia Agricola**, v.60, p.139-147, 2003.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas**. Londrina: Editora Planta, 2006. 403p.

ERASMO, E. A. L.; AZEVEDO, W. R.; SARMENTO, R. A.; CUNHA, A. M. e GARCIA, S. L. R. Potencial de espécies utilizadas como adubo verde no manejo integrado de plantas daninha. **Planta Daninha**, v.22, p.337-342, 2004.

ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. Uso de leguminosas para a adubação verde. In: AQUINO, A. M. e ASSIS, R. L. (Ed.). **Agroecologia: Princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p.435-451.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES R. P. M.; HUNGRIA M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.835-842, 2003.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de Tabuleiros Costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.321-327, 2000.

FERREIRA, E. P. B.; MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M. MENDES, I. C.; ARAÚJO, J. L. S.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ARAÚJO, A. P. Contribuições para a melhoria da eficiência da fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro comum no Brasil. **Tópicos em ciência do solo**, v.8, p.251-291, 2013.

FERREIRA, L. E. F.; SOUZA, E. P.; CHAVES, A. F. Adubação verde e seu efeito sobre os atributos do solo. **Revista Verde**, v.7, p.33-38, 2012.

FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; MEDEIROS, R.; SANTOS, C. E. R. S. Efeito da adubação com diferentes relações potássio/magnésio no jacatupé em latossolo amarelo com e sem inoculação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.20, p.49-54, 1996.

FOLONI, J. S. S.; LIMA, S. L.; BÜLL, L. T. Crescimento aéreo e radicular da soja e de plantas de cobertura em camadas compactadas de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.49-57, 2006.

FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der leguminosum. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v.7, p.332-346, 1889.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; SANTOS, I. C. Adubação orgânica. **Revista Cultivar**, v.2, p. 38-41, 1999.

GAMA-RODRIGUES, A. C.; GAMA-RODRIGUES, E. F.; BRITO, E. C. Decomposição e liberação de nutrientes de resíduos culturais de plantas de cobertura em argissolo vermelho-amarelo na região noroeste fluminense (RJ). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1421-1428, 2007.

GUERRA, J. G. M.; NDIAYE, A.; ASSIS, R. L.; ESPINDOLA, J. A. A. Uso de plantas de cobertura na valorização de processos ecológicos em sistemas orgânicos de produção na região fluminense. **Revista Agrícolas**, v.4, p.38-50 2007.

GUILHERME, D. O.; COSTA, C. A.; MARTINS, E. R.; SAMPAIO, R. A.; TELES FILHO, S. C.; CAVALCANTI, T. F. M.; MENEZES, J. B. C.; COELHO, D. A. P.; FERNANDES, S. G.; MAIA, J. T. L. S. Utilização de coquetel de plantas usadas na adubação verde na melhoria das condições físicas e químicas do solo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.7, p.1445-1448, 2007.

HARTWIG, U. A. The regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v.1, p.92-120, 1998.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p.339-364, 1994.

HUNGRIA, M.; CAMPO, J. R.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S.; MERCANTE, F. M. Estatuto social. In: XVI Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, 2014, Londrina. **Anais...** Londrina, PR: Embrapa Soja (Embrapa Soja. Documentos, n. 350), 2014, p. 9-17.

LÁZARO, R. L.; COSTA, A. C. T. SILVA, K. F. SARTO, M. V. M.; DUARTE JÚNIOR, J. B. Produtividade de milho cultivado em sucessão à adubação verde. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, p.10-17, 2013.

LEAL, M. A. A. **Produção e eficiência agrônômica de compostos obtidos com a palhada de gramínea e leguminosa para o cultivo de hortaliças orgânicas**. 2006. 133p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropódica.

- LIMA, A. A. **Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna**. 2009. 92p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- LÖHNIS, F. e HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **Journal of Agricultural Research**, v.20, p.543-556, 1921.
- LONGO, R. M.; RIBEIRO, I. A.; MELO, W. J. Uso da adubação verde na recuperação de solos degradados por mineração na floresta amazônica. **Bragantia**, v.70, p.139-146, 2011.
- LUCHESE, E. B.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E.; **Fundamentos da química do solo – Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2002. 159p.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa Nº 13, de 24/03/2011. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/>>. Acesso em 29/05/2014.
- MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east Region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29 p.1005-1010, 1997a.
- MARTINS, L. M. V.; RANGEL, F. W.; XAVIER, G. R.; RIBEIRO, J. R. A.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.333-339, 2003.
- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R., NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1997b. 14p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, n.19).
- MAZOYER, M. e ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo. Do neolítico à crise contemporânea**. São Paulo: Editora Unesp, 2010. 567p.
- MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R. O. e BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, p.529-535, 2009.
- MENOLLI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. A 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**, v.30, p. 235-246, 2006.

MERCANTE, F. M.; GOI, S. R.; FRANCO, A. A. A importância dos compostos fenólicos na interação entre espécies de leguminosas e rizóbio. **Ciência da Vida**, v.22, p.68-81, 2002.

MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B.; ANDRADE, D. S. Fixação biológica de nitrogênio em adubos verdes. In: LIMA FILHO, O. F.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F. CARLOS, J. A. D. (Ed.) **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e prática**. Viçosa: UFV, 2014. p.308–334.

MERCANTE, F. M.; SILVA, R. F.; RICHETTI, A.; PEZARICO, C. R. **Rendimento de grãos de milho cultivado com adubos verdes sob condições de baixa aplicação de insumos**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2012. 22p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n.61).

MINATEL, A. L. G.; ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F.; NATALE, W. Efeitos da subsolagem e da adubação verde nas propriedades físicas do solo em pomar de citros. **Engenharia Agrícola**, v.26, p.86-96, 2006.

MIYASAKA, S. **Adubação orgânica, adubação verde e rotação de culturas do Estado de São Paulo**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 109p.

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

MOREIRA, P. R. **Manejo do solo e recomposição da vegetação com vistas a recuperação de áreas degradadas pela extração de bauxita, poços de caldas, MG**. 2004. 139p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro.

NEVES, I. P. **Adubação verde**. Salvador: Rede de Tecnologias da Bahia (RETEC), 2007. 21p.

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.269-279, 2004.

NORRIS, D. O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, v.22, p.143-166, 1965.

OLIVEIRA L. A. A. **Degradação das pastagens no município de Lima Duarte - métodos viáveis de recuperação, formação e manutenção - Um debate na educação do CEFET de Rio Pomba**. 2006. 167p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, F. L.; GUERRA, J. G. M.; JUNQUEIRA, R. M.; SILVA, E. E.; OLIVEIRA, F. F.; ESPINDOLA, J. A. A.; ALMEIDA, D. L.; RIBEIRO, R. L. D.; URQUIAGA, S.

Crescimento e produtividade do inhame cultivado entre faixas de guandu em sistema orgânico. **Horticultura Brasileira**, v.24, p. 53-58, 2006.

OSA-AFIANA, L. O.; ALEXANDER, M. Clays and survival of *Rhizobium* during desiccation. **Soil Science Society of America Journal**, v.46 p.285-288, 1982.

PAULUS, G.; MÜLLER, M. A.; BARCELLOS, L. A. R. **Agroecologia aplicada: práticas e métodos para uma agricultura de base ecológica**. Porto Alegre: EMATER/RS, 2000. 86 p.

PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.E; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production?. **Plant and Soil**, v.174, p.3-28, 1995.

PERIN, A.; SANTOS, R. H. S.; URQUIAGA, S.; GUERRA, J. G. M.; CECON, P. R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 35-40, 2004.

REICHERT, J. M.; REINERT, D. J.; BRAIDA, J. A. Qualidade dos solos e sustentabilidade dos sistemas agrícolas. **Ciência e Ambiente**, v. 27, p. 29-48, 2003.

REIS, V. M. OLIVEIRA, A. L. M; BALDANI V. L.D; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, p.154-194.

RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. e RAMOS, M. L. G. Fixação biológica de nitrogênio em espécies para adubação verde. In: CARVALHO, A. M. e AMABILE, R. F. (Ed.). **Cerrado: Adubação verde**. Planaltina: Embrapa Cerrados; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006, p.171-209.

RIBEIRO, R. A. **Taxonomia e filogenia molecular de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2011. 91 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RIVAS, R.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. **Microbiology Insights**, v.2, p. 39-37, 2001.

ROSA, A. H. **Desenvolvimento de metodologia para extração de substâncias húmicas de turfa utilizando-se hidróxido de potássio**. 1998. 99p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” - Instituto de Química da UNESP, Araraquara.

ROSSI, G. e CASTRO, P. R. C. **Ecofisiologia dos Adubos Verdes**. Piracicaba: USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - DIBD, 2012. 70p.

SAGRILO, E. L.; LEITE, F. C.; GALVÃO, S. R. S.; EVANIELLE, F. L. **Manejo Agroecológico do Solo: os Benefícios da Adubação Verde**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2009. 24p. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, n.16).

SAN MARTIN, H. A. M.; AZEVEDO, F. A.; VICTORIA FILHO, R. Adubação verde no manejo de plantas daninhas na cultura de citros. **Revista Laranja**, v.27. p. 101-110, 2006.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G. BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, p.249-256, 2007.

SANTOS, R.; SIQUEIRA, R.; LIMA, C.; ALMEIDA, A.; PEDROSA, A.; VEIRA, C. Decomposição e liberação de nitrogênio de duas espécies de adubos verdes manejados no período seco em cafezal. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, p.1342-1345, 2009.

SÉGUY, L.; BOUZINAC, S.; TRENTINI, A.; CORTES, N. A. Gestão da fertilidade de culturas mecanizadas nos trópicos úmidos: o caso das frentes pioneiras nos cerrados e florestas úmidas no centro norte do Mato Grosso. In: PEIXOTO, R. T. G.; AHRENS, D.C.; SAMAHA, M. J. (Ed.). **Plantio direto: o caminho para uma agricultura sustentável**. Ponta Grossa: Iapar, 1997. p.124-157.

SHARMA, S.; DEV, S. P.; RAMESHWAR, S. S. Effect of green manuring of sunnhemp (*Crotalaria juncea* L.) on rice yield, nitrogen turnover and soil properties. **Crop Research**, v.19, p.418- 423, 2000.

SILVA, P. C. G.; FOLONI, J. S. S.; FABRIS, L. B.; TIRITAN, C. S. Fitomassa e relação C/N em consórcios de sorgo e milho com espécies de cobertura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1505-1512, 2009.

SPRENT, J. I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory?. **Plant and Soil**, v.161, p.1-10, 1994.

STEFFEN, R. S.; ANTONIOLLI, Z. I.; KIST, G. P. Avaliação de substratos para reprodução de colêmbolos nativos em condições de laboratório. **Ciência Florestal**, v.17, p. 265-269, 2007.

STRALIOTTO, R. e RUMJANEK, N. G. **Biodiversidade do rizóbio que nodula feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 51 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, n. 94).

TELHADO, S. F. P. **Desempenho e produtividade de milho em consórcio com adubos verdes, em sistema orgânico de produção**. 2007. 121p. Dissertação

(Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

TEODORO, R. B.; OLIVEIRA, F. L.; SILVA, D. M. N. S.; FÁVERO, C.; QUARESMA, M. A. L. Aspectos agronômicos de leguminosas para adubação verde no Cerrado do Alto Vale do Jequitinhonha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 635-643, 2011.

TORRES, J. L. R.; PEREIRA, M. G. Dinâmica do potássio nos resíduos vegetais de plantas de cobertura no cerrado. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 32, p. 1609-1618, 2008.

VIEIRA, R. F. Diversidade e taxonomia de rizóbios. In: SILVEIRA, A. P. D. e FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007, p.165-192.

VIERA-VARGAS M. S., OLIVEIRA O. C., SOUTO C. M., CADISCH G., URQUIAGA, S., AND BODDEY, R. M. Use of different <sup>15</sup>N labeling techniques to quantify the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to legumes. **Soil Biology. Biochemistry**, v.27, p.1185-1192, 1995.

VILAS BÔAS, R. C. e MOREIRA, F. M. S. Microbiologia do solo no ensino médio de lavras, MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, p. 295-306, 2012.

WUTKE E. B.; TRANI P. E.; AMBROSIANO E.J; DRUGOWICH M. I. **Adubação verde no estado de São Paulo**. Editora: CATI, 2009. 89p.

YOUNG, J. P. W. Phylogeny and taxonomy of rhizobial. **Plant and Soil**, p.186, 45-52, 1996.

#### 4. CAPÍTULO II: Eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio inoculadas em diferentes espécies de adubo verde

**Resumo** – As espécies leguminosas são amplamente utilizadas como adubo verde e a grande maioria delas possui a capacidade de fixar o nitrogênio biologicamente, quando infectada por bactérias diazotróficas. Embora encontrem-se inoculantes disponíveis comercialmente, diversos estudos indicam a possibilidade de se obter incrementos na nodulação e na fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN) em muitas espécies, por meio de um processo de seleção de estirpes de rizóbio mais eficientes e adaptadas às condições locais. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a nodulação e a eficiência da FBN por rizóbios nativos de solos de Mato Grosso do Sul, quando inoculados em várias espécies de adubos verdes: crotalária (*Crotalaria juncea* L.), feijão-de-porco [*Canavalia ensiformes* (L.) D.C.], guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], mucuna-cinza [*Mucuna nivea* (L.) D. C.] e mucuna-preta [*Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Holland]. Foram realizados testes em condições controladas de casa de vegetação, utilizando-se substrato esterilizado (areia e vermiculita, na proporção 1:1, v:v) e vasos com solo não esterilizado. A nodulação e a eficiência simbiótica dos rizóbios nativos de solos de Cerrado de Mato Grosso do Sul foram comparados com estirpes recomendadas comercialmente para a produção de inoculantes no Brasil. Além dos tratamentos com inoculação dos rizóbios individualmente, incluíram-se dois controles, com e sem adubação nitrogenada (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 20 mg de N por planta, semanalmente). Para crotalária, destaca-se o isolado CPAO 86.1, para feijão-de-porco pode-se destacar os isolados CPAO 104.3 e CPAO 76.2, assim como CPAO 2.1CMIGU, para inoculação em guandu. Em mucuna-preta, o isolado CPAO 124.1 apresentou bom desempenho em relação aos demais isolados e, em mucuna-cinza [*Mucuna nivea* L. (D.C.)], CPAO 117.1, podendo estes ser considerados promissores para a FBN em adubo verde.

**Palavras-chave:** plantas de cobertura; rizóbio; fixação biológica de nitrogênio.

**Abstract** - The leguminous species are widely used as green manure and the vast majority of them have the ability to fix nitrogen biologically, when infected by diazotrophs. Although find yourself inoculants commercially available, several studies indicate the possibility of obtaining increments on nodulation and N<sub>2</sub> fixation (BNF) in many species , through a process of selection of rhizobia strains more efficient and adapted to local conditions . The objective of this study was to evaluate the efficiency of nodulation and nitrogen fixation by native rhizobia in soils of Cerrado of Mato Grosso do Sul state were inoculated on various green manure species. Tests were conducted under controlled greenhouse conditions, using sterilized substrate (sand and vermiculite) (1:1; v:v) and unsterilized soil pots. Were compared with commercially recommended for inoculant production in Brazil strains of green manure species evaluated were. Sun hemp (*Crotalaria juncea* L.), jack bean (*Canavalia ensiformes* L.), pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp. Gray velvet bean (*Mucuna nivea* (L.) D.C. and *Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Holland in addition to the treatments individually inoculated with rhizobia , two controls were included, with and without N fertilizer (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 20 per plant, weekly) inocula were prepared in YM medium blue with bomotimol containing approximately 10<sup>8</sup> cells ml<sup>-1</sup>. To highlight the sunhemp isolated CPAO 86.1 for jack bean can highlight the CPAO 104.3 and CPAO 76.2 isolates, as well as CPAO 2.1CMIGU for inoculation of pigeonpea. In *Mucuna aterrima* the isolated CPAO 124.1, performed well in relation to other isolates and in *Mucuna nivea* L. (D.C), CPAO 117.1, and these may be considered promising for Biological Nitrogen Fixation in green manure.

**Keywords:** cover plants; rhizobia; biological nitrogen fixation.

## 4.1 Introdução

A preocupação com o uso sustentável do solo cresce a cada dia e torna-se necessária a busca por sistemas produtivos alternativos e mais conservacionistas. Nesse sentido, a adubação verde é uma prática que contribui para o aporte de matéria orgânica ao solo, resultando em melhoria das suas propriedades físicas, químicas e biológicas, além de promover a ciclagem de nutrientes (ROSOLEM, 2003). Dentre os efeitos da adubação verde sobre a fertilidade do solo, estão o aumento do teor de matéria orgânica e maior disponibilidade de nutrientes. Isso ocorre a partir da incorporação ou manutenção de resíduos vegetais produzidos por plantas utilizadas para esse fim, aumentando a capacidade produtiva do solo (CALEGARI *et al.*, 1993). A utilização de adubos verdes, em geral, apresenta-se como uma forma viável para amenizar os impactos da agricultura baseada no preparo convencional do solo (ALCÂNTARA *et al.*, 2000; DUDA *et al.*, 2003).

Algumas leguminosas da família Fabaceae utilizadas como adubo verde possuem a capacidade de associarem-se simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio, proporcionando vantagens para a fertilidade do solo, pois, após o corte da leguminosa, os nutrientes são disponibilizados no solo, podendo resultar em autossuficiência em N, contribuindo para a diminuição da utilização de adubos minerais em geral (GUERRA *et al.*, 2007).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo pelo qual o nitrogênio captado da atmosfera é convertido em compostos nitrogenados (como amônio ou nitrato) usados em diversos processos químicos e biológicos do solo, importantes para a nutrição de plantas. Esse processo pode ser realizado por bactérias pertencentes, principalmente, à ordem Rhizobiales, mas de acordo com Hungria *et al.* (2010). Outros microrganismos também são capazes de fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico. Apesar de já existirem estirpes selecionadas para o processo de FBN para diversas espécies de adubo verde, muitas vezes, ocorre falta de resposta à inoculação, que possivelmente está relacionada com a baixa capacidade dessas estirpes em adaptar-se a determinadas condições edafoclimáticas e colonizar efetivamente as raízes, quando introduzidas em solo com uma população

de rizóbios nativos já estabelecida (THIES *et al.*, 1991; SIKORA *et al.*, 1997; FERNANDES *et al.*, 2003).

As estirpes que melhor se adaptam às condições edafoclimáticas e que se mostram mais competitivas em relação aos rizóbios presentes no solo podem apresentar alto potencial para a FBN (PEDROSA *et al.*, 2000). Desta forma, a seleção de isolados nativos dos solos de Mato Grosso do Sul torna-se de grande importância, podendo contribuir para a melhoria da utilização de diversas espécies de adubo verde.

O objetivo do trabalho foi avaliar a nodulação e a eficiência da fixação biológica de nitrogênio por rizóbios nativos de solos de Mato Grosso do Sul, quando inoculados em cinco diferentes espécies de adubo verde, incluindo: crotalária, feijão-de-porco, guandu, mucuna-cinza e mucuna-preta.

## 4.2 Material e métodos

### 4.2.1 Ensaio em condições esterilizadas

Inicialmente, foram conduzidos quatro ensaios sob condições controladas de casa de vegetação na Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados/MS, utilizando-se vasos de “Leonard” contendo uma mistura de areia e vermiculita (1:1; v:v) esterilizada. Foram avaliados 94 isolados de rizóbio nativos de solos do Cerrado de Mato Grosso do Sul. Deste total, 24 isolados foram testados em crotalária (*Crotalaria juncea* L.); 14 em feijão-de-porco [*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.]; 40 em guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]; 8 em mucuna-preta [*Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Holland] e 8 isolados de rizóbios em mucuna-cinza [*Mucuna nivea* (L.) D.C.]. Todos estes isolados pertencem à Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Agropecuária Oeste, conforme apresentado na Tabela 1.

Além dos tratamentos correspondentes aos isolados nativos de solos de Mato Grosso do Sul, foram adicionados dois tratamentos sem inoculação, sendo um adubado com uma solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (20 mg de N por planta, semanalmente) e outro sem inoculação e sem adubação (testemunha absoluta), além de tratamentos

inoculados com estirpes recomendadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil, para as respectivas espécies de adubo verde, conforme a Tabela 1.

TABELA 1. Relação das espécies de adubo verde e rizóbios utilizados como referência no estudo.

Nome científico	Nome comum	Rizóbio utilizado para comparação*	Quantidade de isolados nativos testados
<i>Crotalaria juncea</i>	Crotalária	SEMIA 6145 e SEMIA 6156	24
<i>Canavalia ensiformis</i>	Feijão-de-porco	SEMIA 6158 e SEMIA 6156	14
<i>Cajanus cajan</i>	Guandu	SEMIA 6157 e SEMIA 6156	40
<i>Mucuna aterrima</i>	Mucuna-preta	SEMIA 6158	8
<i>Mucuna nivea</i>	Mucuna-cinza	SEMIA 6156, SEMIA 6157 e SEMIA 6158	8

\*Estirpes recomendadas pelo MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a produção de inoculantes comerciais no Brasil.

Os inóculos com as bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> foram produzidos em Meio YM (“yeast-mannitol” = extrato de levedura) (VINCENT, 1970), mantidas sob agitação, na temperatura de 28 °C, em local sem luminosidade, pelo período de um a cinco dias, de acordo o tempo necessário para crescimento de cada isolado.

As sementes de cada espécie de adubo verde foram esterilizadas superficialmente com álcool absoluto para a quebra da tensão superficial, sendo posteriormente imersas em solução de hipoclorito de sódio (30%) e lavadas sete vezes com água destilada esterilizada. Realizou-se a semeadura de quatro sementes por vaso, sendo inoculado 1,0 mL da suspensão de rizóbios contendo cerca de 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup> em cada semente.

Aos 15 dias após a semeadura procedeu-se o desbaste, mantendo duas plantas por vaso. As plantas foram supridas com solução nutritiva (NORRIS e T`MANNETJE, 1964, modificada) sem nitrogênio, durante o seu período de crescimento.

Aos quarenta e cinco dias após a semeadura, realizou-se a coleta das plantas, momento em que as raízes foram lavadas com água corrente sendo os

nódulos destacados para a contagem; em seguida, os nódulos, a parte aérea e raízes das plantas foram levadas à estufa na temperatura de 65 °C para secagem e, após atingirem peso constante, realizou-se a pesagem destes materiais.

A parte aérea das plantas, após serem secas e moídas, foram acondicionadas em frascos para posterior determinação do nitrogênio total da parte aérea, pelo método de Kjeldahl (semi-micro), descrito por Malavolta *et al.* (1997).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002).

Posteriormente, foi realizado um quinto ensaio, sendo avaliados 29 isolados de rizóbios inoculados em guandu (*Cajanus cajan*), em condições esterilizadas. Os procedimentos experimentais foram os mesmos que os realizados nos demais ensaios descritos anteriormente, exceto a quantidade de N mineral utilizado no tratamento controle com N, que neste ensaio foi suprido com 40 mg de N por planta, semanalmente. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Skott Knott, a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002).

Em todos os ensaios, foram avaliados os mesmos parâmetros: número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio total da parte aérea.

Os valores de matéria seca da parte aérea também foram utilizados para o cálculo de eficiência relativa, segundo Bergensen *et al.* (1971):

$$\text{Eficiência relativa} = \frac{\text{MSPA}_{\text{inoculado}}}{\text{MSPA}_{\text{N mineral}}} \times 100$$

Sendo que  $\text{MSPA}_{\text{inoculado}}$  é a matéria seca da parte aérea de plantas inoculadas com rizóbios avaliados e  $\text{MSPA}_{\text{N mineral}}$  é a matéria seca da parte aérea de plantas do tratamento o qual foi aplicado N mineral ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ).

Os isolados mais promissores nos ensaios em condições esterilizadas foram selecionados para testes em vasos com solo não esterilizado.

#### 4.2.2 Ensaio em substrato não esterilizado

Foram testados 22 isolados de rizóbios, abrangendo cinco espécies de adubo verde, sendo cinco em crotalária e feijão-de-porco, quatro em guandu mucuna-preta e mucuna-cinza.

O ensaio foi conduzido sob condições controladas de casa de vegetação, na Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados/MS, utilizando-se vasos com solo não esterilizados de mata nativa. O solo foi coletado na camada de 0-10 cm de profundidade. As características químicas do solo utilizado no ensaio estão apresentadas na Tabela 2.

A preparação dos inóculos e das sementes foram os mesmos utilizados nos ensaios em vasos de “Leonard”, com substrato esterilizado, exceto os intervalos em que as plantas foram supridas com solução nutritiva (NORRIS e T`MANNETJE, 1964, modificada). Neste ensaio, o suprimento da solução nutritiva foi intercalado com água destilada esterilizada. Incluíram-se no ensaio tratamentos sem inoculação, sem e com suplementação de nitrogênio mineral (20 mg por planta, semanalmente), correspondentes à testemunha absoluta e testemunha nitrogenada, respectivamente.

TABELA 2. Atributos químicos do solo utilizado no ensaio em condições controladas de casa de vegetação, em vasos com solo não esterilizado.

pH	P	Al	Ca	Mg	H+Al	K	SB	CTC	V	MOS
H <sub>2</sub> O	mg dm <sup>-3</sup>				cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>				%	g kg <sup>-1</sup>
6,0	10,5	0	9,4	2,9	5,0	0,4	12,7	17,8	71,7	45,0

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002).

## 4.3 Resultados e discussão

### 4.3.1 Condições esterilizadas

Os resultados apresentados a seguir referem-se aos ensaios conduzidos sob condições controladas de casa de vegetação, em substrato esterilizado, sendo cada espécie de adubo verde considerada individualmente. A representação gráfica dos resultados obtidos em todos os ensaios em condições esterilizadas com valores médios e relativos às estirpes comercialmente recomendadas (SEMIA), utilizadas como comparação neste estudo, estão apresentadas no anexo III.

- **Crotalária - *Crotalaria juncea* L.**

Houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), na nodulação, na produção de matéria seca da parte aérea e no acúmulo de nitrogênio da parte aérea de plantas de crotalária inoculadas com diferentes isolados de rizóbios.

No primeiro e no segundo ensaio, as estirpes SEMIA 6145 e SEMIA 6156, apresentaram número de nódulos superiores aos demais tratamentos, ambas recomendadas comercialmente para a produção de inoculantes comerciais no Brasil. No ensaio 3, o isolado CPAO 113.2 mostrou-se superior aos demais tratamentos para o parâmetro número de nódulos (Tabela 3).

Os isolados nativos CPAO 115.2, CPAO 86.1 (ensaio 4) apresentaram número de nódulos semelhante ( $p < 0,05$ ) as estirpes comercialmente recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil, sendo estes tratamentos superiores aos demais (Tabela 3). Segundo You *et al.*, (2002), uma série de bactérias estabelecem simbiose com crotalária formando nódulos em suas raízes. A partir disso, a seleção de linhagens superiores pode ser baseada em eficiência de nodulação da planta.

Observa-se no primeiro, no segundo e no quinto ensaios realizados em substrato esterilizado (Tabela 3), que os tratamentos com as duas estirpes recomendadas comercialmente para inoculação em crotalária (SEMIA 6145 e SEMIA 6156) apresentaram matéria seca de nódulos superiores aos demais tratamentos. No terceiro ensaio, nota-se que o isolado nativo CPAO 111.2

apresentou matéria seca de nódulos superior à estirpe comercial (SEMIA 6145). Neste mesmo ensaio, nota-se que os isolados nativos CPAO 1.3 CR-A, CPAO 86.3, CPAO 113.2, CPAO 113.3, apresentaram matéria seca de nódulos, iguais estatisticamente ( $p < 0,05$ ) a estirpe SEMIA 6156. No quarto ensaio para este parâmetro, observa-se que os isolados CPAO 115.2 e CPAO 86.1 e SEMIA 6145 apresentaram matéria seca de nódulos iguais entre si e superior aos demais tratamentos.

Quanto à produção de matéria seca da parte aérea, as estirpes SEMIA 6145 e SEMIA 6156 promoveram maior produção de matéria seca da parte aérea em plantas de crotalária apenas nos ensaios um e dois (Tabela 3). Porém, no ensaio 3, o tratamento inoculado com o isolado nativo CPAO 111.2 proporcionou a produção de matéria seca da parte aérea igual estatisticamente ( $p < 0,05$ ) a estirpe SEMIA 6156, porém, o tratamento no qual foi utilizado N mineral apresentou maior produção de matéria seca da parte aérea do que os demais.

No ensaio 4 os tratamentos inoculados com isolados nativos mostraram-se superiores com relação à testemunha sem inoculação e iguais ao tratamento com N mineral para produção de matéria seca da parte aérea. Contudo, no quinto ensaio, as estirpes SEMIA 6145 e SEMIA 6156 e o tratamento no qual foi aplicado nitrogênio mineral apresentaram-se superiores aos demais tratamentos (Tabela 3). Paulo *et al.* (2011) avaliaram diferentes rizóbios nativos isolados de *Crotalaria ochroleuca*, oriundos do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA, Seropédica, RJ) e mostraram a eficiência de pelo menos um isolado nativo, quanto a promoção do crescimento de plantas de crotalária quando comparadas com uma estirpe de *Bradyrhizobium* sp (BR 2003 = SEMIA 6156). Estes e outros autores (Faria e Franco, 2002; Costa *et al.* 2009) relatam resultados que apontam para a necessidade de estirpes de rizóbios que sejam mais eficientes na inoculação de crotalária.

Quanto ao teor de N na parte aérea de plantas de crotalária, foi possível observar que, no primeiro ensaio, nenhum isolado nativo foi capaz de acumular mais N na parte aérea do que os tratamentos inoculados com as estirpes comerciais (SEMIA 6145 e SEMIA 6156). Contudo, no segundo ensaio, foi possível observar que o isolado nativo CPAO 89.2 não diferiu estatisticamente da SEMIA 6145, enquanto que a estirpe SEMIA 6156 mostrou-se superior aos demais tratamentos

inoculados com isolados nativos do Mato Grosso do Sul. Para este mesmo parâmetro, no ensaio 3, observa-se que quatro isolados (CPAO 1.1CR-A, CPAO 113.2, CPAO 113.3 e CPAO 111.2) apresentam-se iguais estatisticamente à SEMIA 6156 e SEMIA 6145, sendo esses superiores aos demais tratamentos. Para esse mesmo parâmetro, no ensaio 5, o isolado nativo CPAO 87.1 mostrou-se igual estatisticamente ( $p < 0,05$ ) à estirpe SEMIA 6156 e SEMIA 6145 e também da testemunha nitrogenada (Tabela 3).

Ceretta *et al.* (1994) avaliaram o fornecimento de N para a cultura do milho em sucessão a leguminosas e mostraram que a crotalária foi capaz de contribuir com cerca de 13,8 kg/ha. Estes autores relacionam esse resultado com a capacidade de tal espécie de fixar  $N_2$  atmosférico quando em simbiose com rizóbios. Do mesmo modo, Perin *et al.* (2004) ao realizar trabalhos com inoculação de rizóbios em *Crotalaria juncea* L. constataram que esta leguminosa, quando inoculada com uma estirpe eficiente (BR 2001) foi capaz de incorporar ao solo, via FBN, cerca de 173 kg/ha de N; esses autores concluíram que esta pode ser uma excelente estratégia de fornecimento de N ao solo.

TABELA 3. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e nitrogênio da parte aérea total de crotalaria (*Crotalaria juncea* L.), inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação utilizando vasos de “Leonard”.

Tratamentos	Número de nódulos (n° planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea (g/kg)	
		Nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
Ensaio 1	CPAO 63.3	111 b	48 b	0,65 c	11,1 b
	CPAO 90.3	27 c	54 b	0,38 c	9,9 b
	CPAO 2.2 CMICR	4 d	53 b	0,79 c	10,4 b
	CPAO 61.1	7 cd	16 b	0,82 c	8,3 b
	CPAO 65.2	20 cd	34 b	1,02 c	13,7 b
	SEMIA 6145	163 a	254 a	4,65 a	34,4 a
	SEMIA 6156	171 a	426 a	5,10 a	29,8 a
	Test. absoluta	0 d	0 b	1,00 c	11,7 b
	Test. nitrogenada	0 d	0 b	2,96 b	15,1 b
	CV%	21	106	33	42
Ensaio 2	CPAO 63.1	19 c	50 cd	0,84 e	7,2 e
	CPAO 89.2	34 c	91 cd	0,64 e	22,8 bc
	CPAO 90.4	24 c	114 bc	0,81 e	15,4 cd
	CPAO 62.1	17 c	97,5 cd	0,70 e	20,4 cd
	CPAO 90.1	16 c	178 bc	0,88 e	10,9 e
	CPAO 114.1	115 b	127,5 bc	0,71 e	7,6 e
	CPAO 62.4	90 b	239 b	1,79 d	12,7 de
	SEMIA 6145	212 a	364 a	4,94 b	30,3 ab
	SEMIA 6156	242 a	476 a	6,54 a	34,4 a
	Test. absoluta	0 c	0 d	0,77 e	7,3 e
Test. nitrogenada	0 c	0 d	3,54 c	21,5 c	
CV%	25	24	23	22	
Ensaio 3	CPAO 1.3CR-A	37 d	76 ab	0,38 c	19,1 bc
	CPAO 1.1CR-A	8 e	13 c	0,36 c	44,1 a
	CPAO 86.3	91 b	76,7 ab	0,07 c	20,6 bc
	CPAO 113.2	116 a	96 ab	0,09 c	47,2 a
	CPAO 113.3	64 c	90,5 ab	1,66 b	29,2 ab
	CPAO 111.2	39 d	137 a	0,37 c	31,7 ab
	SEMIA 6145	25 d	52 bc	0,56 c	43,7 a
	SEMIA 6156	58 c	90 ab	1,73 b	43,0 a
	Test. absoluta	0 e	0 c	0,27 c	10,3 c
	Test. nitrogenada	0 e	0 c	3,51 a	25,2 bc
CV%	21	63	59	32	
Ensaio 4	CPAO 1.2 CMICR-A	18 c	31,65 b	1,00 a	30,5 cd
	CPAO 115.2	24 ab	63,82 a	0,59 ab	34,1 bc
	CPAO 86.1	31 ab	63,34 a	1,16 a	41,4 b
	SEMIA 6145	34 a	65,74 a	1,08 a	43,5 b

	SEMIA 6156	20 bc	28,91 b	0,52 ab	37,0 bc
	Test. absoluta	0 d	0 c	0,15 c	23,2 d
	Test. nitrogenada	0 d	0 c	0,90 a	58,2 a
	CV%	47	39	65	19
Ensaio 5	CPAO 88.1	10 c	37 bc	0,77 b	16,6 b
	CPAO 114.4	27 c	37 bc	0,81 b	24,1 b
	CPAO 87.1	54 bc	100 b	1,24 b	36,3 a
	SEMIA 6145	138 a	207 a	2,47 a	36,3 a
	SEMIA 6156	95 ab	211,5 a	3,28 a	44,1 a
	Test. absoluta	0 c	0 c	0,79 b	21,0 b
	Test. nitrogenada	0 c	0 c	2,72 a	36,7 a
	CV%	94	72	37	27

Valores médios de cinco repetições. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

- **Feijão-de-porco - *Canavalia ensiformis* (L.) D.C.**

Os resultados obtidos nos três ensaios em condições esterilizadas com feijão-de-porco [*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.] permitem observar que dois isolados nativos do Mato Grosso do Sul (CPAO 52.2 e CPAO 104.3) apresentaram número de nódulos superiores ( $p < 0,05$ ) aos demais tratamentos. Isso ocorreu no primeiro e no terceiro ensaio. Contudo, no segundo ensaio, a estirpe SEMIA 6156 apresentou-se superior em relação aos demais tratamentos para esse parâmetro (Tabela 4).

Quanto à matéria seca de nódulos, no primeiro ensaio, o isolado CPAO 52.2 igualou-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) às estirpes comercialmente recomendadas para a produção de inoculantes para esta espécie, da mesma forma no terceiro ensaio os isolados nativos CPAO 77.1, CPAO 76.2 e CPAO 104.3 apresentaram-se superiores à estirpe comercialmente recomendada para feijão-de-porco (Tabela 4). Esses resultados podem contribuir para a seleção de estirpes mais eficientes para essa espécie assim como o trabalho de Silva *et al.* (2007) com isolados nativos de um Sistema Integrado de Produção Agroecológica, no Estado do Rio de Janeiro, os autores concluíram que é possível selecionar estirpes de rizóbio nativas capazes de estabelecer uma simbiose efetiva com plantas de feijão-de-porco.

Para o parâmetro matéria seca da parte aérea é possível observar que no ensaio 1 não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos avaliados (Tabela 4). No ensaio 2, a estirpe recomendada comercialmente, SEMIA 6158, mostrou-se semelhante a todos os tratamentos com rizóbios nativos avaliados. Contudo, no terceiro ensaio, os resultados mostram que a maioria dos tratamentos com rizóbios nativos apresentaram valores estatisticamente superiores à estirpe SEMIA 6156 isso mostra que os rizóbios nativos do Cerrado de Mato Grosso do Sul foram capazes de promover maior produção de matéria seca da parte aérea de plantas do que as inoculadas com a estirpe comercial avaliada no estudo.

Quanto ao acúmulo de nitrogênio total da parte aérea, o isolado CPAO 52.2 mostrou o melhor resultado, sendo este superior aos demais tratamentos. No segundo ensaio é possível observar que os melhores resultados foram observados na estirpe SEMIA 6156, recomendada comercialmente para a produção de inoculante comercial para feijão-de-porco e no tratamento com nitrogênio mineral. No ensaio 3 observa-se que o isolado nativo CPAO 104.3 apresentou-se igual estatisticamente a CPAO 77.1 e ao tratamento com N mineral e superior a SEMIA 6156 (Tabela 4).

Fernandes *et al.* (2003), a partir de avaliações com isolados de rizóbios nativos de solos dos Tabuleiros Costeiros de Sergipe, inoculados em feijão-de-porco e comparados às estirpes recomendadas comercialmente para essa espécie, observaram que as estirpes comerciais não foram eficientes naquela região quando inoculadas nesta espécie. Essas considerações vêm contribuir com a informação de que é necessário selecionar isolados adaptados às condições edafoclimáticas específicas de cada região, para essa leguminosa.

TABELA 4. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.) inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação utilizando vasos de “Leonard”.

Tratamentos	Número de nódulos (n° planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea seca (g/kg)	
		Nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
Ensaio 1	CPAO 2.2CMIFP	41 cd	68 c	3,7 a	12,7 d
	CPAO 2.1CMIFPB	108 c	237 b	2,7 a	17,6 c
	CPAO 52.2	350 a	671 a	4,9 a	39,2 a
	CPAO 55.1	9 d	19 c	4,6 a	9,8 d
	SEMIA 6156	223 b	647 a	4,7 a	34,0 b
	SEMIA 6158	186 b	642 a	4,8 a	33,2 b
	Test. Absoluta	0 d	0 c	3,3 a	9,7 d
	Test. Nitrogenada	0 d	0 c	4,7 a	13,0 d
	CV %	35	27	31	11
Ensaio 2	CPAO 104.4	1 d	48 de	6,82 bc	9,4 c
	CPAO 2.3 CMIFP	17 cd	53 de	5,05 c	9,3 c
	CPAO 101.2	53 b	532 b	5,34 c	25,7 b
	CPAO 102.3	15 cd	210 cd	5,90 bc	9,3 c
	CPAO 2.2 FP	36 bc	234 cd	6,10 bc	11,8 c
	SEMIA 6156	148 a	782 a	9,45 a	31,7 a
	SEMIA 6158	33 bc	324 c	5,94 bc	25,4 b
	Test. absoluta	0 d	0 e	6,15 bc	27,6 c
	Test. nitrogenada	0 d	0 e	7,25 b	12,1 ab
CV%	37	42	15	13	
Ensaio 3	CPAO 78.1	29 c	211 c	3,92 a	15,6 c
	CPAO 77.1	62 b	380 ab	3,75 a	34,0 ab
	CPAO 76.2	63 b	339 b	3,80 a	27,1 b
	CPAO 78.2	10 d	27 d	3,85 a	15,4 c
	CPAO 104.3	77 a	439 a	3,20 ab	39,9 a
	SEMIA 6156	38 c	222 c	2,58 b	30,0 b
	Test. absoluta	0 d	0 d	3,16 ab	17,0 c
	Test. nitrogenada	0 d	0 d	4,07 a	35,5 ab
	CV%	28	44	18	25

Valores médios de cinco repetições. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

- **Guandu - *Cajanus cajan* (L.) Millsp.**

Os resultados com os quatro primeiros ensaios com 13 isolados de rizóbios nativos inoculados em guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] estão apresentados na Tabela 5.

De acordo com os resultados obtidos é possível observar que o isolado nativo CPAO 83.1 mostrou-se igual estatisticamente ( $p < 0,05$ ) à estirpe comercial utilizada neste estudo (SEMIA 6156), para o parâmetro número de nódulos. No segundo ensaio verifica-se que a estirpe SEMIA 6158 recomendada comercialmente para a produção de inoculantes comerciais apresentou maior número de nódulos quando comparada com os demais tratamentos. Porém, o isolado CPAO 2.1CMIGU, mostrou-se superior aos demais tratamentos. Isso pode ser observado no ensaio 3 (Tabela 5).

Quanto à matéria seca da parte aérea, os isolados CPAO 82.2, CPAO 58.2, CPAO 83.1 e CPAO 56.1, juntamente com as estirpes SEMIA 6156 e SEMIA 6158, mostraram-se iguais entre si e superiores aos demais tratamentos, no primeiro ensaio. Para esse mesmo parâmetro, observa-se, no segundo ensaio, que a matéria seca de nódulos de plantas inoculadas com rizóbios nativos foram iguais estatisticamente ( $p < 0,05$ ) às inoculadas com as estirpes comerciais (SEMIA 6156 e SEMIA 6158). No último ensaio (Tabela 5), a estirpe SEMIA 6158 promoveu maior matéria seca de nódulos em guandu.

Nos três ensaios apresentados na tabela 5 o tratamento com N mineral foi capaz de promover a maior produção de matéria seca da parte aérea. No entanto, no ensaio 2, os maiores teores de N acumulado na parte aérea foram obtidos, principalmente, nos tratamentos inoculados com os isolados CPAO 82.2 e CPAO 58.2, que apresentaram-se superior à estirpe comercial SEMIA 6158. No entanto, estes mostraram resultados estatisticamente iguais ao tratamento com N mineral. No terceiro ensaio, o isolado CPAO 110.2 igualou-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) as estirpes comercialmente recomendadas para a produção de inoculantes para guandu.

Em estudos sobre aporte de nitrogênio e fósforo no solo a partir de incorporações de resíduos da poda do guandu, Alves *et al.* (2004) encontraram resultados com níveis de 283 kg/ha num período de cinco meses, fornecendo esse

nutriente para a cultura sucessora. Além disso, uma das principais contribuições da adubação verde para os agroecossistemas foi a melhoria do solo em suas características químicas físicas e biológicas.

TABELA 5. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de guandu (*Cajanus cajan* L.), inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação utilizando vasos de “Leonard”.

Tratamentos	Número de nódulos (n° planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea (g/kg)	
		Nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
Ensaio 1	CPAO 82.2	42 c	203 a	1,91 b	34,3 a
	CPAO 82.1	73 bc	17 bc	0,43 d	13,1 b
	CPAO 58.2	46 c	133 ab	1,23 bc	23,0 ab
	CPAO 83.1	108 ab	109 ab	0,78 cd	31,3 a
	CPAO 56.1	58 c	157 a	0,77 cd	21,4 ab
	SEMIA 6156	117 a	166 a	1,64 b	25,0 ab
	SEMIA 6158	53 c	143 a	0,49 d	13,9 b
	Test. Absoluta	0 d	0 c	0,37 d	18,7 ab
	Test. Nitrogenada	0 d	0 c	3,55 a	24,2 ab
	CV%	40	64	33	35
Ensaio 2	CPAO 82.3	14 c	28 b	0,29 c	26,5 bc
	CPAO 58.3	24 c	30 b	0,28 c	25,3 c
	CPAO 2.3 GU-B	26 c	319 a	0,37 c	26,8 bc
	CPAO 110.2	34 b	285 a	1,31 b	42,1 ab
	SEMIA 6156	46 b	207 a	2,62 a	45,0 a
	SEMIA 6158	63 a	249 a	0,43 c	31,1 ab
	Test. absoluta	0 d	0 b	0,44 c	25,2 c
Test. Nitrogenada	0 d	0 b	2,79 a	31,2 ab	
CV%	41	53	38	31	
Ensaio 3	CPAO 2.1 CMIGU	22 a	66 b	0,32 bc	42,6 b
	CPAO 3.5 GU	17 b	38 bc	0,18 c	28,4 d
	CPAO 2.4 GU	12 cd	35 bc	0,32 bc	44,7 b
	CPAO 4.4 GU	10 de	30 bc	0,45 b	43,5 b
	SEMIA 6156	16 bc	52 b	0,35 bc	41,2 b
	SEMIA 6158	7 e	262 a	0,25 c	39,7 bc
	Test. absoluta	0 f	0 c	0,17 c	32,1 cd
	Test. nitrogenada	0 f	0 c	0,96 a	58,5 a
	CV%	27	45	39	15

Valores médios de cinco repetições. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade

Outro ensaio com guandu foi conduzido em condições estéril de casa de vegetação com 27 isolados de rizóbios nativos do Cerrado do Mato Grosso do Sul. Os resultados deste ensaio estão apresentados na tabela 6.

De acordo com a tabela, houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na nodulação e na produção de matéria seca da parte aérea das plantas de guandu pela inoculação com os diferentes rizóbios (Tabela 6). Quando comparados com duas estirpes recomendadas atualmente para inoculação em guandu, verificou-se que onze isolados proporcionaram maior número de nódulos do que a inoculação com a estirpe SEMIA 6157 e mostraram-se semelhantes à inoculação com a estirpe SEMIA 6156.

Neste ensaio, a produção de matéria seca de nódulos do guandu mais elevada foi verificada pela inoculação dos isolados CPAO 3.1GU e CPAO 5.1GU, sendo superiores à inoculação com as estirpes SEMIA 6156 e SEMIA 6157. Em média, estes dois isolados de rizóbio nativos de solos de Mato Grosso do Sul foram cerca de 60% superiores às estirpes comerciais. Dos 27 isolados de rizóbio (CPAO) avaliados, apenas três propiciaram uma produção de massa seca de nódulos similar ou inferior às estirpes SEMIA 6156 e SEMIA 6157. Os demais isolados mostraram-se superiores a estas estirpes comerciais (Tabela 6).

Ao avaliar a nodulação em guandu, inoculadas com rizóbio, Fernandes *et al.* (2003) também observaram que alguns isolados selecionados apresentaram nodulação estatisticamente semelhante ( $p < 0,05$ ) àquela produzida pela inoculação das estirpes recomendadas comercialmente.

Os isolados CPAO 5.2 e CPAO 6.5 apresentaram eficiência relativa de 143% e 145%, respectivamente (Tabela 6), sendo estas superiores aos demais tratamentos. Valarini e Godoy (1994) verificaram que duas estirpes de *Bradyrhizobium* apresentaram eficiência relativa superior a 80% quando inoculadas em diferentes acessos de guandu. Os autores ainda complementam que esses resultados sugerem que o guandu; pode depender da fixação simbiótica para suprir suas necessidades de N no seu desenvolvimento vegetativo.

TABELA 6. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e nitrogênio da parte aérea total de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) inoculado com diferentes estirpes/isolados de rizóbio e índices de eficiência relativa.

Tratamentos	Número de nódulos (n°planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea (g/kg)	*Eficiência relativa (%)
		Nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
-----Vasos de Leonard (areia+vermiculita esterilizadas) -----					
CPAO 1.3 GU	19 b	148 c	1,25 d	18,51 a	72 d
CPAO 1.4 GU	28 b	162 c	1,72 b	18,29 a	99 b
CPAO 2.4 GU	40 a	242 b	1,51 c	20,25 a	88 c
CPAO 3.1 GU	42 a	274 a	1,82 b	19,89 a	106 b
CPAO 3.2 GU	10 c	17 f	0,25 e	6,90 d	15 e
CPAO 3.4 GU	30 b	158 c	1,15 d	12,91 c	67 d
CPAO 3.5 GU	50 a	94 d	1,55 c	18,81 a	90 c
CPAO 4.1 GU	28 b	92 d	0,51 e	10,50 c	30 e
CPAO 4.3 GU	49 a	130 d	1,07 d	6,79 d	62 d
CPAO 4.4 GU	45 a	227 b	1,80 b	19,25 a	104 b
CPAO 5.1 GU	43 a	279 a	1,54 c	10,89 c	89 c
CPAO 5.2 GU	32 b	228 b	2,31 a	19,39 a	134 a
CPAO 5.3 GU	26 b	222 b	1,85 b	19,40 a	107 b
CPAO 6.2 GU	22 b	81 d	0,48 e	6,58 d	28 e
CPAO 6.5 GU	16 b	127 d	2,50 a	14,56 b	145 a
CPAO 7.1 GU	22 b	38 e	0,66 e	8,41 d	39 e
CPAO 7.3 GU	43 a	147 c	1,08 d	8,55 d	63 d
CPAO 7.4 GU	46 a	204 b	1,44 c	16,41 b	84 c
CPAO 7.5 GU	46 a	198 b	1,48 c	14,00 b	86 c
CPAO 8.1 GU	44 a	102 d	0,72 e	13,59 b	42 e
CPAO 8.2 GU	29 b	115 d	0,54 e	9,42 d	32 e
CPAO 8.4 GU	6 c	12 f	0,42 e	6,82 d	25 e
CPAO 9.1 GU	26 b	156 c	0,61 e	6,04 d	35 e
CPAO 9.4 GU	35 a	104 d	1,20 d	12,79 c	70 d
CPAO 10.1 GU	29 b	125 d	1,64 c	20,12 a	95 c
CPAO 10.3 GU	20 b	153 c	0,94 d	12,55 c	54 d
CPAO 10.4 GU	30 b	117 d	1,20 d	19,28 a	69 d
SEMIA 6156	54 a	63 e	0,76 e	12,00 c	44 e
SEMIA 6157	21 b	44 e	1,24 d	13,63 b	72 d
Test. Absoluta	0 c	0 f	0,54 e	5,016 d	32 e
Test. nitrogenada	0 c	0 f	1,73 b	7,89 d	100 b
C.V. (%)	32	24	18	27	18

$$\text{*Eficiência relativa} = \frac{\text{MPAS}_{\text{inoculado}}}{\text{MPAS}_{\text{N mineral}}} \times 100$$

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5 % de probabilidade. Os valores médios foram obtidos com cinco repetições.

Carvalho *et al.* (2008) observaram que os índices de eficiência relativa para o guandu ficaram abaixo de 60%, quando inoculados com duas estirpes de *Bradyrhizobium*; devido a esse baixo índice, os autores classificam essas estirpes como sendo pouco eficientes na simbiose com guandu. Esses resultados que os

isolados de rizóbios nativos dos solos do Mato Grosso do Sul podem ser eficientes na simbiose com guandu e reforçam a necessidade de selecionar estirpes de rizóbios mais eficientes para a inoculação nesta espécie.

A partir desses resultados, os isolados que se apresentaram mais promissores para a FBN em condições esterilizadas foram selecionados para testes em condições não esterilizadas.

- **Mucuna-preta - *Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Holland**

Estão apresentados na Tabela 7 os valores referentes a três ensaios com oito isolados de rizóbios nativos do solo do Mato Grosso do Sul, inoculados em mucuna-preta.

Conforme mostra a Tabela 7, a inoculação com o isolado 2.3 CMIMC proporcionou a maior quantidade de nódulos, sendo, então, considerada superior aos demais tratamentos. No ensaio 2 pode-se destacar outro isolado nativo CPAO 124.1 que se mostrou igual ( $p < 0,05$ ) a SEMIA 6158.

Para o parâmetro matéria seca de nódulos a estirpe 6158 superou os demais tratamentos e apresentou maior massa de nódulos secos. Enquanto que no ensaio 2, os isolados CPAO 93.1 e CPAO 117.1 mostraram-se superior aos demais tratamentos. Pode-se destacar também o isolado CPAO 66.1 que também se mostrou superior à estirpe SEMIA 6158 (Tabela 7).

Nos dois ensaios, a maior produção de matéria seca da parte aérea foi proporcionada por isolados de rizóbios nativos do Mato Grosso do Sul, os quais não diferiram dos tratamentos inoculados com as estirpes comercialmente recomendadas para a produção de inoculantes para mucuna-preta. No entanto, esses tratamentos igualaram-se ao tratamento com adição de nitrogênio mineral (Tabela 7).

Quanto ao teor de nitrogênio total acumulado na parte aérea de plantas de mucuna-preta, observa-se que os isolados nativos CPAO 117.2 e CPAO 2.3CMIMC apresentaram-se iguais estatisticamente ( $p < 0,05$ ) à estirpe SEMIA 6158 sendo estes superiores aos demais tratamentos. No segundo ensaio dois isolados (CPAO 93.1 e

CPAO 117.1) fixaram maior quantidade de nitrogênio na parte aérea de plantas de crotalária (Tabela 7).

Segundo Lima (2009), as estirpes que estão contidas nos inoculantes comerciais para adubos verdes foram selecionados há muitos anos, além de um inoculante ser recomendado para várias espécies, como, por exemplo, a estirpe BR 2801 (SEMIA 6157), o que pode provocar a baixa eficiência dessas estirpes. Desse modo, há uma necessidade de selecionar novas estirpes para adubo verde, visando a obtenção de incrementos no potencial de FBN nestas espécies.

TABELA 7. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de mucuna-preta (*Mucuna aterrima* L.), inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação utilizando vasos de “Leonard”.

Tratamentos	Número de nódulos (n° planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea (g/kg)	
		Nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
Ensaio 1	CPAO 68.1	60 b	120 cd	1,57 d	4,4 b
	CPAO 117.2	59 b	310 bc	2,22 bc	13,4 a
	CPAO 2.3 CMIMC	101 a	396 ab	3,72 ab	14,4 a
	CPAO 67.1	38 bc	146 cd	1,72 cd	7,9 b
	SEMIA 6158	19 cd	567 a	4,84 a	17,2 a
	Test. Absoluta	0 d	0 d	1,64 cd	4,8 b
	Test. Nitrogenada	0 d	0 d	5,3 a	7,7 b
	CV%	55	47	36	24
Ensaio 2	CPAO 93.1	13 b	212 a	2,25 ab	36,8 a
	CPAO 66.1	12 b	179 ab	2,92 ab	10,9 c
	CPAO 124.1	26 a	139 b	2,22 bc	26,6 b
	CPAO 117.1	8 b	207 a	2,38 ab	35,8 a
	SEMIA 6158	27 a	65 c	1,94 bc	15,6 c
	Test. Absoluta	0 c	0 d	1,63 c	11,2 c
	Test. Nitrogenada	0 c	0 d	3,27 a	28,4 ab
	CV%	45	30	30	27

Valores médios de cinco repetições. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

- **Mucuna-cinza - *Mucuna nivea* L. (D.C.)**

Nos ensaios com mucuna-cinza, foram testados oito isolados de rizóbios nativos sendo estes comparados com duas estirpes comerciais SEMIA 6156 e SEMIA 6158. Todos os resultados estão apresentados na tabela 8.

A maior quantidade de nódulos formados em plantas de mucuna-cinza foi obtida em tratamentos com a estirpe SEMIA 6158, porém, esses valores não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos com isolados nativos. No ensaio 2, o isolado CPAO 116.3 apresentou número de nódulos igual a SEMIA 6158 e inferior a SEMIA 6157, além de ser superior aos demais tratamentos (Tabela 8).

No ensaio 1, os isolados nativos CPAO 118.2, CPAO 93.4 e CPAO 2.1 CMIMC-B apresentaram matéria seca de nódulos iguais aos da SEMIA 6156 e superior aos demais tratamentos. Neste mesmo ensaio, para matéria seca da parte aérea, pode-se destacar quatro dos cinco isolados nativos testados são eles CPAO 95.3, CPAO 118.2, CPAO 2.1CMIMC-B, pois estes foram iguais estatisticamente ( $p < 0,05$ ) a estirpe comercial (SEMIA 6156). Neste mesmo ensaio, é possível observar que não houve diferenças significativas entre os tratamentos com inoculação, porém, observa-se essa diferença entre a testemunha absoluta em relação aos demais tratamentos, sendo os este tratamento o pior resultado (Tabela 8). No segundo ensaio, a estirpe SEMIA 6157 mostrou-se superior ( $p < 0,05$ ) aos demais tratamentos, tanto em produção de matéria seca da parte aérea quanto em teores de nitrogênio acumulados na parte aérea das plantas de mucuna-cinza.

O efeito da inoculação de rizóbios em plantas de mucuna-cinza sob condições controladas podem ser observados em Lima (2009). Neste estudo, as plantas de mucuna apresentaram massa maior quando comparadas às plantas dos tratamentos sem inoculação. Esse efeito também pode ser observado em Oliveira *et al.* (2012), Lima (2012) e Antonio *et al.* (2010), com destaque para a contribuição benéfica que o rizóbio traz às plantas de mucuna.

Esses resultados mostram que é possível encontrar rizóbios nativos dos solos de Mato Grosso do Sul que estabeleçam simbiose eficaz com mucuna-cinza.

TABELA 8. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de mucuna-cinza [*Mucuna nivea* L. (D.C.)] inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação utilizando vasos de “Leonard”.

Tratamentos	Número de nódulos (n° planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea seca (g/kg)	
		Nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
Ensaio 1	CPAO 95.3	59 bc	531 bc	5,95 ab	25,0 a
	CPAO 118.2	73 b	796 ab	6,93 ab	30,5 a
	CPAO 91.4	37 bc	517 c	5,80 ab	25,2 a
	CPAO 93.4	60 bc	600 ab	5,47 bc	28,1 a
	CPAO 2.1 CMIMC-B	75 b	690 ab	7,17 ab	26,3 a
	SEMIA 6156	23 cd	819 a	7,21 a	24,3 a
	SEMIA 6158	114 ab	489 c	6,28 ab	26,0 a
	Test. absoluta	0 d	0 d	5,43 c	11,9 b
	Test. nitrogenada	0 d	0 d	6,81 ab	25,7 a
	CV%	45	28	13	15
Ensaio 2	CPAO 116.3	56 a	98,7 b	2,54 c	17,0 b
	CPAO 118.1	16 bc	33,2 bc	2,53 c	8,8 b
	CPAO 117.2	21 b	73,0 bc	2,31 c	9,6 b
	SEMIA 6157	57 a	523,8 a	4,57 a	39,2 a
	SEMIA 6158	16 bc	66,4 bc	2,07 c	11,1 b
	Test. absoluta	0 c	0 c	2,33 c	10,4 b
	Test. nitrogenada	0 c	0 c	3,51 b	16,4 b
	CV%	49	46	15	37

Valores médios de cinco repetições. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

#### 4.3.2 Condições não esterilizadas

- **Crotalária - *Crotalaria juncea* L.**

Os resultados do ensaio com crotalária em vasos com solo não esterilizado estão apresentados na tabela 9. Houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na nodulação, na produção de matéria seca e no acúmulo de nitrogênio da parte aérea de plantas de crotalária inoculadas com os diferentes isolados de rizóbio.

Os resultados obtidos no ensaio com solo permitem inferir que o isolado CPAO 86.1 mostrou-se igual ( $p < 0,05$ ) à estirpe comercial SEMIA 6156 quanto ao número de nódulos e matéria seca de nódulos e da parte aérea, demonstrando boa competitividade em relação à população de bactérias nativas no solo.

Segundo You *et al.* (2002), uma série de bactérias estabelecem simbiose com crotalária, formando nódulos em suas raízes. A partir disso, a seleção de linhagens superiores pode ser baseada em eficiência de nodulação da planta. Salienta-se que a seleção de rizóbios mais eficientes simbioticamente com a planta hospedeira deve possuir também alta capacidade competitiva por sítios de nódulos formados para que a inoculação tenha o desempenho evidenciado (PEREIRA *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 2013).

O isolado CPAO 114.4, quanto à produção de matéria seca dos nódulos, mostrou-se similar estatisticamente às duas estirpes comercialmente recomendadas, utilizadas neste estudo como comparação (SEMIA 6145 e SEMIA 6156) (Tabela 9).

A capacidade competitiva apresentada por estirpes de rizóbio deve ser elevada, pois, segundo Sessitsch *et al.* (2002), essa característica é um bom requisito para a colonização bem sucedida das raízes das plantas, formação de nódulos e posterior fixação de  $N_2$ .

Quanto à competitividade, Toro (1996) menciona que estirpes de rizóbio alóctones atuam em diferentes estágios da nodulação, podendo competir com rizóbios nativos, tanto na rizosfera durante a ocupação dos sítios de infecção quanto ao penetrar nas raízes e promover o desenvolvimento dos nódulos. Segundo Brockwell (1981), a competitividade e a eficiência simbiótica são características altamente desejáveis para estirpes de rizóbios recomendadas para inoculação.

Os isolados CPAO 88.1, CPAO 1.2 CMICR–A e CPAO 115.2 mostraram-se similares à estirpe SEMIA 6156 ( $p < 0,05$ ) e à testemunha nitrogenada no acúmulo de nitrogênio da parte aérea. Da mesma forma, o isolado CPAO 86.1 mostrou-se semelhante à estirpe comercialmente recomendada para a produção de inoculantes para crotalária (Tabela 9).

A eficiência relativa, que é obtida pela relação entre a produção de matéria seca da parte aérea das plantas inoculadas com rizóbios e as plantas submetidas a

um tratamento com N mineral, mostrou que os isolados nativos apresentaram diferenças significativas quando comparados com as estirpes recomendadas comercialmente (Tabela 9).

O desempenho inferior apresentado pelos demais isolados de rizóbio, quanto à fixação biológica de nitrogênio, indica que a crotalaria apresenta diferentes respostas para os diferentes isolados avaliados, o que reforça a necessidade de seleção de bactérias com alto potencial para a FBN nesta espécie (Paulo *et al.*, 2011). Além disso, deve-se considerar que, de maneira geral, a maioria das leguminosas utilizadas como condicionadoras de solo possui uma nodulação natural, esse fato reforça a necessidade de selecionar isolados mais competitivos do que os já existentes no solo (Ribeiro Junior e Ramos, 2006).

TABELA 9. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e nitrogênio total da parte aérea de crotalaria (*Crotalaria juncea* L.), inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em vasos com solo não esterilizados.

Tratamentos	Número de nódulos (n° planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea (g/kg)	*Eficiência relativa (%)
		Nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
----- Vasos com solo (não esterilizados) -----					
CPAO 88.1	25 cd	9,1 cd	1,01 c	37,3 ab	33 c
CPAO 114.4	49 bc	28,8 ab	1,52 bc	30,6 bc	50 bc
CPAO 1.2 CMICR-A	5 d	3,8 cd	1,08 c	35,6 ab	36 c
CPAO 115.2	45 bc	9,0 cd	1,25 c	34,2 ab	41 c
CPAO 86.1	75 ab	37,5 a	2,71ab	23,4 c	89 ab
SEMIA 6145	52 bc	35,7 a	3,45 a	29,6 bc	114 a
SEMIA 6156	89 a	38,4 a	2,33 ab	32,4 ab	77 ab
Test. absoluta	32 cd	17,6 bc	2,32 ab	33,2 ab	77 ab
Test. nitrogenada	14 cd	1,0 d	3,04 a	39,9 a	100 a
CV%	55	46	39	15	39

$$*Eficiência\ relativa = \frac{MPAS_{inoculado}}{MPAS_{N\ mineral}} \times 100$$

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Valores médios de cinco repetições.

- **Feijão-de-porco - *Canavalia ensiformis* (L.) D.C.**

Nos ensaios conduzidos em condições não esterilizadas (vasos com solo), entre os isolados pré-selecionados quanto à quantidade de nódulos formados, destacaram-se o isolado CPAO 76.2, por apresentar número de nódulos similar ( $p < 0,05$ ) às estirpes comerciais utilizadas como comparação no estudo (SEMIA 6156 e SEMIA 6158), e também CPAO 104.3, por apresentar número de nódulos superior à estirpe comercial, mostrando que são competitivas tanto quanto aquelas avaliadas (Tabela 10). Fernandes *et al.* (2003) relatam que as estirpes utilizadas nos inoculantes comerciais (SEMIA 6156 e SEMIA 6158) não foram consideradas eficientes para o feijão-de-porco, quando comparadas com isolados nativos dos Tabuleiros Costeiros de Sergipe.

O isolado CPAO 104.3 apresentou 183 mg de nódulos secos. Contudo, esse valor não diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do tratamento com a estirpe comercialmente recomendada para a produção de inoculantes SEMIA 6156 para feijão-de-porco (Tabela 10).

Todos os isolados nativos, de maneira geral, proporcionaram incrementos na parte aérea de plantas inoculadas com rizóbios, mostrando-se iguais estatisticamente à estirpe SEMIA 6156. Do mesmo modo, os teores de N total da parte aérea resultantes da inoculação com isolados nativos não diferiram estatisticamente entre si, nem entre a estirpe comercial SEMIA 6156. No entanto, todos os tratamentos mostraram-se inferiores ao tratamento com nitrogênio mineral (Tabela 10).

De acordo com Matheus e Wutke (2006), para que uma espécie possa ser usada para a adubação verde, ela deve ter entre outras características a produção de biomassa vegetal elevada, com a finalidade principal a cobertura do solo. Dessa forma, a inoculação com rizóbios pode contribuir para esse processo, uma vez que estudos constatarem que essas bactérias trazem benefícios para a planta, pois promovem o crescimento vegetativo, incrementos na nodulação e fixação de  $N_2$ , aumentam os teores de N na planta e, conseqüentemente, disponibilizam este nutriente para a planta (HUNGRIA *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2006; MELO; ZILLI, 2009; PAVANELLI; ARAÚJO, 2009). Assim, há necessidade de selecionar isolados

que sejam eficientes na produção de matéria seca da parte aérea da planta para que possa contribuir para a melhora da utilização feijão-de-porco como adubo verde.

TABELA 10. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* (L.) D.C.), inoculado com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em vasos com solo não esterilizados.

Tratamentos	Número de nódulos (n° planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea (g/kg)	Eficiência relativa (%)
		Nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
----- vasos com solo (não esterilizados) -----					
CPAO 78.1	31 bc	146 ab	4,8 b	23,6 b	75 b
CPAO 77.1	36 b	137 b	4,7 b	22,7 b	73 b
CPAO 76.2	48 ab	175 ab	5,1 ab	21,5 b	79 ab
CPAO 78.2	31 bc	37 c	5,7 ab	21,8 b	89 ab
CPAO 104.3	62 a	183 a	5,3 ab	22,1 b	82 ab
SEMIA 6156	37 b	158 ab	4,5 b	20,9 b	70 b
Test. absoluta	38 b	164 ab	4,7 b	23,0 b	74 b
Test. nitrogenada	14 c	27 c	6,5 a	28,4 a	100 a
CV%	34	19	16	12	16

$$\text{*Eficiência relativa} = \frac{\text{MPAS}_{\text{inoculado}}}{\text{MPAS}_{\text{N mineral}}} \times 100$$

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Valores médios de cinco repetições.

- **Guandu – *Cajanus cajan* (L.) Millsp.**

De maneira geral, em condições não esterilizadas, a maioria dos isolados nativos avaliados apresentaram resultados semelhantes ( $p < 0,05$ ) à estirpe recomendada comercialmente (Tabela 11). Deve-se destacar que a competitividade do rizóbio refere-se à capacidade relativa que a bactéria tem de infectar as raízes de uma leguminosa e formar nódulos, na presença de outras espécies que estão do mesmo nicho (RAPOSEIRAS *et al.*, 2006).

A estirpe SEMIA 6158, quando inoculada em guandu, proporcionou os maiores valores de matéria seca de nódulos, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 11).

Em estudos realizados por Fernandes *et al.* (2003), destacou-se que as estirpes utilizadas nos inoculantes comerciais foram consideradas eficientes para guandu, em estudos com comparações entre estirpes comerciais e isolados nativos dos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. Valarini e Godoy (1994) em estudos sobre a contribuição na produção de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) comprovaram que esta espécie pode estabelecer associação simbiótica com *Bradyrhizobium* capaz de suprir mais de 90% do nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento.

Ao observar os valores de matéria seca da parte aérea nos tratamentos inoculados com os isolados nativos de Mato Grosso do Sul, foram demonstradas respostas equivalentes ao tratamento que recebeu nitrogênio mineral (20 mg/planta, semanalmente) (Tabela 11).

Quanto aos teores de N na parte aérea das plantas, alguns isolados de rizóbios nativos (CPAO 2.1 CMIGU e CPAO 2.4GU) proporcionaram teores de N iguais estatisticamente ( $p < 0,05$ ) aos obtidos pela aplicação de N mineral (Tabela 11). Esses resultados contribuem para a seleção de estirpes de bactérias eficientes no processo de FBN, uma vez que a adubação nitrogenada poderia ser substituída pelo processo biológico, principalmente por ser economicamente vantajoso, e ambientalmente sustentável (HUNGRIA *et al.*, 2006).

Foi possível observar que o isolado CPAO 2.1 CMIGU apresentou eficiência relativa elevada, não diferindo estatisticamente do tratamento com adubação mineral (Tabela 11). Estudos com isolados de rizóbios nativos do agreste da Paraíba simbiotes com caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], realizados por Nascimento *et al.* (2010), relatam que alguns isolados de rizóbios nativos testados apresentaram alta eficiência na FBN, sendo capazes de produzir uma biomassa vegetal equivalente a 80% da biomassa produzida pelas plantas que foram submetidas a tratamentos com N mineral. Soares *et al.* (2006), ao avaliarem a eficiência relativa de isolados de rizóbios nativos de solos da Amazônia, destacaram um isolado, devido ao seu potencial de produção de biomassa seca da parte aérea em plantas de caupi, e também por apresentar alta eficiência relativa quando comparado com outros isolados.

TABELA 11. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio total da parte aérea de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp. inoculado com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em vasos com solo não esterilizados.

Tratamentos	Número de nódulos (n° planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea (g/kg)	Eficiência relativa (%)
		Nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
----- vasos com solo (não esterilizados) -----					
CPAO 2.1 CMIGU	23 a	31 bc	2,36 a	32,4 ab	100 a
CPAO 3.5 GU	22 a	40 b	2,36 a	31,6 b	88 ab
CPAO 2.4 GU	12 ab	15 cd	1,68 ab	33,0 ab	63 bc
CPAO 4.4 GU	14 ab	30 bc	1,76 ab	31,9 b	66 bc
SEMIA 6156	14 ab	35 bc	1,84 ab	34,5 ab	69 ab
SEMIA 6158	16 ab	616 a	1,29 bc	33,9 ab	48 ab
Test. absoluta	14 ab	93 e	0,82 c	9,7 c	30 d
Test. nitrogenada	7 b	11 de	2,69 a	36,3 a	100 a
CV%	56	44	33	8	29

$$\text{*Eficiência relativa} = \frac{\text{MPAS}_{\text{inoculado}}}{\text{MPAS}_{\text{N mineral}}} \times 100$$

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Valores médios de cinco repetições.

- **Mucuna-preta - *Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Holland**

Os isolados CPAO 2.3CMIMP-B e CPAO 66.1 apresentaram número de nódulos superior aos demais tratamentos quanto à produção de matéria seca de nódulos e da parte aérea. O isolado CPAO 2.3CMIMP-B mostrou-se similar ( $p < 0,05$ ) à estirpe SEMIA 6158, que é uma das estirpes recomendadas comercialmente para a produção de inoculantes para esta cultura (Tabela 12). Segundo Hungria e Bohrer (2000), a matéria seca de nódulos é mais adequada na avaliação da nodulação, devido à melhor correlação com o desempenho simbiótico entre o rizóbio e a planta.

Em condições não esterilizadas, os isolados CPAO 124.2, CPAO 93.1 juntamente com a estirpe comercial SEMIA 6158 mostraram-se similar ( $p < 0,05$ ) ao tratamento sem inoculação (testemunha absoluta), quanto à matéria seca de nódulos, o que pode ser explicado pela presença de rizóbios no solo, mais competitivos do que os que foram inoculados nas sementes de mucuna-preta

(Tabela 12). Deve-se salientar que as leguminosas utilizadas como adubo verde apresentam nodulação natural, pois, segundo Vargas *et al.* (1984), em solos do Cerrado, a população nativa de rizóbio é cerca de  $10^6$  células/g de solo. No presente estudo, foi possível observar que as bactérias já existentes no solo foram capazes de infectar eficientemente as raízes de mucuna-preta. Em geral, as leguminosas utilizadas como adubo verde têm o potencial de contribuir para N do solo e aumentar os rendimentos das culturas posteriores através da fixação simbiótica de  $N_2$ . Houngnandan *et al.* (2000) relatam que, muitas vezes, a mucuna nodula naturalmente, em solos da savana de Benin, e são capazes de fixar o  $N_2$  atmosférico, portanto, contribuem para a disponibilidade de N no solo.

O teor de N total da parte aérea de todos os tratamentos inoculados e a testemunha absoluta não diferiu do tratamento com nitrogênio mineral. Do mesmo modo não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na produção de matéria seca da parte aérea em condições não esterilizadas (vasos com solo). Lima *et al.* (2012), que encontraram além de nodulação abundante, isolados que proporcionaram acúmulo de N na parte aérea igual ao das plantas de mucuna-cinza, inoculadas com a estirpe de referência (Tabela 12).

Em sistemas que utilizam a adubação verde, a associação rizóbio-leguminosa bem sucedida pode trazer vantagens para a fixação biológica de nitrogênio, pois esta promoverá benefícios para a utilização desta espécie como adubo verde. A FBN em adubo verde vantajosa porque essas leguminosas desenvolvem-se com baixa utilização de insumos e disponibilizam o nitrogênio e outros nutrientes para a cultura subsequente. (RIBEIRO JUNIOR; RAMOS, 2006).

Esses resultados mostram que é possível selecionar isolados de rizóbios que estabeleçam simbiose com a planta hospedeira e também sejam competitivos com os rizóbios nativos do solo.

TABELA 12. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio total da parte aérea de mucuna-preta [*Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Holland], inoculadas com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em vasos com solo não esterilizados

Tratamentos	Número de nódulos (n° planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea (g/kg)	Eficiência relativa (%)
		Nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
----- vasos com solo (não esterilizados) -----					
CPAO 2.3 CMIMP - B	28 a	178 b	4,36 a	25,5 b	79 a
CPAO 93.1	20 b	167 b	3,95 a	26,4 b	71 a
CPAO 66.1	30 a	147 b	4,10 a	26,8 b	74 a
CPAO 124.2	16 bc	323 a	5,51 a	26,0 b	99 a
SEMIA 6158	20 b	177 b	4,04 a	25,5 b	73 a
Test. absoluta	18 bc	238 ab	5,01 a	26,9 b	90 a
Test. nitrogenada	13 c	29 c	5,55 a	34,7 a	100 a
CV%	16	41	27	13	27

$$\text{*Eficiência relativa} = \frac{\text{MPAS}_{\text{inoculado}}}{\text{MPAS}_{\text{N mineral}}} \times 100$$

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste e Duncan a 5% de probabilidade. Valores médios de cinco repetições.

- **Mucuna-cinza - *Mucuna nivea* L. (D.C.)**

Nos ensaios em vasos com solo, os tratamentos inoculados com isolados nativos mostraram-se semelhantes aos inoculados com ambas as estirpes recomendadas comercialmente (SEMIA 6157 e SEMIA 6158) quanto à quantidade de nódulos formados nas plantas de mucuna-cinza (Tabela 13).

A formação dos nódulos nas raízes das plantas de mucuna está relacionada à competitividade da estirpe de rizóbio. Portanto, a alta competitividade das estirpes de rizóbios inoculadas é tão importante quanto a sua eficiência simbiótica. A boa competitividade de estirpes eficientes em fixar o nitrogênio atmosférico, com relação às estirpes nativas do solo, pode aumentar significativamente a produção de leguminosas (RAPOSEIRAS *et al.*, 2006; BALA; GILLER, 2006).

O isolado CPAO 117.1 apresentou número de nódulos superior ao tratamento com N mineral (20mg de N/planta, semanalmente), quanto aos demais tratamentos não houve diferenças estatísticas significativas (Tabela 13).

Os tratamentos inoculados com rizóbios não apresentaram diferenças entre si, quanto à matéria seca de nódulos, nem entre a testemunha sem inoculação (Testemunha absoluta), porém, estes se mostraram superiores ao tratamento com nitrogênio mineral (Tabela 13).

Segundo Lima (2009), a eficiência de uma determinada bactéria na planta hospedeira é medida em um conjunto de variáveis (número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea), mas se expressa mais claramente no N total acumulado na parte aérea das plantas de mucuna. Porém, observa-se na tabela 13 que não houve diferenças significativas entre os tratamentos quanto à N total acumulado na parte aérea de plantas de mucuna.

Assim, como os demais parâmetros, a eficiência relativa não apresentou diferenças significativas nos tratamentos inoculados com rizóbios, havendo diferenças apenas entre o tratamento não inoculado (Testemunha absoluta) e o tratamento com nitrogênio mineral (Testemunha nitrogenada).

TABELA 13. Número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio da parte aérea de mucuna-cinza (*Mucuna nivea* (L.) D.C.) inoculada com diferentes estirpes/isolados de rizóbio sob condições controladas em vasos com solo não esterilizados.

Tratamentos	Número de nódulos (n° planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca		N total da parte aérea (g/kg)	Eficiência relativa (%)
		nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
----- vasos com solo (não esterilizados) -----					
CPAO 116.3	24 ab	113 a	3,70 ab	22,1 a	82 ab
CPAO 118.1	26 ab	153 a	3,69 ab	24,1 a	82 ab
CPAO 117.1	31 a	110 a	3,76 ab	24,2 a	83 ab
CPAO 1.1 MC-C	22 ab	157 a	3,90 ab	22,4 a	86 ab
SEMIA 6158	23 ab	111 a	3,85 ab	23,6 a	85 ab
Test. absoluta	24 ab	111 a	3,40 b	24,7 a	75 b
Test. nitrogenada	16 b	17 b	4,52 a	27,1 a	100 a
CV%	31	27	13	13	13

$$\text{*Eficiência relativa} = \frac{\text{MPAS}_{\text{inoculado}}}{\text{MPAS}_{\text{N mineral}}} \times 100$$

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Valores médios de cinco repetições.

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, há necessidade de estudos posteriores com os isolados identificados como promissores neste estudo, em condições não controladas de campo. Isso irá contribuir para a seleção de estirpes mais eficientes no processo de fixação biológica de nitrogênio e mais adaptadas às condições edafoclimáticas de Mato Grosso do Sul. Tais estudos a campo iriam contemplar as três etapas de seleção de estirpes de rizóbios exigidas pelo MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e contribuir para futuras recomendações de inoculantes para espécies de leguminosas utilizadas como adubo verde (MAPA, 2014).

#### **4.4 Conclusões**

Os isolados de rizóbios nativos de solos de Mato Grosso do Sul foram capazes de estabelecer uma simbiose efetiva com diferentes espécies de leguminosas utilizadas como adubo verde.

Para crotalária pode-se destacar o isolado CPAO 86.1, por apresentar um desempenho superior quando comparado com os demais tratamentos avaliados.

Na inoculação de rizóbios nativos do Mato Grosso do Sul em feijão-de-porco, pode-se destacar os isolados CPAO 104.3 e CPAO 76.2, assim como CPAO 2.1CMIGU, para inoculação em guandu.

Os isolados CPAO 124.1 e CPAO 117.1 destacaram-se na inoculação em mucuna-preta [*Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Holland] e mucuna-cinza [*Mucuna nivea* L. (D.C.)] respectivamente, podendo ser considerados promissores para a produção de inoculantes mais eficientes para estas espécies.

## Referências

ALCÂNTARA, F. A.; NETO, A. E. F.; PAULA, M. B.; MESQUITA, H. A.; MUNIZ, J. A. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um latossolo vermelho- escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.277-288, 2000.

ALVES, S. M. C.; ABOUD, A. C. S.; RIBEIRO, R. L. D.; ALMEIDA, D. L. Balanço do nitrogênio e fósforo em solo com cultivo orgânico de hortaliças após a incorporação de biomassa de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p.1111-1117, 2004.

ANTONIO, L.; SOUZA, P. R.; SILVA, R. F.; SILVA, E. R. S. Seleção preliminar de rizóbios para inoculação em leguminosas utilizadas como adubo verde. **Cadernos de Agroecologia**, v.5, p.1-5, 2010.

BALA, A. e GILLER, K. E. Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 76, p.319–330, 2006.

BERGENSEN, F. J.; BROCKWELL, J.; GIBSON, A. H.; SCHWINGHAMER, E. A. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. **Plant and Soil**, v. 46, p.3-16, 1971.

BROCKWELL, J. Can inoculant strains ever compete successfully with established soil populations? In: GIBSON, A. H.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Current perspectives in nitrogen**. Amsterdam: North Holland/Elsevier, 1981. p. 277-315.

CALEGARI, A.; MONDARDO, A.; BULISANI, E. A.; WILDNER, L. P.; COSTA, M. B. B.; ALCÂNTARA, P. B.; MIYASAKA, S.; AMADO, J. T. Aspectos gerais da adubação verde. In: COSTA, M. B. B. (Coord.). **Adubação verde no sul do Brasil**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1993, p.279-297.

CARVALHO, F. G.; SELBACH, P. A.; APOLINO, J. N. S. Especificidade hospedeira de variantes de *Bradyrhizobium* spp. em soja (cvs Peking e Clark), caupi e guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.2701-2708, 2008.

CERETTA, C. A.; AITA, C.; BRAIDA, J. A.; PAVINATO, A. e SALET, R. L. Fornecimento de nitrogênio por leguminosas na primavera para o milho em sucessão nos sistemas de cultivo mínimo e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p.215-220, 1994.

COSTA, F. M.; FIDELYS, Z.; MARTINS, R. F.; SILVA, M. e FEIDEN, A. Isolamento e caracterização de colônias de rizóbio em nódulos de leguminosas na Borda Oeste do Pantanal: resultados preliminares. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.3, p.153-156, 2009.

DUDA, G. P.; GUERRA, J. G. M.; MONTEIRO, M. T.; DE-POLLI, H.; TEIXEIRA, M. G. Perennial herbaceous legumes as live soil mulches and their effects on C, N and P of the microbial biomass. **Scientia Agricola**, v.60, p.139-147, 2003.

FARIA, S. M. e FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies de leguminosas arbóreas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 16p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, n.158).

FERNANDES, M. F.; FERNANDES R. P. M.; HUNGRIA M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.38, p.835-842, 2003.

FERREIRA, E. P. B.; MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M. MENDES, I. C.; ARAÚJO, J. L. S.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ARAÚJO, A. P. Contribuições para a melhoria da eficiência da fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro comum no Brasil. **Tópicos de Ciência do Solo**, v.8, p.251-291, 2013.

GUERRA, J. G. M.; NDIAYE, A.; ASSIS, R. L.; ESPINDOLA, J. A. A. Uso de plantas de cobertura na valorização de processos ecológicos em sistemas orgânicos de produção na região fluminense. **Revista Agriculturas**, v.4, p.38-50 2007.

HOUNGNANDAN, P.; SANGINGA, N., WOOMER P.; VANLAUWE, B.; VAN CLEEMPUT, O. Response of *Mucuna pruriens* to symbiotic nitrogen fixation by rhizobia following inoculation in farmers' fields in the derived savanna of Benin. **Biology and Fertility of Soils**, v.30 p.558–565, 2000.

HUNGRIA, M. e BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, J. R.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2001. 48p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331 p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p.927-939, 2006.

LIMA, A. A. **Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna**. 2009. 92p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S., NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M.; GUERRA J. G. M.; RUMJANEK N. G.; XAVIER G.

R. Diversidade e Capacidade Simbiótica de Rizóbios Isolados de Nódulos de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p.337-348, 2012.

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

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa Nº 13, de 24/03/2011. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/>>. Acesso em 22/04/2014.

MATHEUS, G. P. e WUTKE, E. B. Espécies de leguminosas utilizadas como adubo verde. **Pesquisa & Tecnologia**, v.3, p.1-15, 2006.

MELO, S. R. e ZILLI J. E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p.1177-1183, 2009.

NASCIMENTO, L. R. S.; SOUSA, C. A.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SAMPAIO, E. V. S. B. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, p.36-42, 2010.

NORRIS, D. O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v.29, p.214-235, 1964.

OLIVEIRA, F. A.; CASTRO, A. S. O.; MARTINS, N. M.; BARBOSA, P. M. G.; F. M. MERCANTE. Seleção de rizóbios nativos de solos de Mato Grosso do Sul para inoculação em espécies de adubo verde. **Cadernos de Agroecologia**, v.7, p.1-5, 2012.

PAULO F. S.; NOSOLINE S. M.; MICHEL, D. C.; LEITE, J.; RUMJANEK N. G.; XAVIER G. R. Promoção do crescimento de plantas de *Crotalaria ochroleuca* por bactérias isoladas de solo de um sistema de produção agroecológica. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, p.1-5, 2011.

PAVANELLI, L. E. e ARAÚJO, F. F. Fixação Biológica de Nitrogênio em soja em solos cultivados com pastagens e culturas anuais do oeste paulista. **Bioscience Journal**, v. 25, p.21-29, 2009.

PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. (Ed.) **Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kuwer Academic Publishers, 2000, 700 p.

PEREIRA, J. C.; VIDOR, C.; LOVATO, P. E.; PENTEADO, A. F. Eficiência e capacidade competitiva de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* em feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.1073-1080, 1991.

PERIN, A.; SANTOS, R. H. S.; URQUIAGA, S.; GUERRA, J. G. M. e CECON, P. R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p.35-40, 2004.

RAPOSEIRAS, R.; MARRIEL, I. E.; MUZZI, M. R. S.; PAIVA, E.; PEREIRA FILHO, I. A.; CARVALHAIS, L. C.; PASSOS, R. V. M.; PINTO, P. P.; SÁ, N. M. H. de. *Rhizobium* strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 439-447, 2006.

RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. e RAMOS, M. L. G. Fixação biológica de nitrogênio em espécies para adubação verde. In: CARVALHO, A. M. e AMABILE, R. F. (Ed.). **Cerrado: Adubação verde**. Planaltina: Embrapa Cerrados; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006, 171-209.

ROSOLEM, C. A.; CALONEGO, J. C.; FOLONI, J. S. S. Lixiviação de potássio da palha de espécies de cobertura de solo de acordo com a quantidade de chuva aplicada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27 p. 355-362, 2003.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J. G.; PERRET, X.; ANTOUN, H. E MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p.323-378, 2002.

SIKORA, S.; REDŽEPOVIĆ, S.; PEJIĆ; KOZUMPLIK, V. Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* field population revealed by RAPD fingerprinting. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p.527–531, 1997.

SILVA , F. A. S. e AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, p.71-78, 2002.

SILVA, G.; LIMA, A.; NOSOLINE, S.; RUMJANEK, N.; XAVIER, G. Seleção de inoculante rizobiano para feijão-de-porco. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, p.1232-1235, 2007.

SOARES, A. L. L.; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, P. A. R. P.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B. e MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II – Feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30 p.803-811, 2006.

THIES, J. E.; BOHLOOL, B. B.; SINGLETON, P. W. Sobgrups of cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus*

*lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1540-1545, 1991.

TORO, N. Nodulation competitiveness in *Rhizobium*-legume symbiosis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, p.157-162, 1996.

VALARINI, M. J. e GODOY R. Contribuição da fixação simbiótica de nitrogênio na produção de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Scientia Agricola**, v.51 p.500–504, 1994.

VARGAS, M. A. T.; PERES, J. R. R.; SUHET, A. R. Fixação de N<sub>2</sub> por leguminosas forrageiras e de condicionador de solo em solos de cerrados. In: **Adubação verde no Brasil**. Campinas: Fundação Cargil, 1984. p.50-63.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. International Biological Programme, 1970. 164p.

YOU, Z. MARUTANI, M. D.; BORTHAKUR. Diversity among *Bradyrhizobium* isolates nodulating yardlong bean and sunnhemp in Guam. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 577-584, 2002.

## 5. CAPÍTULO III: Diversidade fenotípica de rizóbios nativos solos do Mato Grosso do Sul isolados de diferentes espécies de adubo verde

**Resumo** – O estudo da diversidade de rizóbios é importante para a seleção de bactérias mais eficientes que nodulam leguminosas, utilizadas como adubo verde. O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfofisiologicamente os isolados de rizóbios nativos de solos de Mato Grosso do Sul provenientes de diferentes espécies de adubos verdes. Foram realizadas avaliações com colônias puras de rizóbio isolados de solos de Mato Grosso do Sul, além de quatro estirpes recomendadas para a produção de inoculantes comerciais: SEMIA 6145 (*Bradyrhizobium* spp.), SEMIA 6156 (*Bradyrhizobium* spp.), SEMIA 6157 (*Bradyrhizobium* spp.) e SEMIA 6158 (*Bradyrhizobium elkanii*). Os isolados foram avaliados em meio YMA (yeast-mannitol-agar), quanto a algumas características culturais: manifestação do crescimento; tamanho (diâmetro das colônias); alteração do pH no meio; forma, elevação, borda e superfície da colônia; produção de muco; consistência da massa de crescimento; detalhes ópticos; Cromogênese da colônia. Foi construída uma matriz de similaridade a partir das características fenotípicas avaliadas, sendo realizada uma análise de agrupamento utilizando o método UPGMA e o coeficiente de similaridade Simple Matching. Os isolados de rizóbios nativos de solos de Mato Grosso do Sul apresentaram diversidade entre si e formaram grupos com as estirpes recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil (SEMIA).

**Palavras-chave:** caracterização morfofisiológica; *Bradyrhizobium* spp. e leguminosas.

**Abstract** - The study of the diversity of rhizobia is essential for the selection of more efficient rhizobia nodulating legumes used as green manure. The objective of this work was the characterization of morphophysiological native rhizobia from different species of green manures. Reviews with pure colonies of native rhizobia isolated from soils of Mato Grosso do Sul, along with four recommended for the production of inoculants SEMIA 6145 (*Bradyrhizobium* spp.), SEMIA 6156 (*Bradyrhizobium* spp.), SEMIA 6157 strains (*Bradyrhizobium* spp.) and SEMIA 6158 (*Bradyrhizobium elkani*). The isolates were evaluated in YMA (yeast-mannitol agar), for some cultural characteristics: Manifestation of growth, size (diameter of colonies); changing the pH in the middle; shape, elevation, edge and surface of the colony; production mucus; consistency of the mass growth; optical details; coloration of the colony. A similarity matrix was constructed from the measured phenotypic characteristics and a cluster analysis was performed using the UPGMA method and the Simple Matching Coefficient similarity with isolates native rhizobia in soils of Mato Grosso do Sul, showed diversity among themselves and formed groups with the recommended strains for the production of inoculants in Brazil (SEMIA).

**Key words:** Morphophysiological characterization; *Bradyrhizobium* spp. and legumes

## 5.1 Introdução

A adubação verde é uma prática fornecedora de matéria orgânica para o solo e as principais plantas utilizadas para essa prática são as leguminosas, por apresentarem características peculiares, como: adaptação às condições adversas, produção de grande quantidade de biomassa verde e seca; possuem um sistema radicular profundo e principalmente por associarem-se simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio (BUZINARO *et al.*, 2009; ROSSI; CASTRO, 2012).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo mediado por microrganismos diazotróficos que transformam o N<sub>2</sub> atmosférico em compostos assimiláveis pelas plantas, através de um complexo enzimático denominado nitrogenase (REIS *et al.*, 2006). Segundo Graham e Vance (2003), a simbiose entre leguminosas e rizóbios é a fonte mais importante de nitrogênio (N) fixado biologicamente em sistemas agrícolas. Alguns trabalhos na literatura relatam a capacidade que esse grupo de plantas possui em disponibilizar N no sistema, quando submetidas à inoculação.

Moreira (2008) menciona que todas as bactérias que nodulam leguminosas têm sido facilmente cultiváveis, o que permite não só conhecer, mas também utilizá-las em benefício do uso agrícola. O conhecimento das características culturais desses microrganismos é importante para a preservação da biodiversidade, além de identificar e caracterizar os isolados promissores para o processo de FBN em leguminosas.

Embora alguns trabalhos venham sendo realizados para indentificação de estirpes de rizóbios eficientes no processo de FBN com leguminosas utilizadas como adubo verde (LIMA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2003), existe uma demanda crescente no sentido de se obter bactérias com maior eficiência simbiótica e capazes de competir com os rizóbios nativos do solo.

Tem sido verificado que estirpes recomendadas comercialmente para a produção de inoculantes para adubos verdes no Brasil têm mostrado respostas variáveis á inoculação. Estas estirpes foram originalmente isoladas há 40 anos e em outras leguminosas hospedeiras (LIMA, 2009). Dessa forma, a busca por

identificação de estirpes promissoras para a FBN em adubos verdes torna-se estratégica e de grande importância para a melhoria dos sistemas simbióticos.

Segundo Straliozzo e Rumjaneck (1999), o estudo da biodiversidade de rizóbios tem aplicações agrícolas importantes, tanto em termos de manejo cultural, visando implementar a sobrevivência de populações mais eficientes e mesmo mais específicas, quanto da obtenção de germoplasma mais adaptado aos diferentes tipos de solos.

Neste sentido a seleção de estirpes de rizóbio passa por diferentes etapas e a caracterização fenotípica é uma delas, as observações podem auxiliar na identificação de isolados que se apresentem com capacidade competitiva frente aos rizóbios nativos do solo, uma vez que essas características também são comumente relacionadas a sua sobrevivência em diferentes tipos de solo, como por exemplo, tempo de crescimento, modificação do pH do meio e produção de muco (LIMA, 2009; MARTINS *et al.*, 2003; FARIA; FRANCO, 2002).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi caracterizar morfofisiologicamente estirpes de rizóbios nativas de solos de Mato Grosso do Sul isolados de diferentes espécies de adubo verde, incluindo quatro estirpes recomendadas comercialmente para a produção de inoculantes comerciais.

## 5.2. Material e métodos

Foram avaliados 39 isolados de rizóbios nativos de solos do Mato Grosso do Sul de um solo classificado como Latossolo Vermelho distrófico dos municípios de Miranda/MS (Latitude: 20°14'22.90"S; Longitude: 56°21'58.38"O) e Nioaque/MS (Latitude: 21°9'32.59"S Longitude: 55°49'46.06"O), oriundos de nódulos de crotalaria (*Crotalaria juncea* L.), feijão-de-porco [*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.], guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], mucuna-cinza [*Mucuna nivea* (L.) D.C.] e mucuna-preta [*Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Holland], além de estirpes recomendadas comercialmente para a produção de inoculantes comerciais no Brasil, incluindo SEMIA 6145 (*Bradyrhizobium* spp.), SEMIA 6156 (*Bradyrhizobium* spp.), SEMIA 6157 (*Bradyrhizobium* spp.) e SEMIA 6158 (*Bradyrhizobium elkanii*). Todos os

isolados pertencem à Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Agropecuária Oeste.

As culturas puras dos isolados de rizóbios foram transferidas para placas de Petri contendo meio YMA (yeast-mannitol-agar), com azul de bromotimol e vermelho do congo, conforme Vincent (1970) e mantidas a 28°C. Após o desenvolvimento da colônia foi realizado a caracterização fenotípica dos isolados de todos os isolados.

A caracterização dos isolados foi realizada com base nos seguintes aspectos das colônias: Manifestação do crescimento: rápido (até três dias), intermediário (4 a 5 dias), lenta (6 a 9 dias) e muito lenta (acima de 10 dias); Tamanho (diâmetro das colônias) em mm, aos 3 dias após a manifestação das colônias; Alteração do pH no meio com indicador Azul de Bromotimol: (ácido, alcalino ou neutro); Forma da colônia: oval (elíptica), circular ou irregular; Elevação da colônia: plana ou convexa; Borda da colônia: lisa, ondulada ou filamentosa; Superfície da colônia: lisa ou rugosa; Produção de muco: pouca (até 1,9 mm), moderada (de 2,0 a 3,9 mm) e abundante (acima de 4,0 mm); Consistência da massa de crescimento: seca, aquosa, gomosa ou viscosa; Detalhes ópticos: translúcido ou opaco; Cromogênese da colônia em meio YMA com indicador Azul de Bromotimol: creme, amarelo, rosa ou azul; Cromogênese da colônia em meio YMA com corante Vermelho do Congo: branco, rosado, avermelhado no centro e vermelho, conforme os procedimentos operacionais padrão para a caracterização de estirpes bacterianas.

A partir dos resultados obtidos com a avaliação morfofisiológica, uma matriz de similaridade foi construída baseada nas características analisadas, de acordo com o coeficiente de Simple Matching, por meio do método UPGMA, utilizando o programa MVSP 3.2.

### **5.3. Resultados e discussão**

A Tabela 14 mostra as características fenotípicas dos isolados de rizóbios nativos dos solos do Mato Grosso do Sul e de quatro estirpes comercialmente recomendadas para a produção de inoculantes para diferentes espécies de adubos verdes no Brasil.

TABELA 14. Características culturais de isolados de rizóbios nativos de solos de Mato Grosso do Sul e estirpes de rizóbios recomendadas comercialmente para produção de inoculantes para espécies de adubo verde.

Isolados	Espécie de leguminosa hospedeira	Manifestação do crescimento <sup>(1)</sup>	pH <sup>(2)</sup>	Produção de muco <sup>(3)</sup>
CPAO 1.1 CR-A	Crotalária	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 1.2 CMICR-A	Crotalária	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 1.2 GU-B	Guandu	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 2.1 CMIGU	Guandu	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 2.1 CMIMC-B	Mucuna-cinza	Intermediária	Ácido	Moderada
CPAO 2.3 CMIMP-B	Mucuna-preta	Rápida	Neutro	Moderada
CPAO 2.3 GU-B	Guandu	Intermediária	Neutro	Abundante
CPAO 2.1CMIMC-A	Mucuna-cinza	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 2.4 GU	Guandu	Rápida	Ácido	Pouca
CPAO 3.5 GU	Guandu	Rápida	Ácido	Pouca
CPAO 4.4 GU	Guandu	Intermediária	Ácido	Pouca
CPAO 58.3	Guandu	Intermediária	Ácido	Moderada
CPAO 60.4	Guandu	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 62.4	Mucuna-preta	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 66.1	Mucuna-preta	Rápida	Ácido	Abundante
CPAO 76.2	Feijão-de-porco	Rápida	Neutro	Abundante
CPAO 77.1	Feijão-de-porco	intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 78.1	Feijão-de-porco	Rápida	Ácido	Moderada
CPAO 78.2	Feijão-de-porco	Rápida	Ácido	Pouca
CPAO 80.3	Feijão-de-porco	Intermediária	Neutro	Moderada
CPAO 82.3	Guandu	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 82.4	Guandu	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 86.1	Crotalária	Intermediária	Ácido	Pouca
CPAO 88.1	Crotalária	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 89.2	Crotalária	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 90.1	Crotalária	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 91.4	Mucuna-cinza	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 93.1	Mucuna-cinza	Intermediária	Ácido	Pouca
CPAO 101.2	Feijão-de-porco	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 104.3	Feijão-de-porco	Rápida	Ácido	Moderada
CPAO 107.2	Guandu	Intermediária	Ácido	Moderada
CPAO 108.1	Guandu	Intermediária	Ácido	Moderada
CPAO 109.2	Guandu	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 110.2	Guandu	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 111.2	Crotalária	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 113.2	Crotalária	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 114.1	Crotalária	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 114.4	Crotalária	Intermediária	Ácido	Moderada
CPAO 115.2	Crotalária	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 117.1	Mucuna-cinza	Intermediária	Ácido	Abundante
CPAO 118.1	Mucuna-cinza	Rápida	Ácido	Abundante
CPAO 124.2	Mucuna-preta	Intermediária	Ácido	Abundante
SEMIA 6145	Crotalária	Intermediária	Ácido	Abundante
SEMIA 6156	Crotalária, guandu	Intermediária	Ácido	Abundante
SEMIA 6157	Guandu,	Intermediária	Ácido	Moderada

	mucuna-preta, feijão-de-porco, mucuna-cinza			
SEMIA 6158	Mucuna-preta, mucuna-cinza, feijão-de-porco	Intermediária	Ácido	Moderada

<sup>(1)</sup>Manifestação do crescimento: Rápida: até 3 dias; Intermediária: 4 a 5 dias; Lenta: 6 a 9 dias e muito lenta: acima de 10 dias. <sup>(2)</sup>Alteração do pH no meio YMA com o indicador Azul de Bromotimol: ácido (amarelo); neutro (sem alteração de cor); alcalino (azul). <sup>(3)</sup>A produção de muco está relacionada ao tamanho da colônia: Pouca (até 1,9 mm); moderada (de 2,0 a 3,9 mm) e abundante (acima de 4,0 mm).

Dos 39 isolados avaliados, 12 apresentaram crescimento rápido (Tabela 14), uma característica importante observada nos estudos de população de rizóbio por Van Gestel *et al.* (1991). Esses autores verificaram que em solos de áreas muito secas a população de rizóbio de crescimento rápido apresenta resistência similar aos microrganismos nativos. O crescimento rápido parece conferir certa vantagem competitiva na rizosfera, devido à maior competição das estirpes de rizóbios com outros microrganismos presentes no solo (NORRIS, 1965; MARTINS *et al.*, 1997b).

Xavier *et al.* (2007), ao avaliar o tempo de crescimento e tolerância de rizóbios à salinidade, observaram que os isolados que apresentaram crescimento rápido e produção de muco apresentaram-se resistentes a níveis crescentes de NaCl. A maioria dos isolados com crescimento rápido, de modo geral, apresentou reação ácida em meio de cultura; essa característica pode estar associada à maior capacidade de adaptação a essa condição (RAHMEIER, 2009).

A maioria (91,11%) dos isolados avaliados apresentou coloração amarela do meio de cultura YMA, com azul de Bromotimol, ou seja, acidificaram o meio de cultura conforme o seu desenvolvimento (Tabela 14). Segundo Fernandes Junior e Reis (2008), a tolerância à acidez é uma importante característica das estirpes de rizóbio, sendo utilizada como classificatória para a seleção de estirpes de rizóbios.

Em estudos com rizóbios isolados de duas regiões distintas, uma semiárida e outra na zona da mata, Figueiredo *et al.* (1996) observaram que a maioria dos isolados da região semiárida apresentou crescimento rápido, podendo ser considerada uma estratégia de sobrevivência desses microrganismos nessa condição peculiar (FREITAS *et al.* 2007; SANTOS *et al.*, 2007).

Em trabalhos sobre a diversidade de rizóbios obtidos de feijão-caupi, no Rio Grande do Norte, Medeiros *et al.* (2009) verificaram que há uma elevada diversidade morfológica da população nativa de rizóbio em regiões semiáridas. Esses autores ainda relatam que o meio com que elas se utilizam para adaptar-se a essas condições é a produção de muco que também está associada à resistência ou tolerância a altas temperaturas (OSA-AFIANA; ALEXANDER, 1982).

Na Figura 3, está apresentado o fenograma obtido por meio da análise de agrupamento, utilizando o método UPGMA e o coeficiente de similaridade Simple Matching, cuja matriz de similaridade foi construída baseada na observação de características fenotípicas. Incluíram-se neste fenograma as estirpes de rizóbio recomendadas comercialmente para a inoculação em diferentes espécies utilizadas como adubo verde (SEMIA 6156, SEMIA 6157 e SEMIA 6145 de *Bradyrhizobium* spp. e SEMIA 6158 de *Bradyrhizobium elkanii*), além de 39 isolados de rizóbio obtidos a partir de estudos de seleção e eficiência simbiótica de rizóbios nativos do Mato Grosso do Sul.

A Figura 3 mostra a formação de dois grupos distintos revelando a diversidade fenotípica dos isolados de rizóbio nativos de solos de MS com diferentes níveis de similaridade. Essa alta diversidade de rizóbios encontrada em solos de Mato Grosso do Sul pode contribuir para seleção de estirpes melhor, adaptadas, competitivas e aptas à FBN nessas condições de solo e clima.

No primeiro agrupamento, nota-se que o isolado CPAO 80.3, simbionte de feijão-de-porco [*Canavalia ensiformes* (L.) D.C.], formou um grupo irmão com os isolados: CPAO 62.4; CPAO 114.4; CPAO 82.4 e CPAO 60.4 e ainda incluíram-se nesse grupo as estirpes comerciais SEMIA 6156 e SEMIA 6157.

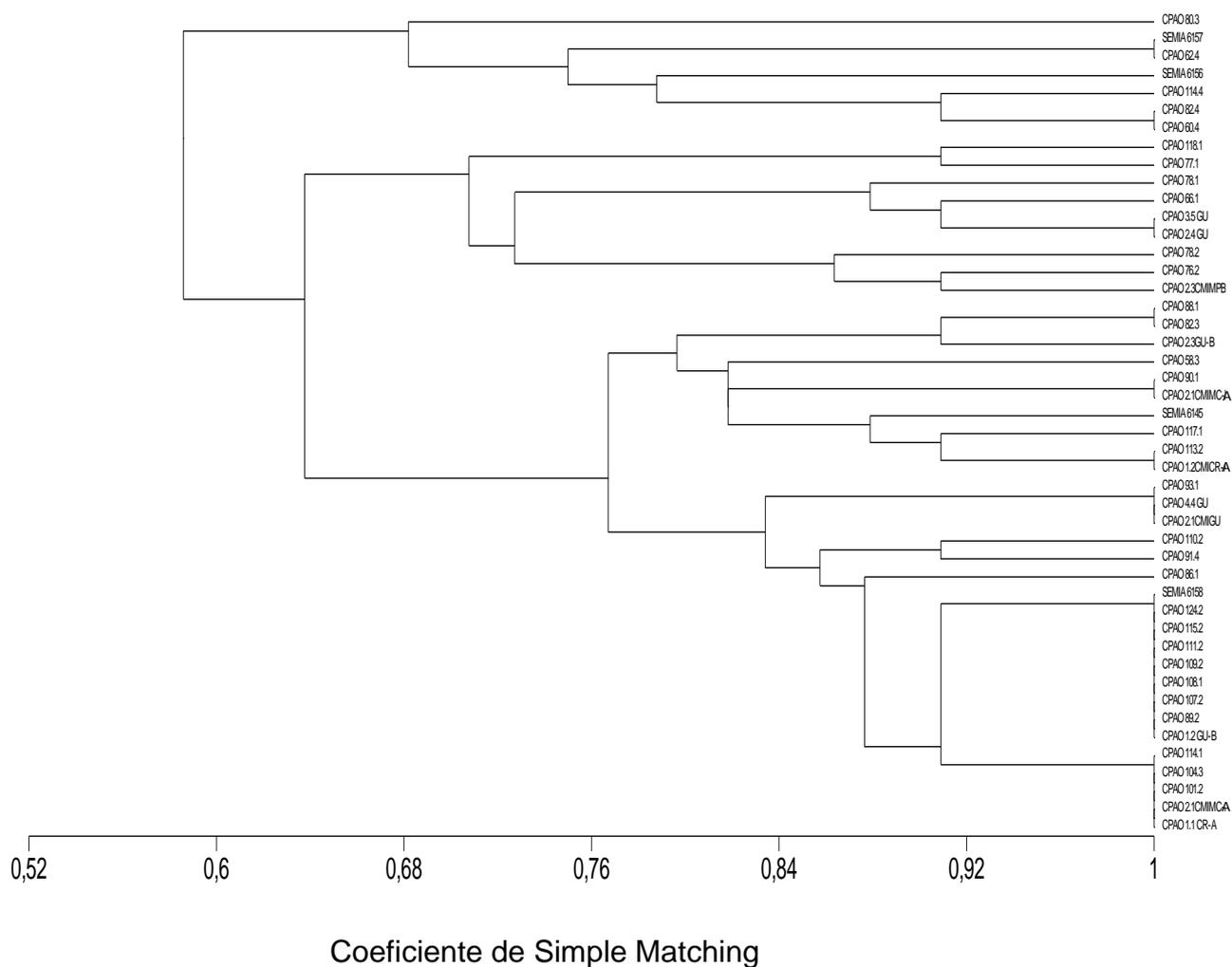
O segundo grupo é composto pela maioria dos isolados caracterizado por elevada heterogeneidade, apresentando considerável diversidade fenotípica entre as bactérias. Importante ressaltar que o segundo grupo foi composto por dois sub grupos, sendo que um destes, os isolados CPAO 118.1; CPAO 77.1; CPAO 78.1; CPAO 66.1; CPAO 3.5 GU; CPAO 2.4GU; CPAO 78.2; CPAO 76.2 e CPAO 2.3 CMIMP-B não se agruparam com nenhuma das estirpes de referência (SEMIA) recomendadas para a produção de inoculantes.

Pitard *et al.* (2006) observaram que as características fenotípicas de isolados de rizóbios obtidos de *Leucaena leucocephala* formaram vários grupos sem similaridade com estirpes-padrão.

Por outro lado, o agrupamento de bactérias contendo a estirpe de referência SEMIA 6145 formou um grupo irmão em relação ao agrupamento dos isolados de adubo verde que contém a estirpe de referência SEMIA 6158. Foi possível observar que os isolados CPAO 124.2; CPAO 115.2; CPAO 111.2; CPAO 109.2; CPAO 108.1; CPAO 107.2; CPAO 89.2 e CPAO 1.2GU-B não apresentaram diferença fenotípica em relação à SEMIA 6158. O mesmo ocorreu com os isolados CPAO 114.1; CPAO 104.3; CPAO 101.2; CPAO 2.1 CMIMC-A e CPAO 1.1 CR-A que não apresentaram distância fenotípica entre si.

A heterogeneidade fenotípica dos rizóbios encontradas neste estudo contribui em estudos que permitem não só identificar e classificar, mas também utilizá-las em benefício do uso agrícola. Segundo Martins *et al.* (1997a), há um interesse crescente em se conhecer a diversidade de rizóbios porque esta fornece um caminho para a seleção de novos isolados capazes de nodular efetivamente leguminosas, além de tais estudos fornecerem uma forma de avaliar mudanças no ecossistema.

Nesse sentido, a caracterização de isolados de rizóbios é de fundamental importância, uma vez que estes microrganismos podem apresentar potencial para aplicação tecnológica, como no uso da fabricação de inoculantes.



**Figura 3.** Fenograma obtido pela análise das características culturais dos isolados de rizóbios simbiotes de diferentes espécies utilizadas como adubo verde.

Esses resultados podem contribuir para a seleção de estirpes mais adaptadas às condições edafoclimáticas de Mato Grosso do Sul, porém, são necessários outros estudos, principalmente, os com métodos moleculares para o estudo de comunidades dessas bactérias.

## **5.4 Conclusão**

Os isolados de rizóbios nativos de Mato Grosso do Sul apresentaram grande diversidade fenotípica e alguns isolados localizaram-se no mesmo grupo das estirpes comercialmente recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil.

## Referências

BUZINARO, T. N.; BARBOSA, J. C.; NAHAS, E. Atividade microbiana do solo em pomar de laranja em resposta ao cultivo de adubos verdes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, p.408-415, 2009.

FARIA, S. M. e FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies de leguminosas arbóreas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 16p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, n.158).

FERNANDES JÚNIOR P. I.; REIS, V. M. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008, 33p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, n.252).

FERNANDES, M. F.; FERNANDES R. P. M.; HUNGRIA M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.835-842, 2003.

FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; MEDEIROS, R.; SANTOS, C. E. R. S. Efeito da adubação com diferentes relações potássio/magnésio no jacatupé em latossolo amarelo com e sem inoculação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 20, p.49-54, 1996.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v.66, p.497-504, 2007.

GRAHAM, P. H. e VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v.65 p.93-106, 2000.

LIMA, A. A. **Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna**. 2009. 92p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S., NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M. de.; GUERRA J. G. M.; RUMJANEK N. G.; XAVIER G. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de mucuna-cinza e mucuna-anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, p.337-348, 2012.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa Nº 30, de 12 de novembro de 2010. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/>>. Acesso em 27/08/2014.

- MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p. 1005-1010, 1997b.
- MARTINS, L. M. V.; RANGEL, F. W.; XAVIER, G. R.; RIBEIRO, J. R. A.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38. p.333-339, 2003.
- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "Rizóbio"**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1997a, 14p. (Embrapa Agrobiologia, Comunicado Técnico, n.19).
- MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R. O. e BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, p.529-535, 2009.
- MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008, p.621-680.
- NORRIS, D. O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, v.22, p.143-166, 1965.
- OSA-AFIANA, L. O.; ALEXANDER, M. Clays and survival of *Rhizobium* during desiccation. **Soil Science Society of America Journal**, v.46 p.285-288, 1982.
- PITARD, R. M, STRALIOTTO, R.; BOTELHO, G. R.; BORGES, W. L. Caracterização fenotípica de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de *Leucaena leucocephala*, em diversos municípios de Mato Grosso do Sul. In: XXVII REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, XI REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, IX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO e VI REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2006, Bonito. **Anais...Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2006, p. 1-4.
- RAHMEIER, W. **Caracterização de isolados e eficiência de estirpes de rizóbios em feijão-caupi no cerrado, Gurupi – TO**. 2009. 59p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.
- REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação simbiótica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, p.154-194.

ROSSI, G. e CASTRO, P. R. C. **Ecofisiologia dos Adubos Verdes**. Piracicaba: DIBD, 2012. 70p.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, p.249-256, 2007.

VAN GESTEL, M., LADD, J. N. AMATO, M. Carbon and nitrogen mineralization from two soil of contrasting texture and microaggregate stability: influence of sequential fumigation drying and storage. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p.313-322, 1991.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. International Biological Programme, 1970. 164p.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição *in vitro*. **Revista Caatinga**, v.20, p.1-9, 2007.

## **Considerações finais**

Os estudos realizados mostram que os isolados de rizóbios nativos de Mato Grosso do Sul apresentam alto potencial para fixação biológica de nitrogênio, sendo possível identificar e selecionar isolados que estabeleçam simbiose efetiva com várias espécies de adubo verde, além de apresentarem grande diversidade fenotípica, inseridos no mesmo grupo fenotípico das estirpes comercialmente recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil.

Contudo, este estudo mostrou as primeiras etapas do processo de seleção de estirpes de rizóbio para adubos verdes, havendo a necessidade de estudos posteriores, em condições não controladas de campo, utilizando os isolados considerados promissores neste trabalho, podendo, assim, gerar contribuições para futuras recomendações para a produção de inoculantes comerciais mais eficazes para leguminosas utilizadas como adubo verde.

## **Anexos**

## Anexo I

TABELA 1. Características culturais de isolados de rizóbios nativos de solos do Mato Grosso do Sul e estirpes de rizóbios recomendadas comercialmente para inoculantes para adubo verde

Isolados	Consistência da massa de crescimento	Detalhes ópticos	Cromogênese em Azul de Bromotimol	Cromogênese em Vermelho do Congo
CPAO 1.1 CR-A	Gomosa	Opaco	Creme	Avermelhado
CPAO 1.2 CMICR –A	Gomosa	Opaco	Amarelo	Vermelho
CPAO 1.2 GU-B	Gomosa	Opaco	Amarelo	Avermelhado
CPAO 2.1 CMIGU	Aquosa	Opaco	Creme	Rosado
CPAO 2.1 CMIMC-B	Gomosa	Opaco	Creme	Rosado
CPAO 2.3 CMIMP-B	Aquosa	Translúcido	Creme	Rosado
CPAO 2.3 GU-B	Gomosa	Translúcido	Creme	Avermelhado
CPAO 2.1CMIMC – A	Gomosa	Opaco	Creme	Rosado
CPAO 4.4 GU	Gomosa	Opaco	Amarela	Rosado
CPAO 3.5 GU	Gomosa	Opaco	Amarela	Rosado
CPAO 58.3	Seca	Opaco	Creme	Vermelho
CPAO 60.4	Seca	Opaco	Creme	Vermelho
CPAO 62.4	Seca	Opaco	Amarelo	Vermelho
CPAO 66.1	Gomosa	Opaco	Amarelo	Rosado
CPAO 76.2	Gomosa	Opaco	Creme	Rosado
CPAO 77.1	Seca	Opaco	Amarelo	Vermelho
CPAO 78.1	Seca	Opaco	Amarelo	Vermelho
CPAO 78.2	Seca	Translúcido	Creme	Rosado
CPAO 80.3	Seca	Opaco	Amarelo	Avermelhado
CPAO 82.3	Gomosa	Translúcido	Creme	Avermelhado
CPAO 82.4	Seca	Opaco	Creme	Vermelho
CPAO 89.2	Viscosa	Opaco	Amarelo	Vermelho
CPAO 90.1	Aquosa	Opaco	Creme	Vermelho
CPAO 91.4	Gomosa	Translúcido	Creme	Rosado
CPAO 93.1	Aquosa	Opaco	Creme	Avermelhado
CPAO 101.2	Gomosa	Opaco	Creme	Rosado
CPAO 104.4	Gomosa	Opaco	Creme	Rosado
CPAO 107.2	Gomosa	Opaco	Amarelo	Rosado
CPAO 108.1	Viscosa	Opaco	Amarelo	Rosado
CPAO 109.2	Gomosa	Opaco	Amarelo	Avermelhado
CPAO 110.2	Gomosa	Translúcido	Amarelo	Avermelhado
CPAO 111.2	Viscosa	Opaco	Amarelo	Rosado
CPAO 111.3	Gomosa	Opaco	Amarelo	Vermelho
CPAO 113.2	Seca	Opaco	Amarelo	Vermelho
CPAO 114.1	Gomosa	Opaco	Creme	Rosado
CPAO 114.4	Seca	Opaco	Creme	Vermelho
CPAO 117.1	Gomosa	Opaco	Creme	Avermelhado
CPAO 118.1	Gomosa	Opaco	Creme	Rosado

CPAO 124.2	Aquosa	Opaco	Amarelo	Avermelhado
SEMIA 6145	Viscosa	Opaco	Amarelo	Avermelhado
SEMIA 6156	Seca	Opaco	Creme	Vermelho
SEMIA 6157	Seca	Opaco	Amarelo	Rosado
SEMIA 6158	Gomosa	Opaco	Amarelo	Rosado

TABELA 2. Características culturais de isolados de rizóbios nativos de solos do Mato Grosso do Sul e estirpes de rizóbios recomendadas comercialmente para inoculantes para adubo verde

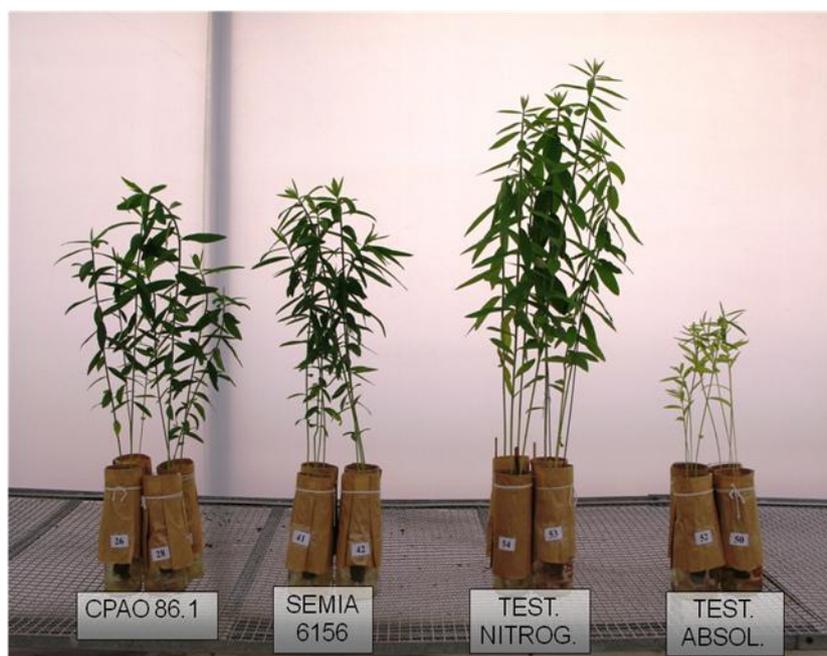
ISOLADOS	Diâmetro das colônias (mm)	Características da colônia			
		Forma	Elevação	Borda	Superfície
CPAO 1.1 CR-A	5,66	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 1.2 CMICR –A	4	Circular	Convexa	Ondulada	Lisa
CPAO 1.2 GU-B	7	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 2.1 CMIGU	3	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 2.1 CMIMC-B	4	Irregular	Plana	Ondulada	Lisa
CPAO 2.3 CMIMP-B	3	Irregular	Plana	Lisa	Lisa
CPAO 2.3 GU-B	5	Irregular	Convexa	Filamentosa	Lisa
CPAO 2.1CMIMC – A	6	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 3.5 GU	3	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 58.3	3	Circular	Convexa	Filamentosa	Lisa
CPAO 60.4	4	Irregular	Plana	Filamentosa	Rugosa
CPAO 62.4	4	Irregular	Plana	Lisa	Lisa
CPAO 66.1	4	Circular	Plana	Lisa	Lisa
CPAO 76.2	4	Circular	Plana	Lisa	Lisa
CPAO 78.1	2	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 80.3	2,33	Oval	Plana	Lisa	Rugosa
CPAO 82.3	9	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa
CPAO 82.4	4,33	Irregular	Plana	Filamentosa	Rugosa
CPAO 89.2	4,33	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 90.1	5	Irregular	Plana	Filamentosa	Lisa
CPAO 91.4	6,33	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 93.1	5	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 101.2	6,33	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 104.4	7,66	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 107.2	3	Circular	Convexa	Lisa	Lisa

CPAO 108.1	3,66	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 109.2	4,66	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 110.2	8,66	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 111.2	4	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 111.3	4	Irregular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 113.2	4	Irregular	Plana	Fila- mentosa	Lisa
CPAO 114.1	5,33	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 114.4	3	Circular	Plana	Lisa	Rugosa
CPAO 117.1	5,66	Circular	Convexa	Ondula- da	Lisa
CPAO 118.1	5	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
CPAO 124.2	5	Circular	Convexa	Lisa	Lisa
SEMIA 6145	5,33	Circular	Convexa	Ondula- da	Lisa
SEMIA 6156	5	Oval	Plana	Fila- mentosa	Lisa
SEMIA 6157	3	Circular	Plana	Lisa	Lisa
SEMIA 6158	3	Circular	Convexa	Lisa	Lisa

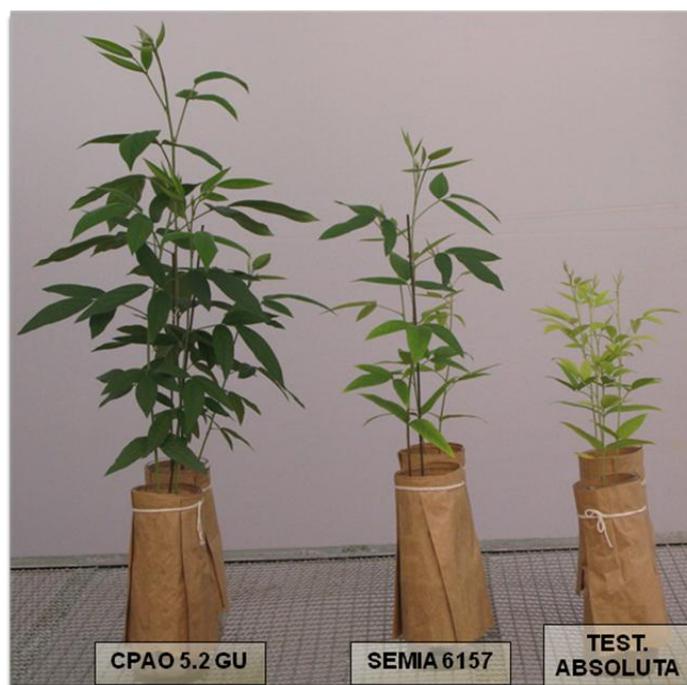
## Anexo II



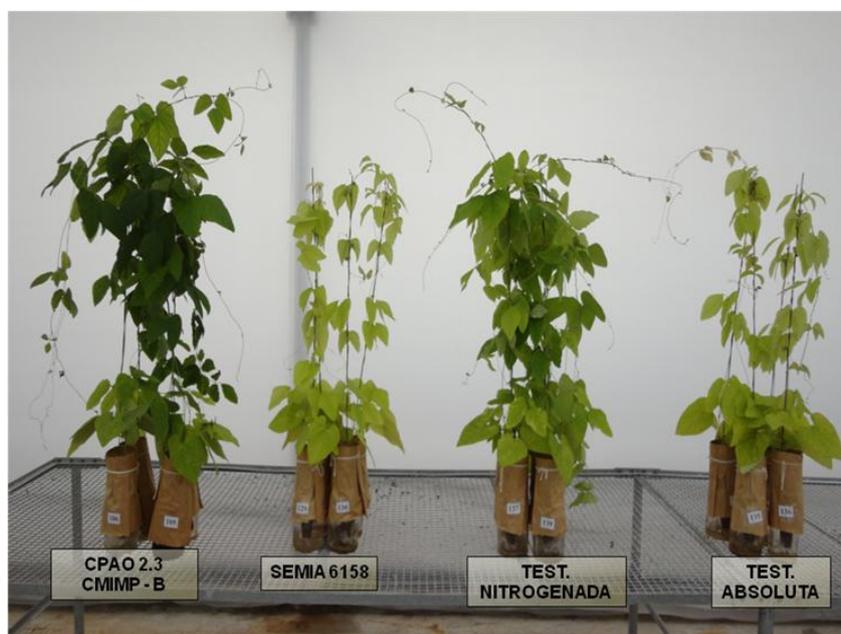
**Figura 1.** Comparação entre plantas de crotalária (*Crotalaria juncea* L.) inoculadas com rizóbios nativos dos solos de Mato Grosso do Sul (CPAO 1.2 CMICR-A) e tratamentos controles: Estirpes recomendadas comercialmente para a produção de inoculantes comerciais (SEMIA 6156), testemunha nitrogenada e testemunha absoluta (controles sem inoculação).



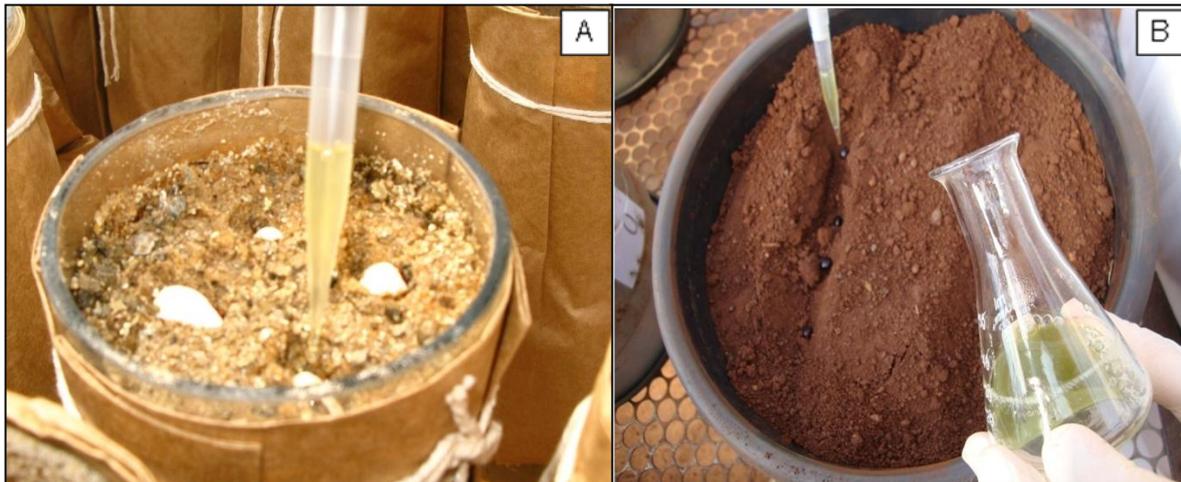
**Figura 2.** Comparação entre plantas de crotalária (*Crotalaria juncea* L.) inoculadas com rizóbios nativos dos solos de Mato Grosso do Sul (CPAO 86.1) e tratamentos controles: Estirpes recomendadas comercialmente para a produção de inoculantes comerciais (SEMIA 6156), testemunha nitrogenada e testemunha absoluta (controles sem inoculação).



**Figura 3.** Comparação entre plantas de guandú (*Cajanus cajan* L.) inoculadas com rizóbios nativos de Mato Grosso do Sul (CPAO 5.2GU) e tratamentos controles: Estirpes recomendadas comercialmente para a produção de inoculantes comerciais (SEMIA 6157), testemunha absoluta (controle sem inoculação).



**Figura 4.** Comparação entre plantas de mucuna-preta (*Mucuna atterima* L.) inoculadas com rizóbios nativos de Mato Grosso do Sul (CPAO 2.3 CMIMP - B) e tratamentos controles: Estirpes recomendadas comercialmente para a produção de inoculantes comerciais (SEMIA 6158), testemunha nitrogenada e testemunha absoluta (controles sem inoculação).

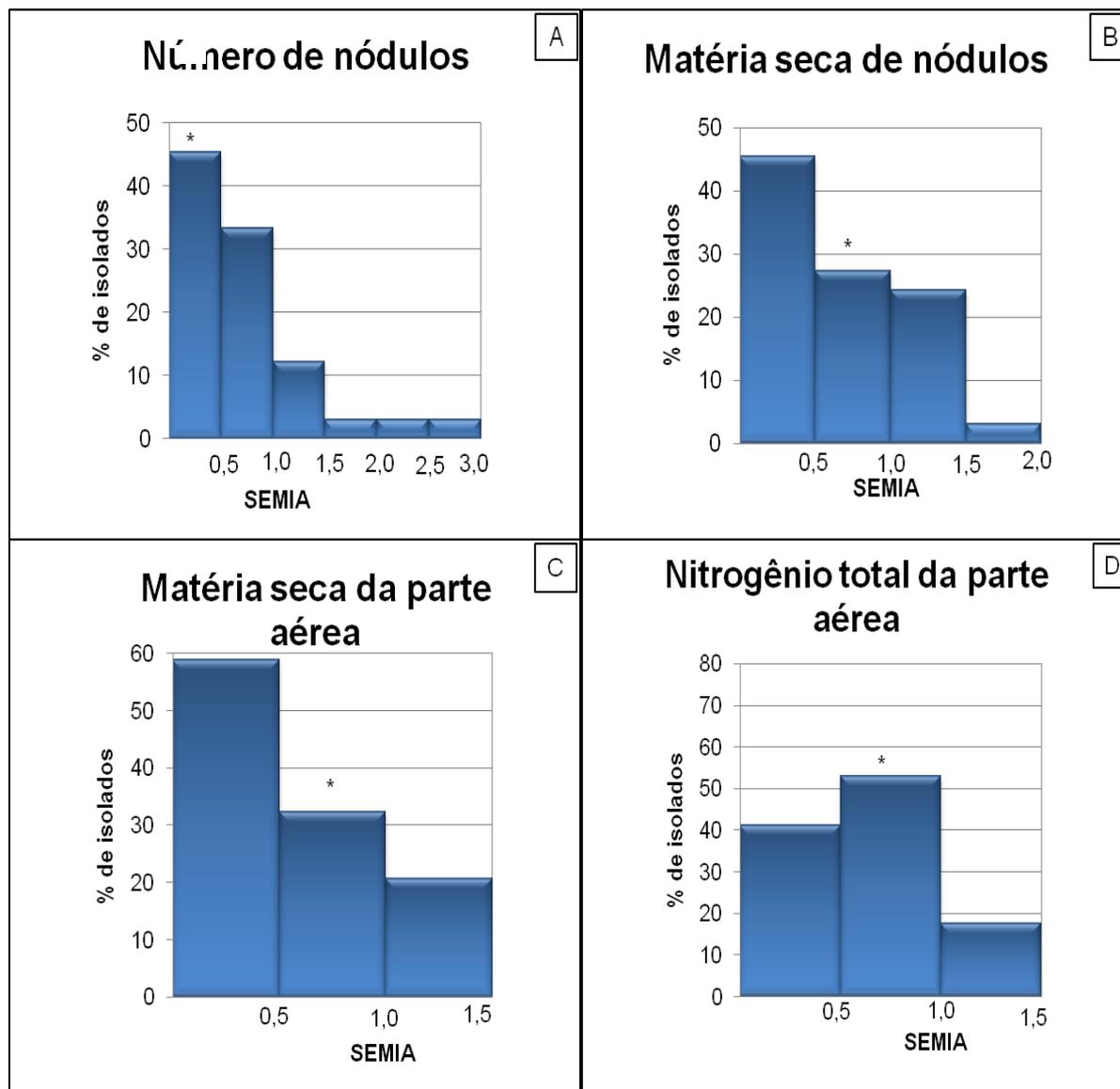


**Figura 7.** (A) Inoculação em vasos de “Leonard”, com uma mistura de areia e vermiculita (1:1, v:v) esterilizada. (B) Inoculação de rizóbios em sementes de adubos verdes em vasos com solo não esterilizados.

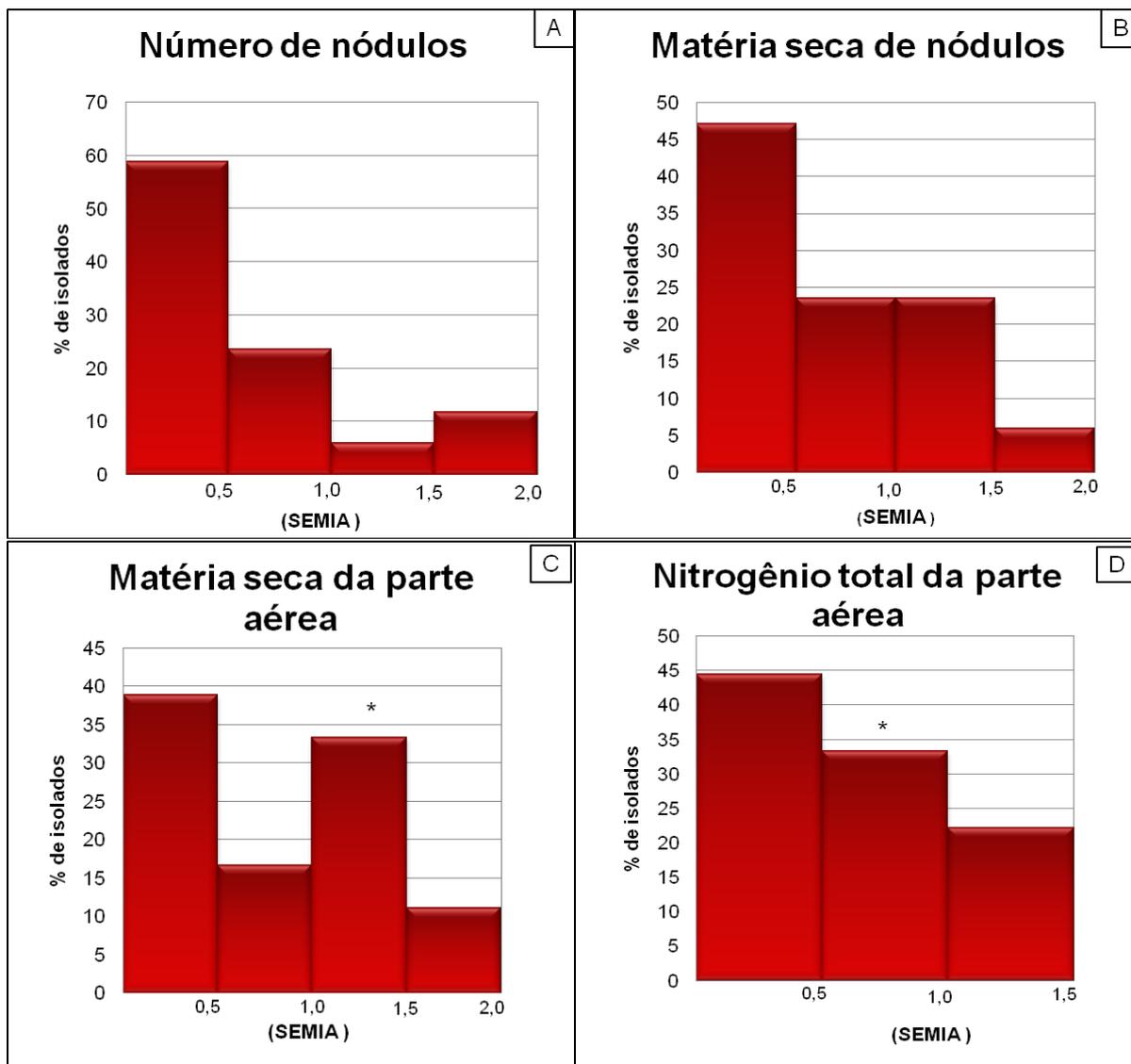


**Figura 5.** Vista parcial do ensaio em vasos com solo.

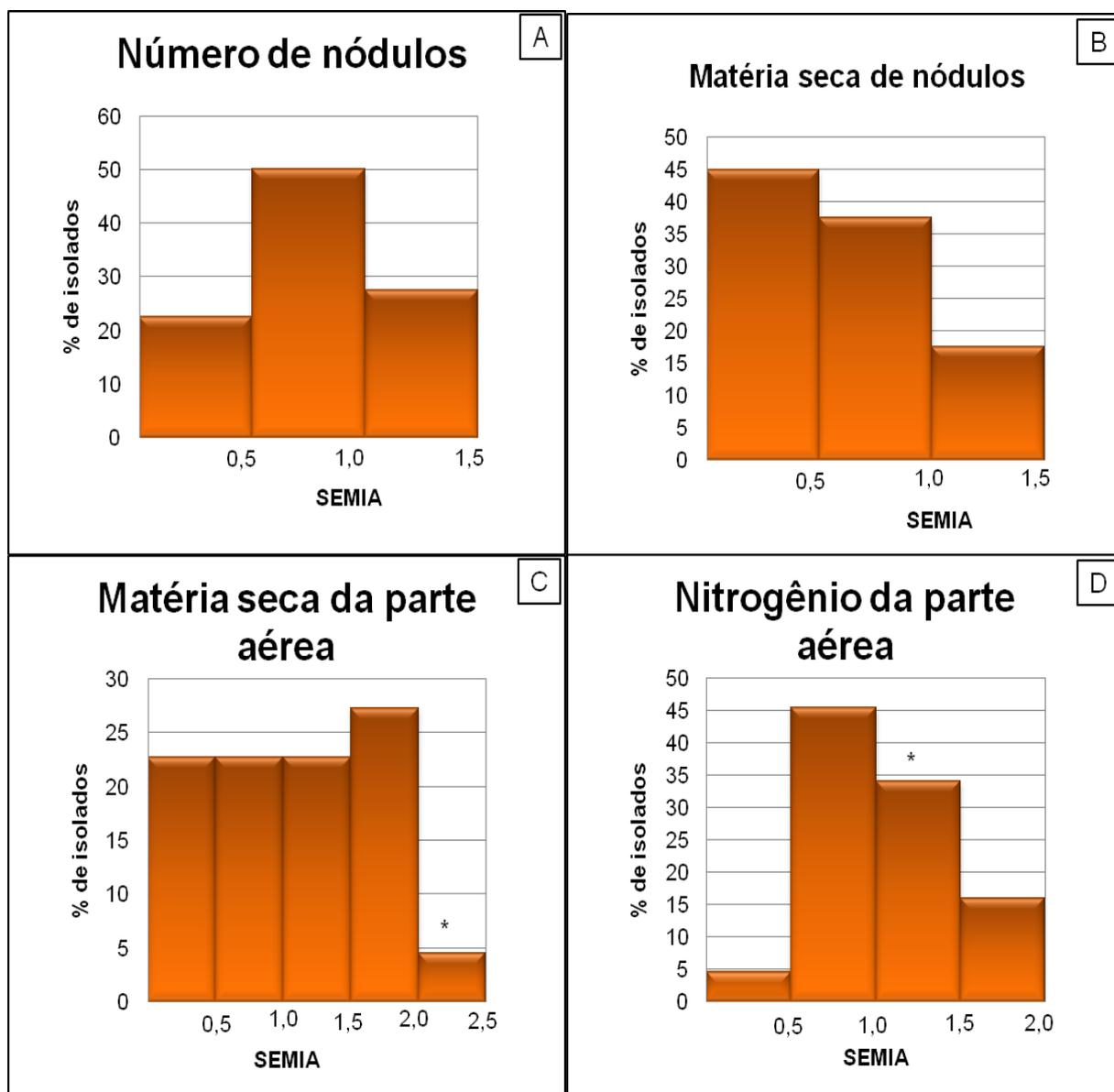
### Anexo III



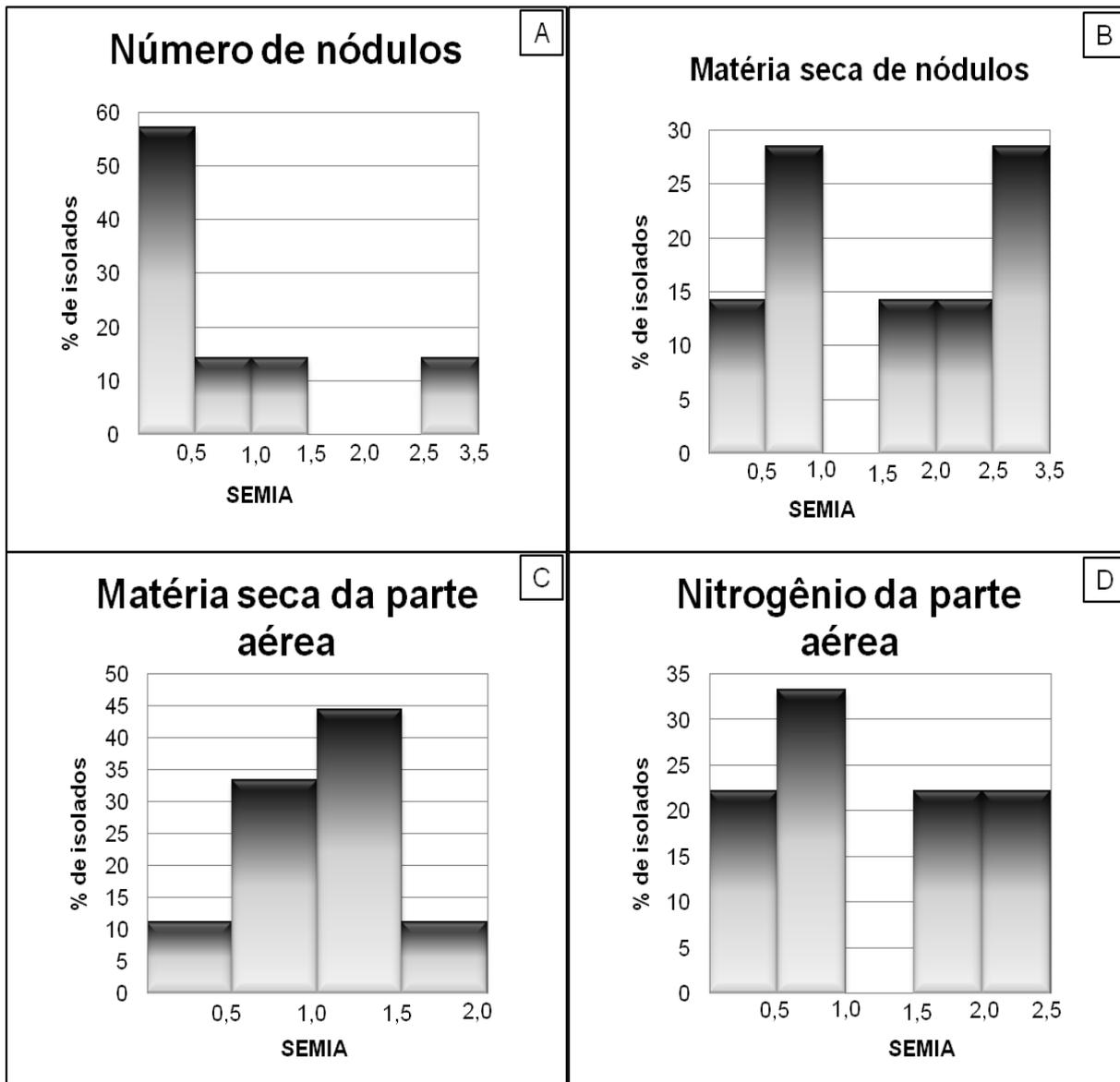
**Figura 1. (A)** Número de nódulos; **(B)** Matéria seca de nódulos; **(C)** Matéria seca da parte aérea; **(D)** Nitrogênio da parte aérea de plantas de crotalária (*Crotalaria juncea* L.) inoculadas com 21 isolados de rizóbio. Valores relativos à estirpe SEMIA 6156. \*Inclui os resultados do tratamento com N mineral (20mg/planta, semanalmente).



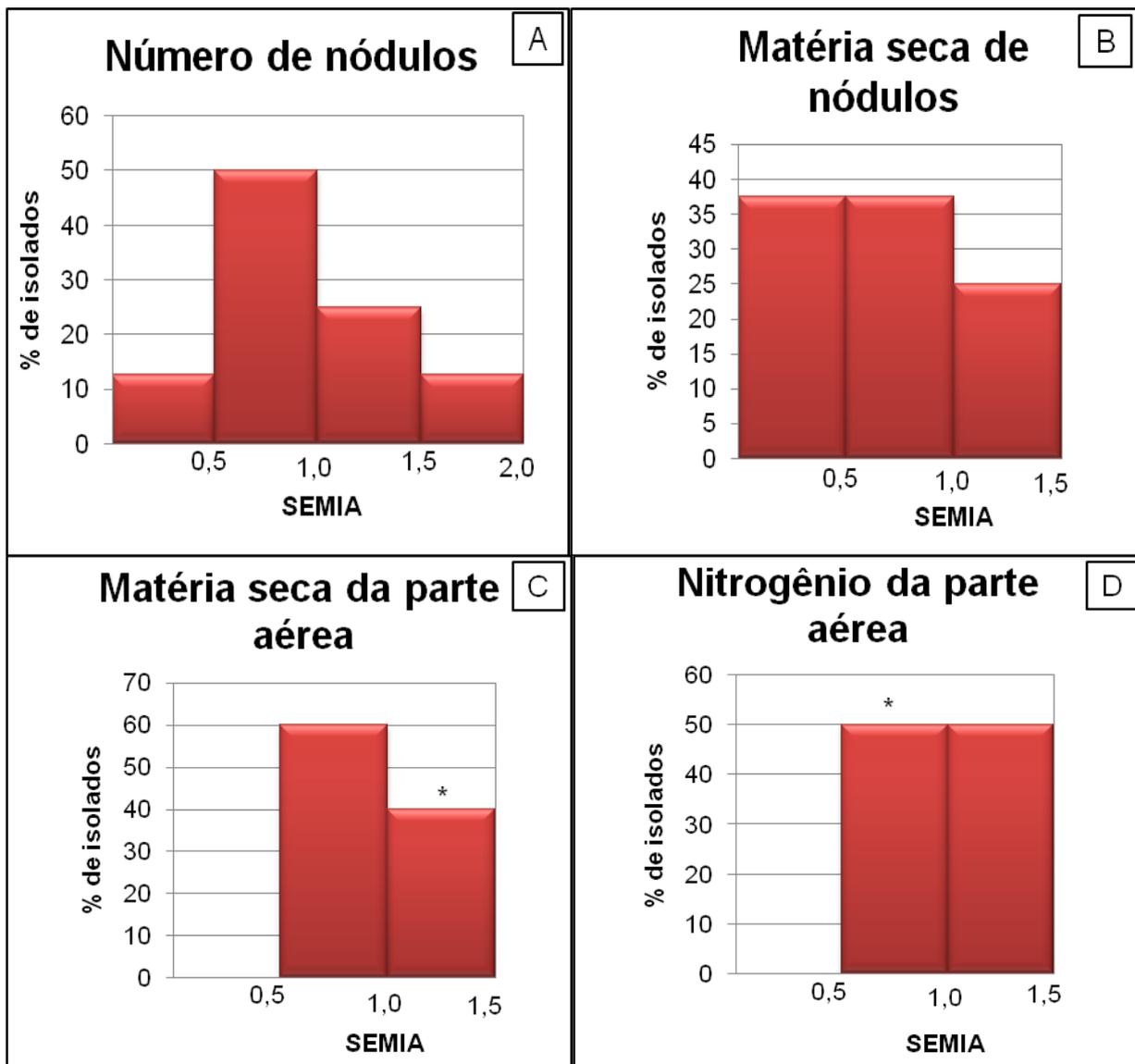
**Figura 2.** (A) Número de nódulos; (B) Matéria seca de nódulos; (C) Matéria seca da parte aérea; (D) Nitrogênio da parte aérea de plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.) inoculadas com 21 isolados de rizóbio. Valores relativos à estirpe SEMIA 6156. \*Inclui os resultados do tratamento com N mineral (20mg/planta, semanalmente).



**Figura 3. (A)** Número de nódulos; **(B)** Matéria seca de nódulos; **(C)** Matéria seca da parte aérea; **(D)** Nitrogênio da parte aérea de plantas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) inoculadas com 21 isolados de rizóbio. Valores relativos à estirpe SEMIA 6156. \*Inclui os resultados do tratamento com N mineral (20mg/planta, semanalmente).



**Figura 4. (A) Número de nódulos; (B) Matéria seca de nódulos; (C) Matéria seca da parte aérea; (D) Nitrogênio da parte aérea de plantas de mucuna-preta (*Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Holland), inoculadas com 21 isolados de rizóbio. Valores relativos à estirpe SEMIA 6156.**



**Figura 5. (A)** Número de nódulos; **(B)** Matéria seca de nódulos; **(C)** Matéria seca da parte aérea; **(D)** Nitrogênio da parte aérea de plantas de mucuna-cinza *Mucuna nivea* L. (D.C.) inoculadas com 21 isolados de rizóbio. Valores relativos à estirpe SEMIA 6158. \*Inclui os resultados do tratamento com N mineral (20mg/planta, semanalmente).