

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
ORGÂNICA

DISSERTAÇÃO

Prática Alternativa de Inoculação de Sementes de
Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Ouro Vermelho)
com Estirpes Rizobianas Localmente Adaptadas

Brauly Martins Rocha

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA ORGÂNICA**

**PRÁTICA ALTERNATIVA DE INOCULAÇÃO DE SEMENTES
DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Ouro Vermelho) COM
ESTIRPES RIZOBIANAS LOCALMENTE ADAPTADAS**

BRAULY MARTINS ROCHA

Sob a Orientação da Professora
Norma Gouvêa Rumjanek

e Co-orientação da Professora
Anelise Dias

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Agricultura Orgânica

Seropédica, RJ
Novembro de 2013

635.652

R672p

T

Rocha, Brauly Martins, 1988-

Prática alternativa de inoculação de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Ouro Vermelho) com estirpes rizobianas localmente adaptadas / Brauly Martins Rocha. – 2013.

48 f.: il.

Orientador: Norma Gouvêa Rumjanek.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica.

Bibliografia: f. 24-29.

1. Feijão – Cultivo – Teses. 2. Feijão – Semente – Teses. 3. Feijão – Inoculação – Teses. 4. Rizóbio – Teses. I. Rumjanek, Norma Gouvêa, 1953- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA ORGÂNICA**

BRAULY MARTINS ROCHA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**,
no Curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21/11/2013

Norma Gouvêa Rumjanek. Ph.D. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Lindete Mária Vieira Martins. Dra. UNEB

Raul de Lucena Duarte Ribeiro. Ph.D. UFRRJ

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por ter me ungido todos os dias dessa caminhada.

A meus pais que lutaram junto comigo para que este sonho se tornasse realidade.

A meu tio Antonio Clarete pelas lições de vida.

A meus irmãos Bruno e Raynara pelo amor e carinho que têm comigo.

À Dra. Norma Gouvêa Rumjanek pela orientação e pela oportunidade de estar trabalhando em um projeto de pesquisa ímpar.

À Dra. Anelise Dias pela coorientação e toda sua dedicação a mim durante essa caminhada.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, à Embrapa Agrobiologia e ao IF Sudeste MG – Câmpus Rio Pomba pela oportunidade de realização do curso.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica, Renato Lima, por sua dedicação ao curso e a nós, discentes do mesmo.

Aos colegas do IF Sudeste MG – Câmpus Rio Pomba pelo grande apoio durante esses anos de curso.

Aos colegas, funcionários e bolsistas da Embrapa Agrobiologia, em especial do Laboratório de Ecologia Microbiana pela grande ajuda nesse tempo em que trabalhamos juntos.

Aos colegas do curso e do alojamento pela convivência e experiências compartilhadas.

Aos produtores rurais Rio Pomba (MG) pelo acolhimento para realização dos trabalhos.

Aos demais amigos que me ajudaram, direta ou indiretamente, para que eu conseguisse dar esse grande passo e conquistasse o título de Mestre em Agricultura Orgânica.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Nascido em 22 de abril de 1988, na cidade de Rio Pomba (MG), filho de Romeu Gaudereto Rocha e Isabel Teresinha Martins Rocha, irmão de Bruno Martins Rocha e Raynara Martins Rocha, cursou o 1º e 2º grau na Escola Estadual São José e na Escola Estadual Professor Borges de Moraes e se formou em Técnico em Zootecnia, área profissional de Agropecuária pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba (CEFET – RP). Graduou-se em Tecnologia em Agroecologia pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Câmpus Rio Pomba (IF Sudeste MG – Câmpus Rio Pomba) no ano de 2010 e se especializou em Gestão Ambiental pelas Faculdades Integradas de Jacarepaguá em 2011. Iniciou no curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica, em nível de mestrado profissional, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em julho de 2011. Ocupa desde 2008, após aprovação em concurso público, o cargo de Técnico em Agropecuária no IF Sudeste MG – Câmpus Rio Pomba.

RESUMO

ROCHA, Brauly Martins. **Prática alternativa de inoculação de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Ouro Vermelho) com estirpes rizobianas localmente adaptadas.** 2013. 52f. Dissertação (Mestrado Profissional em Agricultura Orgânica). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O feijoeiro é uma cultura de relevância socioeconômica no Brasil, contando com um expressivo contingente de pequenos agricultores dedicados ao seu cultivo. A produtividade nesse segmento é frequentemente baixa e um dos principais nutrientes que limitam a produção é o nitrogênio (N). Contudo, o feijoeiro possui a capacidade de se associar a bactérias do grupo rizóbio e formar estruturas especializadas denominadas nódulos, onde ocorre a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Bactérias desse grupo vêm sendo selecionadas para diversas culturas e são disponibilizadas para empresas produtoras de inoculantes que distribuem o produto diretamente para o produtor. A maior parte dos inoculantes produzidos são destinados à cadeia produtiva da soja, enquanto o agricultor familiar, via de regra, não tem acesso a essa tecnologia devido à falta de informação e dificuldade de distribuição. Em contrapartida, tem sido sugerido que é possível preparar o inoculante rizobiano a partir de nódulos localmente disponíveis na unidade de produção, porém não há comprovação científica referente a essa prática. O objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar uma prática alternativa de inoculação de sementes de feijoeiro com extrato de nódulos para a cultivar Ouro Vermelho, assim como caracterizar a comunidade bacteriana cultivável do extrato. Foram conduzidos experimentos em casa de vegetação com dois extratos de nódulos de feijoeiro, cultivados no município de Rio Pomba, MG. A eficiência do extrato foi comparada à do inoculante rizobiano, composto pelas três estirpes registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e à aplicação de N recomendado para a cultura. Até os 35 dias após o plantio avaliaram-se o número de nódulos, a massa fresca e seca dos nódulos, a massa seca da parte aérea e das raízes, o teor e o conteúdo de N acumulado na parte aérea e o índice de clorofila total. O número de bactérias formadoras de nódulos foi determinado pela técnica do número mais provável e foi realizada a contagem de bactérias presentes no extrato de nódulos nos meios de cultura DYGS, LB, KB, YMA, SF e TBNR. Os isolados obtidos foram caracterizados através do sequenciamento do gene 16S RNAr. O extrato de nódulos demonstrou eficiência similar ao inoculante rizobiano. Os meios YMA e SF foram os que recuperaram maior número de isolados do extrato de nódulos (10^9 UFC mL⁻¹). A caracterização genética dos 47 isolados obtidos revelou expressiva diversidade de grupos bacterianos no extrato de nódulos. Foram encontrados representantes dos seguintes gêneros: *Acinetobacter* (2 isolados), *Agrobacterium* (5), *Bacillus* (4), *Chryseobacterium* (5), *Arthobacter* (1), *Comamonas* (2), *Ensifer* (1), *Ochrobactrum* (1), *Pantoea* (1), *Pseudomonas* (6), *Rhizobium* (7), *Shinella* (1), *Sphingobacterium* (2), *Stenotrophomonas* (8) e *Variovorax* (1). Os resultados obtidos indicam o potencial do inoculante a base de extrato de nódulos na maximização da FBN na cultura do feijoeiro.

Palavras-chave: Feijoeiro. Inoculação. Extrato de nódulos.

ABSTRACT

ROCHA, Brauly Martins. **Practice alternative inoculation of bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Ouro Vermelho) with rhizobial strains locally adapted**. 2013. 52f. Dissertation (Professional Masters in Organic Agriculture). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A significant number of Brazilian smallholder farmers cultivates common beans which is important for its socioeconomic relevance. Crop yield under this scenario is often low and generally limited by nitrogen (N) availability. Beans have the ability to associate with rhizobial bacteria and form specialized root structures called nodules where atmospheric nitrogen is reduced. Efficient bacterial strains have been selected for different plant species and they are registered at the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). Companies prepare inoculants from them and distribute it to farmers. In Brazil, most of inoculants produced is for soybean monocrops while smallholder farmers often do not have access to the technology probably due to both lack of information and a limited distribution network. The use of an inoculant prepared from active nodules collected in the production unit may offer an alternative to maximize biological nitrogen fixation (BNF) benefits. Nevertheless, so far, there is not any scientific evidence regarding such a practice. The aim of this study was to develop and evaluate seed inoculation of bean cultivar Ouro Vermelho with an extract prepared from active nodules, as well as to characterize the bacterial community present in the extract. Experiments were conducted in a greenhouse with two extracts produced from bean nodules collected in Rio Pombo, MG. Nodule extract efficiency was compared to a rhizobial inoculant composed by three strains registered at MAPA, and to the recommended N dose. At 35 days after sowing, plants were collected and the following parameters evaluated: nodule fresh and dry matter, nodule number, shoot and root dry matter, N content, total N and chlorophyll accumulated in the shoot. The number of bacteria capable of forming nodules was determined by the most probable number counts technique and bacteria present in the extract was counted and isolated from DYGS, LB, KB, YMA, SF and TBNR media. The identification of bacterial isolates was carried out by sequencing the 16S rRNA gene. Under greenhouse conditions, inoculation with nodule extract was similar to rhizobial inoculant regarding the analyzed parameters. YMA and SF media showed the largest colony number recovered from nodule extract (10^9 CFU mL⁻¹). The genetic characterization of 47 isolates obtained revealed a high diversity of bacterial genera. Representatives of the following genera have been found: *Acinetobacter* (2 isolates), *Agrobacterium* (5), *Bacillus* (4), *Chryseobacterium* (5), *Arthobacter* (1), *Comamonas* (2), *Ensifer* (1), *Ochrobactrum* (1), *Pantoea* (1), *Pseudomonas* (6), *Rhizobium* (7), *Shinella* (1), *Sphingobacterium* (2), *Stenotrophomonas* (8) and *Variovorax* (1). The results indicate that the alternative practice using nodule extract inoculation may improve bean yield at the expense of BNF.

Keywords: Bean. Inoculation. Nodules extract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Nodulação (1A) e massa fresca acumulada (1B) aos 15 DAP em feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.). Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de <i>R. tropici</i> : Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha ⁻¹ de N); e Cont (controle).....	10
Figura 2. Biomassa aérea de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) aos 30 DAP. Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de <i>R. tropici</i> : Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha ⁻¹ de N); e Cont (controle)	11
Figura 3. Inoculação de sementes de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) com diferentes diluições do extrato de nódulos: -6 (diluição 10 ⁻⁶); -5 (diluição 10 ⁻⁵); -4 (diluição 10 ⁻⁴); -3 (diluição 10 ⁻³); -2 (diluição 10 ⁻²); -1 (diluição 10 ⁻¹); Inoc (inoculante composto por estirpes de <i>R. tropici</i> : Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); e Cont (controle)	14
Figura 4. Número total de colônias microbianas obtidas a partir do extrato de nódulos de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) em diferentes meios de cultivo até 96 horas de crescimento	16
Figura 5. Árvore filogenética de sequências do gene 16S RNAr (1164 nucleotídeos) de isolados, obtidos de extrato de nódulos de feijoeiro e estirpes relacionadas. A árvore foi construída utilizando-se o método Neighbor-Joining e modelo Kimura-2 com <i>bootstrap</i> de 1000 replicatas.....	20
Figura 6. Percentagem (%) dos grupos de bactérias obtidos no extrato de nódulos, após o sequenciamento do gene 16S RNAr.....	21
Figura 7. Isolado 5D – Meio DYGS	35
Figura 8. Isolado 3K – Meio KB	35
Figura 9. Isolado L3 – Meio LB	36
Figura 10. Isolado S3 – Meio SF.....	36
Figura 11. Isolado 8Y – Meio YMA.....	37
Figura 12. Isolado 1L – Meio LB	37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Principais espécies de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro 3
- Tabela 2.** Empresas que produzem e distribuem inoculantes no Brasil 5
- Tabela 3.** Efeito da inoculação com extrato de nódulos sobre o crescimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) aos 15 e 30 DAP. Massa seca de parte aérea em gramas por planta (MSPA g planta⁻¹); número de nódulos por planta (NN planta⁻¹); massa seca de nódulos em miligramas por planta (MSN mg planta⁻¹); teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio total em miligramas por planta (N mg planta⁻¹). Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha⁻¹ de N); e Cont (controle)..... 11
- Tabela 4.** Efeito da inoculação com extrato de nódulos sobre a razão matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) aos 15 e 30 DAP. Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha⁻¹ de N); e Cont (controle)..... 12
- Tabela 5.** Efeito da inoculação com extrato de nódulos sobre o crescimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Massa seca de parte aérea em gramas por planta (MSPA g planta⁻¹), número de nódulos por planta (NN planta⁻¹), massa seca de nódulos em miligramas por planta (MSN mg planta⁻¹) aos 7, 14, 21, 28, e 35 DAP. Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha⁻¹ de N); NStart (metade da dose de N recomendado: equivalente a 25 Kg ha⁻¹ de N); e Cont (controle)..... 12
- Tabela 6.** Efeito da inoculação com extrato de nódulos sobre o teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio total em miligramas por planta (mg planta⁻¹), na parte aérea das plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) aos 21, 28 e 35 DAP. Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha⁻¹ de N); NStart (metade da dose de N recomendado: equivalente a 25 Kg ha⁻¹ de N); e Cont (controle) 13
- Tabela 7.** Efeito da inoculação de sementes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com diluições do extrato de nódulos. Massa fresca de nódulos em gramas por planta (MFN g planta⁻¹), índice de clorofila total (ICT) e massa seca de parte aérea em gramas por planta (MSPA g planta⁻¹) aos 25 dias após o transplante. Tratamentos: diluições 10⁻⁶; 10⁻⁵; 10⁻⁴; 10⁻³; 10⁻²; 10⁻¹; Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); e Cont (controle) 14
- Tabela 8.** Homologia das sequências do gene 16S RNAr dos isolados, obtidos no extrato de nódulos com o banco de dados NCBI..... 16

Tabela 9. Influência dos meios de cultura utilizados sob as bactérias isoladas: unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL ⁻¹), número de isolados sequenciados, número e identificação de gêneros encontrados nos diferentes meios de cultura ...	19
Tabela 10. Solução nutritiva de Norris modificada	31
Tabela 11. Meio DYGS (Dextrose Yeast Extract).....	33
Tabela 12. Meio LB (Luria-Bertani).....	33
Tabela 13. Meio KB (King B)	33
Tabela 14. Meio SF (Solubilização de Fósforo) modificado	33
Tabela 15. Meio YMA (Yeast Extract Mannitol Agar) com azul de bromotimol	34
Tabela 16. Meio TBNR.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	Feijoeiro	2
2.2	Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) no Feijoeiro	3
2.3	Fatores que Afetam A FBN no Feijoeiro	4
2.4	Inoculação no Brasil	5
2.5	Alternativas à Inoculação Tradicional	6
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1	Obtenção dos Extratos de Nódulos.....	7
3.2	Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Extrato de Nódulos I sob Condições Axênicas (Vasos de “Leonard”) Mantidos em Casa de Vegetação.....	7
3.3	Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Extrato de Nódulos I em Vasos com Solo Mantidos em Casa de Vegetação.....	7
3.4	Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Células Formadoras de Nódulos e Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Diluições do Extrato de Nódulos II em Garrafas Tipo “Longneck” sob Condições Axênicas em Casa de Vegetação.....	8
3.5	Quantificação e Isolamento de Bactérias Totais no Extrato de Nódulos II Cultiváveis <i>In Vitro</i>	8
3.6	Caracterização dos Isolados do Extrato de Nódulos II Obtidos em Diferentes Meios de Cultura.....	9
3.6.1	Amplificação do gene 16S RNAr.....	9
3.6.2	Obtenção e análise das sequências	9
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
4.1	Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Extrato de Nódulos I sob Condições Axênicas (Vasos de “Leonard”) Mantidos em Casa de Vegetação.....	10
4.2	Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Extrato de Nódulos I em Vasos com Solo Mantidos em Casa de Vegetação.....	12
4.3	Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Células Formadoras de Nódulos e Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Diluições do Extrato de Nódulos II em Garrafas Tipo “Longneck” sob Condições Axênicas em Casa de Vegetação.....	14
4.4	Quantificação e Isolamento de Bactérias Totais no Extrato de Nódulos II Cultiváveis <i>In Vitro</i>	15
4.5	Caracterização dos Isolados do Extrato de Nódulos II em Diferentes Meios de Cultura.....	16
5	CONCLUSÕES.....	22

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	23
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
8	ANEXOS	30

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro possui grande importância socioeconômica no Brasil, sendo a principal fonte de proteínas e minerais na dieta da população, além de possuir um grande contingente de pequenos produtores que se dedicam a essa cultura. Contudo, nessas unidades a produtividade é baixa, deixando a média nacional de produção de feijões nas safras 2012/2013 em 924 Kg ha^{-1} , número bastante inferior quando comparado aos 2.400 Kg ha^{-1} ou mais já alcançados por alguns estados brasileiros (CONAB, 2013), onde se concentram os grandes produtores dessa leguminosa. Sabe-se que o poder de investimento entre grande produtor e agricultor familiar é bastante distinto e que o segundo tem muitas dificuldades em investir em insumos, dos quais podemos destacar as adubações com nitrogênio.

Para solucionar essas dificuldades surge a necessidade de buscar tecnologias de baixo custo que melhorem a produtividade da cultura, baixando custos e aumentando a renda do produtor. Como atributo importante, o feijoeiro possui a capacidade de se associar simbioticamente a bactérias do grupo dos rizóbios, formando estruturas denominadas nódulos, onde ocorre o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MERCANTE et al., 1992). Nesse contexto, existe a possibilidade de explorar a FBN através da adoção da prática de inoculação das sementes com estirpes de rizóbios eficientes, adquiridas de empresas especializadas. Entretanto essa tecnologia não é bem difundida entre os pequenos agricultores, não gerando uma demanda para que as empresas busquem uma estratégia de distribuição para esse público.

Pelos motivos citados torna-se importante buscar tecnologias alternativas à inoculação tradicional. Existem alguns trabalhos relatando experiências com macerados de nódulos (extrato de nódulos) de solo, mas sem metodologias específicas. Essa prática bem elaborada e prontamente disponível ao agricultor familiar poderia representar uma alternativa para otimizar a FBN no feijoeiro.

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar uma prática alternativa de inoculação de sementes de feijoeiro com extrato de nódulos para a cultivar Ouro Vermelho, assim como caracterizar a comunidade bacteriana cultivável do extrato.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Feijoeiro

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos princípios constituintes da dieta dos brasileiros, sendo uma excelente fonte de proteínas, além de possuir um bom conteúdo de carboidratos e ser rico em ferro. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de feijões, sendo sua produção estimada na safra 2011/2012 em 2.906,5 milhões de toneladas em uma área total de 3.269,4 milhões de ha. Desse total estima-se que o feijoeiro seja responsável por 89,6% do total com produção anual de 2.603,3 milhões de toneladas (CONAB, 2012).

De acordo com Ferreira et al. (2006), existem três grupos de produtores do feijoeiro no Brasil: o primeiro é composto por pequenos produtores, em que as limitações climáticas, a falta ou dificuldade de acesso à tecnologia, dificuldade de comercializar outras culturas tornam o cultivo do feijão a melhor alternativa econômica; o segundo é formado por pequenos e grandes produtores intermitentes, ou seja, entram e saem dessa exploração dependendo das perspectivas do mercado; e o terceiro são produtores profissionais, que conduzem suas lavouras com tamanho e tecnologia proporcionais a sua capacidade de investimento.

A produção nacional de feijão é dividida em três safras: a primeira safra (feijão das águas) é plantada entre os meses de outubro a novembro, a segunda (feijão da seca) a partir de janeiro até início de março e a terceira (feijão de inverno), exclusivamente irrigada, entre abril e junho (CASSINI; FRANCO, 2006). O feijão de inverno é cultivado por grandes produtores, que além de utilizar técnicas modernas, procuram evitar riscos relativos ao cultivo dessa leguminosa (CHAGAS, 1994).

A maior parte da produção nacional é gerada nas duas primeiras safras, sendo produzidas basicamente pela agricultura familiar, que é responsável por aproximadamente 65% do total produzido (IBGE, 2009). Nessas propriedades o baixo nível tecnológico dos produtores resulta em baixas produtividades. Segundo Ferreira et al. (2009) os fatores responsáveis pela baixa produtividade do feijoeiro são: incidência de doenças e pragas, não utilização de sementes certificadas, falta ou excesso de água e baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo o fósforo (P) devido a sua adsorção nos solos e o nitrogênio (N) que sofre perdas decorrentes de lixiviação e volatilização, resultado do manejo inadequado.

O N é o nutriente mais caro e exportado pelo feijoeiro, além disso, os pequenos produtores não têm recursos para utilização de fertilizantes em solos de baixa fertilidade, gerando uma cadeia de deficiências (SALGADO; VIEIRA, 1994; NOGUEIRA, 2005). Para esses produtores responsáveis pela maior parte da produção nacional existe a necessidade de se desenvolverem tecnologias de baixo custo que sejam capazes de melhorar os índices de produtividade dessa cultura (STRALIOTTO, 2002).

A seleção da cultivar adequada, também está entre os fatores que interferem no êxito do cultivo do feijoeiro. De acordo com Melo et al. (2007) a obtenção de novas cultivares de feijoeiro com maior produtividade, menos susceptíveis aos estresses bióticos e abióticos, e com características que atendam ao mercado consumidor, tem se tornado um desafio contínuo dos programas de melhoramento genético.

A cultivar Ouro Vermelho utilizada no presente trabalho é oriunda de cruzamentos do primeiro ciclo de seleção recorrente para feijão vermelho, fruto do convênio “Melhoramento de Feijão para o Estado de Minas Gerais” com a participação direta das seguintes instituições: Universidade Federal de Viçosa (UFV), Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais (EPAMIG), Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Com base nas avaliações realizadas entre 2002 e 2004, essa cultivar apresenta vantagens se comparada à cultivar Vermelhinho, muito utilizada pelos

agricultores de Minas Gerais: superioridade média de 31% no rendimento de grãos, maior tolerância à mancha angular e ferrugem e melhor arquitetura de planta (CARNEIRO et al., 2006).

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) no Feijoeiro

A FBN consiste basicamente na transformação do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), assimilada pelas plantas, sendo realizada principalmente por bactérias diazotróficas, com destaque para as leguminosas (REIS JUNIOR et al., 2011). Em associação com leguminosas as bactérias, geralmente do gênero *Rhizobium*, formam estruturas especializadas nas raízes ou nos caules denominadas nódulos, onde se processa a FBN. Essa interação é denominada simbiose, pois, a bactéria fornece nitrogênio fixado para a planta, que em resposta fornece fotoassimilados ou carbono orgânico para a primeira (CASSINI e FRANCO, 2006). Entre as vantagens da FBN pode-se citar: o baixo custo, a inexistência de problemas ambientais e o fato do N_2 ser uma fonte praticamente inesgotável (FERREIRA et al., 2009).

Como toda leguminosa, o feijoeiro possui a capacidade de se beneficiar da associação simbiótica com bactérias do gênero *Rhizobium*, contribuindo especificamente para economia de nitrogênio (REIS, 2013). Entre as principais espécies de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro pode-se citar as listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais espécies de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro.

Espécie	Descritor
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. phaseoli	Jordan (1984)
<i>R. tropici</i>	Martínez-Romero et al. (1991)
<i>R. etli</i> bv. phaseoli	Segovia et al. (1993)
<i>R. gallicum</i> (bv. gallicum e bv. phaseoli)	Amarger et al. (1997)
<i>R. giardinii</i> (bv. giardinii e bv. phaseoli)	Amarger et al. (1997)

Há várias décadas o Brasil vem desenvolvendo pesquisas em FBN para o feijoeiro e notáveis avanços foram conquistados, quando, por exemplo, a EMBRAPA e o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) começaram um programa de seleção de rizóbios para a cultura do feijoeiro, buscando bactérias geneticamente mais estáveis e eficientes na FBN, com maior competitividade nos solos brasileiros e tolerância a temperaturas elevadas (HUNGRIA et al., 1997; HUNGRIA et al., 2013).

Existem, atualmente, três estirpes de *R. tropici*, registradas para fabricação do inoculante comercial no Brasil, recomendadas para o feijoeiro: CIAT 899 (Semia 4077, BR 322), isolada pelo Ciat (Colômbia) (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991); PRF 81 (Semia 4080, BR 520) – Isolada no Paraná pelo IAPAR e pela Embrapa Soja (HUNGRIA et al., 2000); CPAC H12 (Semia 4088, BR 534) – Isolada no Distrito Federal (MOSTASSO et al., 2002; HUNGRIA et al., 2003).

Estudos realizados com o feijoeiro e outras leguminosas por diferentes grupos de pesquisadores brasileiros comprovaram que a inoculação pode gerar benefício ao agricultor, permitindo boas produções com custos menores, resultando em maiores retornos financeiros (REIS, 2013; NOGUEIRA, 2005).

Em experimento de campo realizado por Pacheco et al. (2012) com a cultivar Ouro Negro, obteve-se rendimento de grãos sob inoculação equivalente a 73% do rendimento obtido com a aplicação de 90 Kg ha⁻¹ de N mineral. Brito et al. (2011) testando novas linhagens de feijoeiro do grupo preto, inoculadas com *R. tropici* demonstraram produtividades semelhantes àquelas adubadas com 80 Kg ha⁻¹ de N, independente do local de cultivo.

Hungria et al. (2003) verificaram respostas expressivas da inoculação, em seis experimentos no Paraná, com ganhos médios de 437 e 465 Kg ha⁻¹ com as estirpes de *R. tropici* CPAC H12 e CPAC H20, respectivamente comparados às plantas que receberam 60 Kg ha⁻¹ de N.

No entanto, apesar dos resultados expressivos de muitas pesquisas no Brasil com inoculação de sementes de feijoeiro em condições de campo, o nível de adoção da tecnologia, especialmente entre agricultores familiares, ainda é muito baixo (REIS JUNIOR et al., 2011).

Mendes et al. (2007) testaram a inoculação no feijão das águas (safra 2006/2007) em 11 assentamentos de Reforma Agrária. Como resultados obtiveram ganhos de produtividade em relação ao tratamento não inoculado de 209 Kg ha⁻¹ com a cultivar Requite (grupo do feijão carioca) e 128 Kg ha⁻¹ com a cultivar Diamante Negro (grupo do feijão preto). Comparando-se a produtividade total entre o tratamento inoculado e o que recebeu 120 Kg ha⁻¹ de ureia, a cultivar Requite inoculada apresentou 875 Kg ha⁻¹, semelhante ao tratamento adubado com produção de 858 Kg ha⁻¹. Já na cultivar Diamante Negro a adubação foi superior, apresentando produtividade de 934 Kg ha⁻¹. É importante destacar que o custo da ureia na mesma safra era R\$ 90,00, enquanto o custo do inoculante foi de R\$ 6,00. Para o pequeno agricultor essa diferença de preços entre o inoculante e o adubo nitrogenado é significativa, ainda mais se tratando do feijão das águas, em que os riscos de perdas relacionados a fatores climáticos costumam ser elevados. Ainda que os ganhos de produtividade com o inoculante possam ser menores em relação à adubação nitrogenada, o menor custo pode compensar essa redução e tornar o uso do inoculante mais competitivo.

2.3 Fatores que Afetam a FBN no Feijoeiro

Apesar das respostas positivas à inoculação é preciso destacar que o feijoeiro produz resultados bem variados quanto à FBN, que precisam ser monitorados para obtenção de melhores respostas. Hardarson et al. (1993), mediante a utilização de métodos isotópicos observaram grandes diferenças no teor de nitrogênio fixado no feijoeiro entre e dentro dos experimentos, com valores médios de 35% de N derivado da atmosfera (% Ndfa) e maiores valores de 70% Ndfa.

Alguns trabalhos não encontram diferença nos níveis de produtividade advindos da inoculação. Amane et al. (1999), avaliando diferentes níveis de adubação nitrogenada e molíbdica, em feijoeiro inoculado com estirpes eficientes de rizóbio mostraram que o tratamento inoculado não aumentou o rendimento de grãos e nenhuma interação foi significativa com a inoculação. Hawerth et al. (2011), avaliando o desempenho de cultivares de feijoeiro sob inoculação com rizóbio também demonstraram que nas condições em que o experimento foi realizado, não houve influência sobre o rendimento de grãos.

Resultados semelhantes foram encontrados no Quênia por Musandu e Joshua (2001), que avaliando o potencial de melhoria para o rendimento do feijão por meio da inoculação e fertilizantes, mostraram que a inoculação isolada não afetou nenhuma das variáveis testadas.

Vários fatores interferem na resposta do feijoeiro à inoculação em condições de campo resultando em ampla variabilidade e limitação simbiótica, citando-se temperatura (HUNGRIA; FRANCO, 1993), acidez do solo (TAYLOR et al., 1991), teores de nutrientes (TSAI et al., 1993) e cultivar (RUSCHEL et al., 1982).

Além desses, Mercante et al. (1992) relatam que a ausência de resposta do feijoeiro à inoculação, pode ser devido à presença do rizóbio nativo capaz de nodulá-lo, mesmo em áreas de primeiro plantio da cultura. Esses rizóbios conseguem contribuir para a FBN, mas dificultam a introdução de estirpes selecionadas para alta eficiência. Dessa forma a pesquisa busca selecionar estirpes eficientes que sejam também competitivas, capazes de se estabelecerem no solo e na superfície das raízes e de atingirem uma taxa de colonização dos nódulos expressiva.

2.4 Inoculação no Brasil

De acordo com Freire e Verneti (1999) a produção de inoculantes no Brasil teve início em 1950 na Seção de Microbiologia Agrícola da Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul com culturas líquidas e sobre ágar. A partir de 1954 foi adotado o veículo turfoso com a produção de 10.000 doses para soja, suficientes para 8.000 ha.

Atualmente muitas empresas particulares se dedicam à produção e comercialização de inoculantes no Brasil, sendo algumas demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Empresas que produzem e distribuem inoculantes no Brasil.

Empresa	Endereço eletrônico
Rizobacter do Brasil	http://www.rizobacterdobrasil.com.br/
Grupo Bio soja	http://www.biosoja.com.br/
Biagro	http://biagro.site.com.br/
Stoller	http://www.stoller.com.br/
Inocbras	http://www.inocbras.com.br/
Basf The Chemical Company	http://www.basf.com.br/
Microquímica	http://www.microquimica.com/
Nitro1000 Inoculantes Biológicos	http://www.nitro1000.com/
Novozymes Rething Tomorrow	http://www.bioag.novozymes.com/
Total Biotecnologia	http://www.totalbiotecnologia.com.br/

A produção de inoculantes no Brasil segue uma legislação específica que tem como objetivo garantir a qualidade do produto. A Instrução Normativa nº 13 de 24 de março de 2011 aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, assim como os microrganismos autorizados e recomendados na produção dos mesmos no Brasil, dispostos nos anexos I, II e III dessa Instrução Normativa, tendo em vista as disposições contidas no decreto nº 4.954 de 14 de janeiro de 2004.

O inoculante composto por bactérias fixadoras de nitrogênio deve apresentar a concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) viáveis por grama ou mililitro; ser elaborado em suporte estéril e, quando sólido, livre de microrganismos não especificados em fator de diluição $1,0 \times 10^{-2}$; estar livre de microrganismos não especificados em fator de diluição $1,0 \times 10^{-5}$; ser elaborado apenas com os microrganismos relacionados no anexo II do documento; e ter prazo de validade de no mínimo seis meses (BRASIL, 2011).

Segundo dados da Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes, que representa de 70% das empresas desse segmento no Brasil, no ano de 2011 foram vendidos um total de 19.303.000 doses de inoculantes por suas filiais (ANPII, 2013). Sabe-se que 95% da produção de inoculantes no país destinam-se à cadeia produtiva da soja (REIS, 2013). Esse valor acentuado deve-se à importância que a inoculação representa para a produtividade da cultura.

O sucesso da soja no Brasil é o resultado de um programa de melhoramento buscando a obtenção de cultivares com alta produção sem adubação nitrogenada e, simultaneamente ao desenvolvimento de inoculantes contendo rizóbios adaptados às condições e solos brasileiros (DÖBEREINER, 1997). Como resultado, as cultivares atualmente encontradas no mercado, dispensam totalmente o uso de adubos sintéticos nitrogenados em função da atividade de FBN realizada por bactérias das espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* (HUNGRIA; CAMPO, 2007; REIS, 2013).

No feijão, apesar dos inúmeros trabalhos relatando a eficiência e os ganhos obtidos com a inoculação, a adesão dessa prática não é a mesma daquela observada para a soja. A produção em pequenas áreas dispersas em grande parte do território nacional ao longo das três safras anuais representa um desafio a ser vencido pelo setor produtivo. Como a maior parte da produção de feijão está a cargo da agricultura familiar e como o processo de divulgação de tecnologias para este segmento ainda é bastante limitado no Brasil, a demanda por inoculantes para feijoeiro é ainda pequena, o que gera um círculo vicioso, não havendo, pois, demanda, não há estímulo à produção.

O produtor familiar que conhece e deseja utilizar a tecnologia de inoculação, na maioria das vezes deve solicitar o inoculante diretamente ao fornecedor, recebendo o produto por envio postal. Nesse processo o custo do envio pode se tornar mais alto que o próprio inoculante, além de ser difícil garantir condições adequadas de transporte, o que pode influenciar na qualidade do insumo. A reversão desse quadro exige uma intensificação das ações de difusão e assistência técnica. Porém, Peixoto (2008) observa que os principais agentes de ATER (Assistência Técnica de Extensão Rural) no país, voltados para a agricultura familiar são órgãos estaduais que não têm recebido do governo os recursos (humanos, orçamentários, materiais) necessários ao atendimento das demandas existentes. Nesse sentido a informação advinda da assistência técnica geraria demanda e procura pelos produtores, possibilitando que o inoculante fosse encontrado facilmente nas casas agropecuárias.

2.5 Alternativas à Inoculação Tradicional

Atualmente as técnicas de inoculação preconizam e difundem como princípio a fabricação do inoculante em condições estéreis, com pureza controlada, composto por microrganismos autorizados ou recomendados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Entretanto a inoculação é uma prática agrícola antiga, existindo relatos do século XIX, quando era comum o transporte de terras de alfafais já estabelecidos para áreas novas onde se desejava cultivar essa leguminosa (SEIFFERT, 1984).

Nos últimos anos alguns trabalhos têm apresentado alternativas à inoculação tradicional. Em INIAP (2002) é apresentada uma proposta para preparo de um inoculante alternativo a base de nódulos de solo da própria propriedade. O procedimento descrito é simples: nódulos ativos (cor rosa) são extraídos das raízes, lavados, homogeneizados em liquidificador em água com açúcar, misturados com turfa para então, serem misturados às sementes. Wutke et al. (2007) descrevem procedimento semelhante, utilizando nódulos macerados em água, adicionando-se um pouco de fosfato natural, calcário, pó de carvão ou argila, para facilitar a visualização na hora de misturar o inoculante com as sementes. Wutke et al. (2012) também relatam uma metodologia que utiliza apenas o macerado de nódulos e um pouco de açúcar diluído para aumentar a adesão. Os autores sugerem que essa prática é benéfica para a manutenção e o aumento da população de espécies de rizóbios mais adaptadas à região onde se localiza a unidade de produção.

Apesar desses relatos, não foram encontrados estudos que demonstrassem a viabilidade técnica desses métodos e que determinassem uma metodologia padronizada: número de células, estabilidade do inóculo, veículo disponível, etc. Portanto, avançar nesses estudos configura um novo campo de investigação.

Pela dificuldade que os pequenos agricultores têm de encontrar inoculantes para o feijoeiro, essa prática bem definida pode representar uma fonte viável de rizóbios para maximizar a FBN na cultura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos Extratos de Nódulos

Foram obtidos dois extratos de nódulos, I e II, provenientes de nódulos de plantas de feijoeiro de áreas de cultivos sucessivos da cultura. As plantas foram retiradas com o auxílio de uma pá reta com aproximadamente 30 dias da sementeira. Suas raízes foram lavadas, retirando-se nódulos suficientes para preencher uma medida correspondente a 20 mL aos quais foram acrescentados 50 mL de água filtrada. A suspensão foi homogeneizada em liquidificador e, em seguida, filtrada.

O extrato de nódulos I foi obtido em uma área de plantio de feijão, cultivar Ouro Vermelho, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Câmpus Rio Pomba, localizado à Av. Dr. José Sebastião da Paixão, s/n, Bairro Lindo Vale, Rio Pomba, MG. O extrato de nódulo II foi proveniente de plantas de feijoeiro, cultivar Ouro Vermelho, do Sítio Humaitá do Sr. Reny Mendes Peixoto, localizado na zona rural de Rio Pomba.

A legislação para Acesso Legal ao Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (AZEVEDO; SILVA, 2005) foi observada, sendo obtida Autorização Especial de Acesso para as atividades realizadas junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN).

3.2 Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Extrato de Nódulos I sob Condições Axênicas (Vasos de “Leonard”) Mantidos em Casa de Vegetação

O experimento foi realizado em condições controladas em casa de vegetação, utilizando-se vasos de "Leonard" (VICENT, 1970) autoclavados, contendo uma mistura de areia e vermiculita (1:1; v:v). Utilizaram-se a cultivar de feijão Ouro Vermelho e o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições, em duas coletas aos 15 e 30 dias após o plantio (DAP). Os tratamentos foram: extrato de nódulos (ExtNod); inoculante rizobiano (Inoc); nitrogênio recomendado, 50 Kg ha⁻¹ (NRec); e controle (Cont).

Foram semeadas quatro sementes por vaso inoculadas com extrato de nódulos I (1 mL por semente), obtido a partir de nódulos de feijão, conforme descrito no item anterior ou com inoculante rizobiano (1 mL por semente) contendo as três estirpes de *R. tropici* registradas no MAPA: Semia 4077, Semia 4080, Semia 4088. Após a germinação, procedeu-se ao desbaste mantendo-se uma planta por vaso.

Durante o crescimento as plantas foram supridas com solução nutritiva de Norris modificada (Anexo A) e o tratamento nitrogenado recebeu 50 Kg ha⁻¹ de N na forma de ureia, parcelados uma vez por semana.

As variáveis avaliadas foram: massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e razão parte aérea/raiz em 15 e 30 DAP; teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas (N mg) em 30 DAP. O N% foi determinado de acordo com o método de Kjeldahl (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). As diferenças entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Extrato de Nódulos I em Vasos com Solo Mantidos em Casa de Vegetação

Esse experimento foi instalado em casa de vegetação em vasos contendo 1 Kg de terra não autoclavada, do horizonte A de um Planossolo, com os seguintes atributos químicos: pH= 5,3, Al= 0,3 cmolc dm⁻³, Ca + Mg= 0,9 cmolc dm⁻³, P= 4 mg dm⁻³, K= 20 mg dm⁻³, carbono= 0,33% e matéria orgânica= 0,57%. Utilizaram-se a cultivar de feijoeiro Ouro Vermelho e o

delineamento experimental em blocos casualizados com três repetições, em cinco coletas (7, 14, 21, 28 e 35 DAP). Os tratamentos foram: extrato de nódulos (ExtNod); inoculante rizobiano (Inoc); nitrogênio recomendado, 50 Kg ha⁻¹ (NRec); metade da dose de nitrogênio recomendado, 25 Kg ha⁻¹ (NStart); e controle (Cont). Foram plantadas quatro sementes por vaso e após a germinação, procedeu-se ao desbaste mantendo-se apenas uma planta por vaso.

O extrato de nódulos I foi misturado a um veículo alternativo, procedendo-se, em seguida, a inoculação das sementes. Para o preparo do veículo foi levada em fogo baixo uma mistura de 6 gramas de amido de milho para 30 mL de água. Foram então misturados um volume de 40 mL de nódulos batidos com 60 mL de amido de milho. Após realizado esse procedimento foram retirados 30 mL do inoculante alternativo (extrato de nódulos) e misturados com 150 gramas de sementes de feijão em um saco plástico, esperando secar por uma hora para fazer o plantio.

O inoculante rizobiano foi composto pelas mesmas estirpes do experimento anterior, com o veículo turfoso, inoculando-se as sementes de acordo com as recomendações da Embrapa Agrobiologia (Anexo B). Os tratamentos NRec e NStart receberam nitrogênio na forma de ureia, em uma única aplicação.

Aos 12 DAP, as plantas receberam 30 mL de solução nutritiva de Norris modificada (2x) (Anexo A).

As variáveis avaliadas foram: massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de nódulos (MSN) e número de nódulos (NN) em todas as coletas; teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas (N mg) aos 21, 28 e 35 DAP. O N% foi determinado de acordo com método de Kjeldahl (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). As diferenças entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% probabilidade.

3.4 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Células Formadoras de Nódulos e Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Diluições do Extrato de Nódulos II em Garrafas Tipo “Longneck” sob Condições Axênicas em Casa de Vegetação

Foram utilizadas garrafas recicláveis de 350 mL do tipo “longneck” autoclavadas revestidas com sacos de papel (GUIMARÃES et al., 2012) e contendo solução nutritiva de Norris modificada (Anexo A). Utilizaram-se a cultivar de feijão Ouro Vermelho e o delineamento experimental em blocos casualizados com seis repetições, com coleta aos 25 dias após a aplicação das sementes nas garrafas. Os tratamentos foram: extrato de nódulos II (ExtNod), obtido conforme descrito no item 3.1, diluído a 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, inoculante rizobiano (Inoc) (Semia 4077, Semia 4080, Semia 4088) e controle (Cont).

As sementes de feijão foram desinfestadas superficialmente, utilizando-se álcool etílico a 70% v v⁻¹ (30 segundos), hipoclorito de sódio a 2% v v⁻¹ (2 minutos) e, em seguida, submetidas a lavagens sucessivas em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em placas de Petri autoclavadas contendo papel filtro umedecido, permanecendo por 48 horas em câmara de crescimento a 28 °C para emissão das radículas. Para cada tratamento foi adicionado 1 mL de inoculante sobre a semente pré-germinada, exceto para o tratamento sem inoculação.

As variáveis avaliadas foram: índice de clorofila total (ICT), massa fresca de nódulos (MFN), massa seca de parte aérea (MSPA), e o cálculo do número mais provável (NMP). As diferenças entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% probabilidade.

3.5 Quantificação e Isolamento de Bactérias Totais no Extrato de Nódulos II Cultiváveis *In Vitro*

O extrato de nódulos II foi diluído em água destilada e autoclavada (diluições: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹) e uma alíquota de 100 µl de cada diluição foi

distribuída em duas placas de Petri de cada um dos seguintes meios: LB (Luria-Bertani) (DÖBEREINER et al., 1999), DYGS (Dextrose Yeast Extract) (BALDANI, 1996), KB (King B) (KING et al., 1954), SF (Solubilização de fósforo) (ROSAS et al., 2006) modificado, YMA (Yeast Extract Mannitol Agar) com azul de bromotimol (FRED; WAKSMAN, 1928) nas diluições 10^{-3} a 10^{-9} ; e TBNR (SELDIN; PENIDO, 1986) nas diluições de 10^{-1} a 10^{-8} . As placas foram incubadas a 29 °C e a contagem das colônias foi realizada após 24, 48, 72 e 96 h de crescimento, exceto as que continham TBNR, que foram colocadas em câmara de anaerobiose à temperatura ambiente, realizando-se a contagem de colônias aos sete dias de crescimento. Os isolados obtidos em cada meio de cultivo foram armazenados em solução de água contendo glicerol (20% v v⁻¹) a -70 °C.

3.6 Caracterização dos Isolados do Extrato de Nódulos II Obtidos em Diferentes Meios de Cultura

3.6.1 Amplificação do gene 16S RNAr

O gene 16S RNAr dos diferentes isolados bacterianos do extrato de nódulos II, obtidos em cada meio de cultivo, foi amplificado usando os iniciadores 27f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1492r (5'CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC3') (AUSUBEL et al., 1992). A reação de amplificação, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada de acordo com Wang et al. (2006), utilizando volume final de 25 µl. A PCR constituiu de uma alíquota de 1 µl de suspensão de colônia em água destilada e esterilizada. Adicionou-se 15,73 µl de água, 5 µl de tampão, 0,9 µl de MgCl₂, 0,6 µl de dNTP, 0,5 µl dos iniciadores e 0,2 µl de Taq polimerase (500 U). O controle negativo consistiu da adição de 1 µl de água destilada e esterilizada. Ambos os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1% m v⁻¹) com voltagem de 80 V no tampão TAE (1x) por 1 h e os géis foram colocados em brometo de etídio, descorados em água por 30 minutos e posteriormente visualizados em fotodocumentador sob luz UV.

3.6.2 Obtenção e análise das sequências

Os produtos da PCR foram sequenciados. As reações foram realizadas em sequenciador automático ABI 3730, com auxílio do kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA). Primeiramente foi feita uma análise de todas as sequências obtidas (*forward* e *reverse*) utilizando-se o programa BioNumerics versão 7.0 (Applied Maths, Bélgica). As sequências selecionadas foram comparadas com aquelas presentes no banco de dados GenBank utilizando-se a ferramenta BLAST-N (ALTSCHUL et al., 1990). Para agrupamento dos isolados e estipes tipo foi construída uma árvore filogenética no programa MEGA 5.2, utilizando o método Neighbor-Joining e modelo Kimura-2 com *bootstrap* de 1000 replicatas (TAMURA et al., 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Extrato de Nódulos I sob Condições Axênicas (Vasos de “Leonard”) Mantidos em Casa de Vegetação

No presente estudo observou-se aos 15 DAP que as plantas inoculadas com extrato de nódulos (ExtNod) e com o inoculante rizobiano (Inoc) estavam bem noduladas (Figura 1), porém o número de nódulos (NN) não diferiu significativamente entre esses tratamentos (Tabela 3).

Aos 30 DAP, o número de nódulos das plantas que receberam o inoculante foi significativamente superior às que foram tratadas com o extrato de nódulos. No entanto, a massa seca de nódulos (MSN) provenientes da inoculação com o extrato de nódulos foi 30% superior a dos nódulos das plantas que receberam o inoculante. A massa média do nódulo (MSN/NN) foi de 0,77 mg para o tratamento ExtNod e de 0,42 mg para o Inoc, indicando um aumento médio de 77% para os nódulos das plantas inoculadas com ExtNod. Brandelero et al. (2009) em um estudo com cultivares de soja, relataram uma correlação significativa para o rendimento de grãos sobre número e massa de nódulos, mostrando que mais de 40% dos resultados do rendimento se correlacionaram com a nodulação. Entretanto existem relatos na literatura que afirmam não existir uma correlação linear entre os componentes da nodulação e a fixação de nitrogênio (HANSEN et al., 1993).

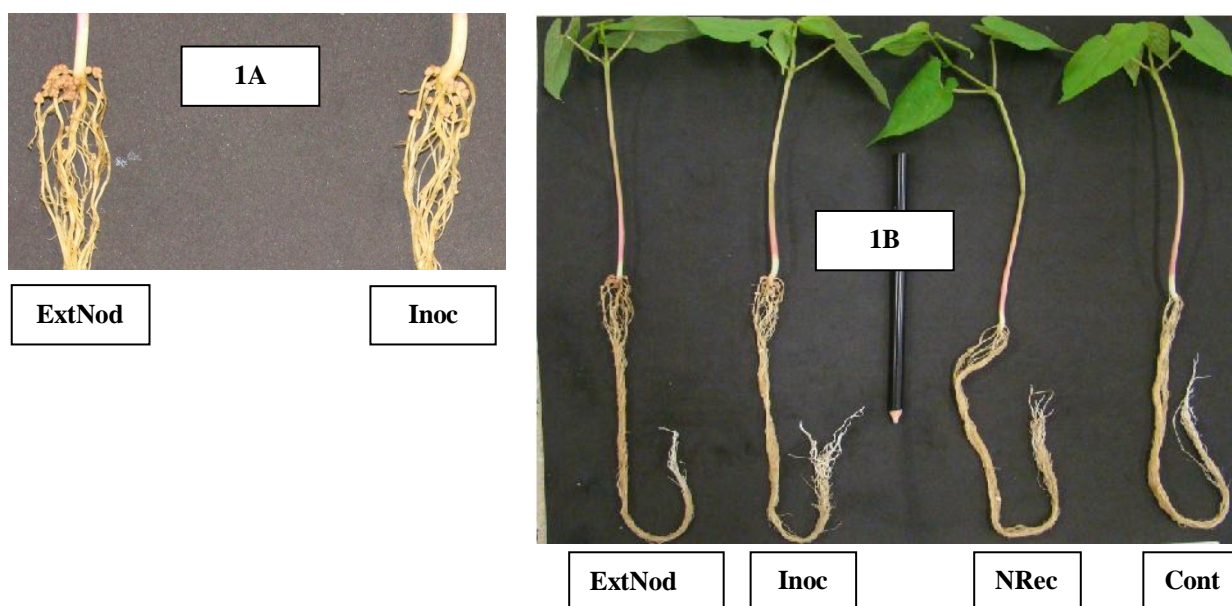


Figura 1. Nodulação (1A) e massa fresca acumulada (1B) aos 15 DAP em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha⁻¹ de N); e Cont (controle).

Embora não tenham sido constatadas diferenças significativas aos 30 dias após o plantio, os tratamentos com Inoc e ExtNod mostraram valores de biomassa 80% superiores aos das plantas do controle. A biomassa do tratamento nitrogenado foi significativamente superior a dos demais.

Os tratamentos ExtNod e Inoc aumentaram cerca de 70% o teor de N na parte aérea das plantas inoculadas em relação ao controle não diferindo entre si. Além disso, aos 30 DAP

as plantas inoculadas com ExtNod e Inoc apresentavam visualmente um verde mais intenso em relação ao Cont (Figura 2), sugerindo uma interferência positiva da inoculação no conteúdo de N das folhas.

Tabela 3. Efeito da inoculação com extrato de nódulos sobre o crescimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) aos 15 e 30 DAP. Massa seca de parte aérea em gramas por planta (MSPA g planta⁻¹); número de nódulos por planta (NN planta⁻¹); massa seca de nódulos em miligramas por planta (MSN mg planta⁻¹); teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio total em miligramas por planta (N mg planta⁻¹). Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha⁻¹ de N); e Cont (controle).

Época (DAP) ¹	MSPA g planta ⁻¹		NN planta ⁻¹		MSN mg planta ⁻¹		N %	N mg planta ⁻¹
	15 ^{ns}	30	15	30	15 ^{ns}	30		
ExtNod	0,17	0,63 b	36,75 a	171,25 b	14	133 a	3,48 b	22 b
Inoc	1,20	0,66 b	35,00 a	240,50 a	9	102 b	3,26 b	21 b
NRec	0,22	1,30 a	0,00 b	0,00 c	0	0 c	5,40 a	41 a
Cont	0,21	0,36 b	0,00 b	7,00 c	0	1 c	1,99 c	7 b
CV (%)	25,07		25,07		156,28		15,16	37,57

¹DAP: dias após o plantio; médias de quatro repetições; ns: diferenças entre médias não significativas; médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

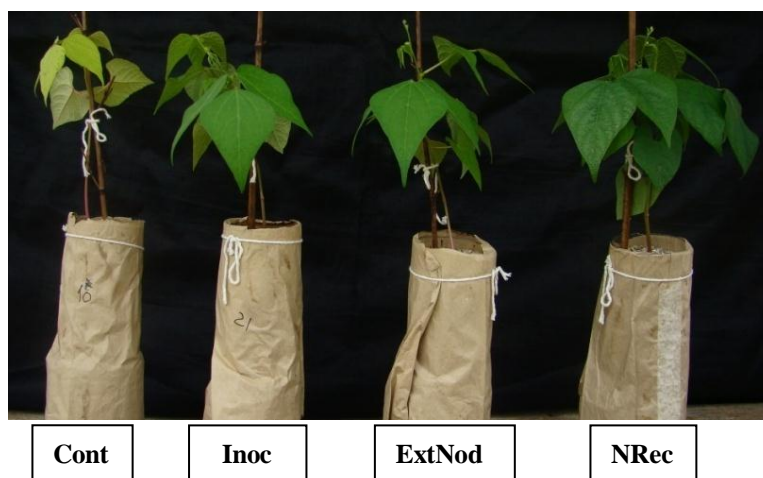


Figura 2. Biomassa aérea de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) aos 30 DAP. Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha⁻¹ de N); e Cont (controle).

Aos 30 DAP as plantas inoculadas com ExtNod mostraram superioridade estatística em relação aos demais tratamentos na razão parte aérea/raiz (Tabela 4), aumentando os valores em 40%, 45% e 60%, respectivamente, em relação ao Inoc, NRec e Cont.

Tabela 4. Efeito da inoculação com extrato de nódulos sobre a razão matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) aos 15 e 30 DAP. Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha⁻¹ de N); e Cont (controle).

Época (DAP ¹)	Razão MSPA/MSR (CV= 17,05%)	
	15 ^{ns}	30
ExtNod	3,04	3,66 a
Inoc	2,62	2,67 b
NRec	2,23	2,54 b
Cont	2,47	2,32 b

¹DAP: dias após o plantio; médias de quatro repetições; ns: diferença entre médias não significativas; médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Extrato De Nódulos I em Vasos com Solo Mantidos em Casa de Vegetação

Nesse estudo observa-se em 28 DAP que as plantas que receberam o extrato de nódulos ou o inoculante apresentavam maior média em número de nódulos (NN), diferindo-se estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 5); aos 35 DAP as plantas inoculadas com extrato de nódulos apresentaram melhor resultado, sendo significativamente superior em 64% ao inoculante. Essas tendências se repetiram para a massa seca de nódulos (MSN), em que o tratamento inoculado com ExtNod foi 63% superior ao tratamento Inoc aos 35 DAP, porém não houveram diferenças estatísticas. Os resultados obtidos com a nodulação nos tratamentos ExtNod e Inoc concordam com as descrições realizadas por Vargas et al. (1991) e Straliozzo (2002), destacando que valores superiores a 20 nódulos por planta indicam boa nodulação.

Tabela 5. Efeito da inoculação com extrato de nódulos sobre o crescimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Massa seca de parte aérea em gramas por planta (MSPA g planta⁻¹), número de nódulos por planta (NN planta⁻¹), massa seca de nódulos em miligramas por planta (MSN mg planta⁻¹) aos 7, 14, 21, 28, e 35 DAP. Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha⁻¹ de N); NStart (metade da dose de N recomendado: equivalente a 25 Kg ha⁻¹ de N); e Cont (controle) (continua).

Época (DAP ¹)	7 ^{ns}	14 ^{ns}	21 ^{ns}	28	35
	----- MSPA g planta ⁻¹ (CV=16,75%) -----				
ExtNod	0,089	0,23	0,48	0,90 a	0,96 b
Inoc	0,091	0,26	0,53	0,75 b	0,89 b
NRec	0,097	0,21	0,50	0,75 b	1,22 a
NStart	0,099	0,30	0,44	0,97 a	1,01 b
Cont	0,100	0,17	0,38	0,68 b	0,83 b

¹DAP: dias após o plantio; médias de quatro repetições; ns: diferença entre médias não significativas; médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Continuação.

Época (DAP ¹)	7 ^{ns}	14 ^{ns}	21 ^{ns}	28	35
----- NN planta ⁻¹ (CV=67%) -----					
ExtNod	0	21,66	29,33	62,33 a	127,33 a
Inoc	0	12,33	21,33	51,33 a	77,66 b
NRec	0	0,66	4,66	2,66 b	27,66 c
NStart	0	1,00	2,00	9,00 b	46,66 c
Cont	0	0,66	2,33	19,33 b	51,33 c
----- MSN mg planta ^{-1ns} (CV=77,16%) -----					
ExtNod.	0	0	23	30,0	81
Inoc	0	0	13	24,0	54
NRec	0	0	0	0,7	17
NStart	0	0	0	2,3	34
Cont	0	0	0	9,3	46

¹DAP: dias após o plantio; médias de quatro repetições; ns: diferença entre médias não significativas; médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Avaliando-se a biomassa (MSPA) aos 28 DAP observou-se que o tratamento ExtNod apresentou superioridade significativa ao Inoc, mostrando influência do ExtNod sobre essa variável, porém aos 35 DAP não se observava essa diferença. Ferreira et al. (2000) também não observaram resposta significativa do feijoeiro à inoculação em condições não estéreis em relação à produção de biomassa seca no florescimento, época correspondente aos 35 DAP.

Em relação aos dados de N mg planta⁻¹ observa-se aos 35 DAP que o ExtNod foi superior aos demais tratamentos (Tabela 6), sugerindo que os microrganismos contidos no extrato de nódulos foram eficientes no acúmulo de N na parte aérea das plantas, porém não houveram diferenças estatísticas.

Tabela 6. Efeito da inoculação com extrato de nódulos sobre o teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio total em miligramas por planta (mg planta⁻¹), na parte aérea das plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) aos 21, 28 e 35 DAP. Tratamentos: ExtNod (extrato de nódulos); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); NRec (N recomendado: equivalente a 50 Kg ha⁻¹ de N); NStart (metade da dose de N recomendado: equivalente a 25 Kg ha⁻¹ de N); e Cont (controle).

Época (DAP ¹)	----- N (%) -----			----- N mg planta ⁻¹ -----		
	21 ^{ns}	28	35 ^{ns}	21 ^{ns}	28 ^{ns}	35
ExtNod	2,76	2,03 ab	2,56	13,3	18	25,1 a
Inoc	2,44	1,67 b	2,34	13,3	12,3	20,9 ab
NRec	3,16	2,59 a	2,03	15,9	19,5	24,5 ab
NStart	2,52	1,87 ab	1,92	11,1	18,1	19,6 ab
Cont	2,49	1,88 ab	2,1	9,5	12,8	17,0 b
CV (%)	15,65			19,83		

¹DAP: dias após o plantio; médias de quatro repetições; ns: diferença entre médias não significativa; médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Células Formadoras de Nódulos e Avaliação da Inoculação de Sementes de Feijoeiro com Diluições do Extrato de Nódulos II em Garrafas Tipo “Longneck” sob Condições Axênicas em Casa De Vegetação.

No teste de NMP em feijão vermelho, estimou-se a concentração de bactérias capazes de formar nódulos em 2×10^5 células mL⁻¹ de ExtNod. Analisando os dados de massa fresca dos nódulos e índice de clorofila total observa-se que todos os tratamentos se diferenciaram estatisticamente do controle e não se diferiram entre si (Tabela 7) (Figura 3).

A diluição 10^{-4} apresentou a maior média para a variável MSPA, diferindo significativamente do controle, o que sugere uma concentração ótima de bactérias fixadoras de N e outras características benéficas em relação à capacidade de colonização e nodulação de raízes.

Tabela 7. Efeito da inoculação de sementes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com diluições do extrato de nódulos. Massa fresca de nódulos em gramas por planta (MFN g planta⁻¹), índice de clorofila total (ICT) e massa seca de parte aérea em gramas por planta (MSPA g planta⁻¹) aos 25 dias após o transplante. Tratamentos: diluições 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); e Cont (controle).

Tratamento	MFN (g.planta ⁻¹)	ICT	MSPA (g planta ⁻¹)
10^{-1}	0,199 a	25,60 a	0,33 ab
10^{-2}	0,247 a	27,30 a	0,34 ab
10^{-3}	0,199 a	29,28 a	0,32 ab
10^{-4}	0,280 a	32,02 a	0,40 a
10^{-5}	0,224 a	30,43 a	0,34 ab
10^{-6}	0,211 a	27,17 a	0,31 ab
Inoc	0,216 a	26,20 a	0,31 ab
Cont	0,022 b	16,40 b	0,27 b
CV (%)	32,3	14,53	17,17

¹DAP: dias após o plantio; médias de quatro repetições; ns: diferença entre médias não significativas; médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

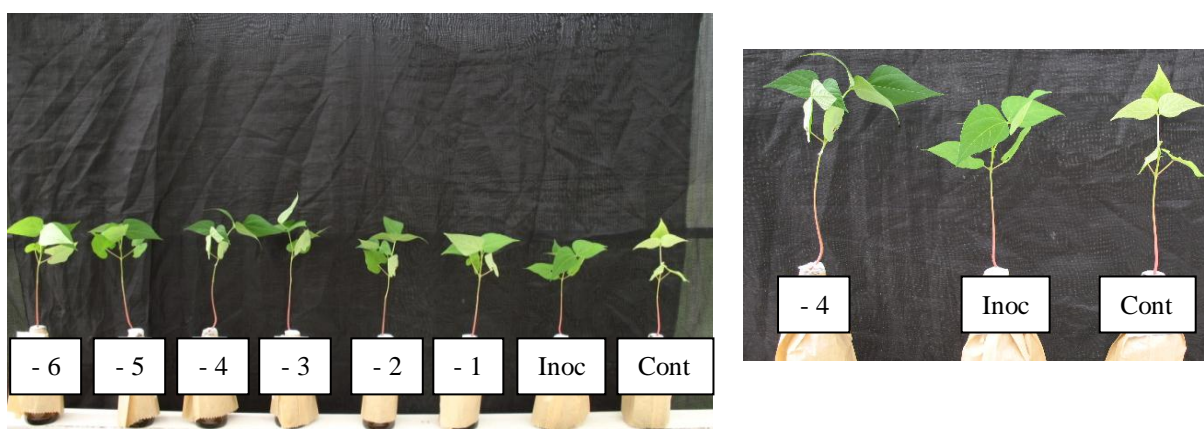


Figura 3. Inoculação de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com diferentes diluições do extrato de nódulos: -6 (diluição 10^{-6}); -5 (diluição 10^{-5}); -4 (diluição 10^{-4}); -3 (diluição 10^{-3}); -2 (diluição 10^{-2}); -1 (diluição 10^{-1}); Inoc (inoculante composto por estirpes de *R. tropici*: Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088); e Cont (controle).

4.4 Quantificação e Isolamento de Bactérias Totais no Extrato de Nódulos II Cultiváveis *In Vitro*

A seleção dos seis meios de cultura para o isolamento de bactérias totais do extrato de nódulos II foi determinada a partir de estudos anteriormente realizados no Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia. Após 24 horas de cultivo, todos os meios utilizados mostraram crescimento de biomassa microbiana. Como já era esperado, o número de colônias e a diversidade morfológica das mesmas foram dependentes do meio de cultivo e do tempo de incubação. O maior número de colônias ao longo do período de crescimento foi observado nos meios SF e YMA (10^9 UFC mL⁻¹), seguido pelo meio KB (10^7 UFC mL⁻¹) e pelos meios DYGS e LB (10^6 UFC mL⁻¹) (Figura 4). O meio TBNR em microaerofilia foi avaliado após sete dias de crescimento e apresentou o menor número de colônias (10^3 UFC mL⁻¹). Essas diferenças se relacionam às características intrínsecas de cada meio de cultivo utilizado, para as quais são determinantes a quantidade e a qualidade de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, além dos nutrientes limitantes, pressão de oxigênio, pH, condições de incubação que, em conjunto, exerceram pressão de seleção sobre a comunidade bacteriana presente no extrato de nódulos.

O meio YMA tem sido extensivamente utilizado para isolamento de bactérias diazotróficas nodulantes, tendo como fonte de carbono o manitol, que é um açúcar-álcool (FRED; WAKSMAN, 1928). O maior número de colônias após 24 horas de crescimento foi obtido nos meios YMA e SF.

O meio SF contém dextrose e extrato de leveduras e é um meio limitante ao crescimento microbiano, pois não possui fósforo disponível, sendo necessária a acidificação do complexo fósforo-cálcio para liberação desse nutriente ou a utilização de P a partir de reservas celulares que se esgotam quando são realizadas repicagens sucessivas nesse meio (ROSAS et al., 2006).

Os isolados obtidos a partir do meio SF possivelmente são capazes de solubilizar o fósforo e dado o número significativo de isolados obtidos é possível se considerar a importância dessa característica no desempenho do extrato de nódulos. Ao contrário do meio YMA, as colônias continuaram aparecendo ao longo do período de incubação. A alta concentração de dextrose pode ter surtido efeito no maior número de bactérias recuperadas nesse meio de cultivo.

O meio DYGS contém dextrose, extrato de levedura e ácidos orgânicos, sendo rico em nutrientes e vitaminas e por isso tem sido utilizado para o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos (BALDANI, 1996). Em comparação ao meio SF sua formulação contém cerca de 10% da dextrose. O meio LB contém triptona que é uma proteína obtida pela atividade da tripsina, extrato de levedura e cloreto de sódio, sendo apropriado para o cultivo de diversos microrganismos, em especial bactérias (DÓBEREINER et al., 1999).

O meio KB contém peptona (proteína atividade da pepsina), glicerol (glicerina óleo) e apresenta baixo conteúdo em ferro, sendo utilizado para isolar *Pseudomonas* spp. e outros grupos de bactérias do solo, tais como *Acinetobacter* spp., *Burkholderia* spp. e *Stenotrophomonas* spp. que produzem pigmentos e sideróforos (KING et al., 1954). No presente estudo o meio KB proporcionou o surgimento do maior número de colônias após 24 horas de crescimento, sinalizando que esse meio selecionou bactérias de crescimento mais rápido comparado aos demais meios utilizados.

O meio TBNR é utilizado no isolamento de bactérias anaeróbicas microaerofílicas, tais como *Paenibacillus* spp. (SELDIN; PENIDO, 1986).

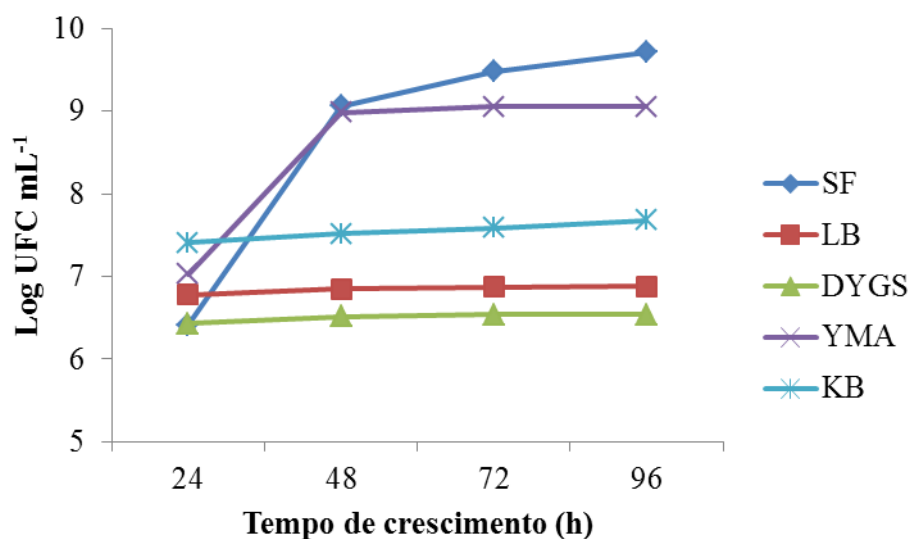


Figura 4. Número total de colônias microbianas obtidas a partir do extrato de nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em diferentes meios de cultivo até 96 horas de crescimento.

4.5 Caracterização dos Isolados do Extrato de Nódulos II em Diferentes Meios de Cultura

A comparação das sequências do gene 16S RNAr dos isolados provenientes do extrato de nódulos II com as do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) é apresentada na Tabela 8, onde foram identificados 15 gêneros diferentes a partir de 47 isolados, sugerindo uma considerável diversidade genética.

Tabela 8. Homologia das sequências do gene 16S RNAr dos isolados, obtidos no extrato de nódulos com o banco de dados NCBI (continua).

Isolado	Taxon Correspondente	%	bp ¹	Nº acesso
10D	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain W8-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1415	JX393000.1
10K	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> strain 2R46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1340	EF178437.1
11D	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain JN39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1411	KF150351.1
12D	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> strain R8-736 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1418	JQ659976.1
13D	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain EH52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1386	GU339280.1
14D	<i>Ochrobactrum haematophilum</i> strain HPG70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1457	JQ291603.1
15D	<i>Pseudomonas mosselii</i> partial 16S rRNA gene, strain WAB1873	99	1392	AM184215.1
1D	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain ALEB 5A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1356	KF460525.1
1K	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain W8-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1411	JX393000.1

¹. pares de base

Tabela 8. Continuação.

Isolado	Taxon Correspondente	%	bp ¹	N° acesso
1L	<i>Sphingobacterium multivorum</i> strain CA77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	1400	KF040986.1
1S	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain D06-95_JO 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1387	KC900372.1
1T	<i>Bacillus megaterium</i> strain MB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1422	JN874763.1
1Y	<i>Rhizobium tropici</i> strain PRF 35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1345	EU488753.1
2D	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain FSHH37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1411	KC625998.1
2K	<i>Rhizobium tropici</i> strain BRUESC261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1333	KF031510.1
2L	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> strain cp17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1413	JN082269.1
2S	<i>Arthrobacter globiformis</i> strain B-4S-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	99	1362	JF439618.1
2Y	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain ALEB 5A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1354	KF460525.1
3D	<i>Pseudomonas putida</i> strain CSY-P1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1406	KF010920.1
3K	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain 5633 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1413	HQ185400.1
3L	<i>Chryseobacterium indologenes</i> strain B7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	1392	HQ259684.1
3S	<i>Pantoea dispersa</i> strain 1413 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1408	JN645981.1
3Y	<i>Rhizobium tropici</i> strain P4-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1417	HM852122.1
4D	<i>Shinella zoogloeoides</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 81g	99	1349	AB698675.1
4K	<i>Comamonas koreensis</i> strain IHB B 1392 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1386	KF475801.1
4SA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain JMUZJ-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1412	KF286281.1
4SB	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> strain JU-B3309 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1372	KC469709.1
4Y	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> strain KUDC1825 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1410	KC355332.1
5D	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain R6-364 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1351	JQ659820.1
5K	<i>Sphingobacterium multivorum</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	99	1378	AB100739.1
5SA	<i>Chryseobacterium jejuense</i> strain JDG189 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1359	JX035956.1

¹. pares de base

Tabela 8. Continuação.

Isolado	Taxon Correspondente	%	bp ¹	Nº acesso
5SB	<i>Rhizobium tropici</i> strain SEMIA 4080 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99	1346	AF260274.2
5Y	<i>Ensifer adhaerens</i> strain M61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1346	KC934888.1
6D	<i>Chryseobacterium gleum</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	1367	FJ887952.1
6S	<i>Pseudomonas putida</i> strain LK 51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	1388	KF261578.1
6T	<i>Bacillus megaterium</i> strain TACo4-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	1396	KF032699.1
7D	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain ALEB 5A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	1356	KF460525.1
7K	<i>Comamonas koreensis</i> strain IHB B 1392 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1397	KF475801.1
7S	<i>Chryseobacterium ureilyticum</i> strain F-Fue-04IIIaaaa 16S ribosomal RNA, partial sequence	99	1381	NR042503.1
7T	<i>Bacillus megaterium</i> strain BJ51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	1413	KC857474.1
7Y	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> strain LMG 25348 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1410	HQ641452.1
8K	<i>Variovorax paradoxus</i> strain HPG173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1418	JQ291591.1
8Y	<i>Rhizobium tropici</i> strain PRF34 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99	1349	AY117623.1
8S	<i>Rhizobium multihospitium</i> strain CC-13H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1343	JN896359.1
9D	<i>Bacillus megaterium</i> strain IHB B 4625 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1401	KF475802.1
9K	<i>Chryseobacterium enrichment</i> culture clone RA-M137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1384	JQ083171.1
9Y	<i>Rhizobium vallis</i> strain CCBAU 65647 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	1349	FJ839677.1

¹. pares de base

Observou-se diferenças entre o número de gêneros encontrados e a quantidade que esses apareciam em cada meio (Tabela 9). O meio DYGS selecionou 8 gêneros diferentes, seguidos de KB (7), SF (7), YMA (4), LB (3), TBNR (1). O maior número de isolados selecionados para sequenciamento com homologia ao gênero *Rhizobium* foi encontrado no meio YMA, sugerindo que esse meio é indicado para recuperar os mesmos de extrato de nódulos. Porém, isolados desse gênero foram obtidos também a partir dos meio KB e SF.

O filograma construído com as sequências dos isolados obtidos a partir do extrato de nódulos e de estirpes tipo é apresentado na Figura 5. Observa-se um agrupamento em quatro filos: Actinobactéria (2%); Bacteriodetes (15%); Firmicutes (8,5%); e Proteobactéria (74,5%), agrupado em Beta, Gama e Alpha.

Tabela 9. Influência dos meios de cultura utilizados sob as bactérias isoladas: unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹), número de isolados sequenciados, número e identificação de gêneros encontrados nos diferentes meios de cultura.

Meio	UFC mL ⁻¹	Nº de isolados selecionados para o sequenciamento	Nº gêneros Identificados	Gêneros encontrados
DYGS	10 ⁶	14	8	<i>Acinetobacter</i> (1), <i>Agrobacterium</i> (3), <i>Bacillus</i> (1), <i>Chyseeobacterium</i> (1), <i>Ochrobactrum</i> (1), <i>Pseudomonas</i> (3), <i>Stenotrophomonas</i> (3), <i>Shinella</i> (1)
KB	10 ⁷	9	7	<i>Agrobacterium</i> (2), <i>Chyseeobacterium</i> (1), <i>Comamonas</i> (2), <i>Rhizobium</i> (1), <i>Sphingobacterium</i> (1), <i>Stenotrophomonas</i> (1), <i>Variovorax</i> (1)
SF	10 ⁹	10	7	<i>Acinetobacter</i> (1), <i>Arthrobacter</i> (1), <i>Chyseeobacterium</i> (2), <i>Pantoea</i> (1), <i>Pseudomonas</i> (2), <i>Rhizobium</i> (2), <i>Stenotrophomonas</i> (1)
YMA	10 ⁹	8	4	<i>Agrobacterium</i> (1), <i>Ensifer</i> (1), <i>Stenotrophomonas</i> (2), <i>Rhizobium</i> (4)
LB	10 ⁷	3	3	<i>Chyseeobacterium</i> (1), <i>Pseudomonas</i> (1), <i>Sphingobacterium</i> (1)
TBNR	10 ³	3	1	<i>Bacillus</i> (3)

O filo Proteobacteria representou a maior parte das bactérias encontradas. Esse filo é composto por bactérias Gram-negativas e apresentam grande diversidade de morfologia celular e fisiológica. Possuem várias estratégias para obtenção de energia, incluindo metabolismos quimiolitotrófico, quimiorganotrófico e fototrófico, além de outras vias metabólicas que são adaptadas a diversos nichos (CANHOS; VAZOLLER, 1997). Alguns isolados classificados nesse filo encontram-se agrupados a gêneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*.

O gênero *Rhizobium*, como já discutido, possui função importante no ciclo de nitrogênio, convertendo o N presente na atmosfera em amônia quando em simbiose com leguminosas. A espécie *Agrobacterium tumefaciens* é descrita como causadora de tumores em plantas, porém, apesar de estar presente no extrato de nódulos II não induziu os sintomas característicos nas plantas inoculadas em garrafas “longneck”. O gênero *Pseudomonas* possui espécies capazes de atuar como promotoras de crescimento em plantas. Burr et al. (1978) já demonstravam aumentos significativos na produção de batatas que recebiam inóculos de *Pseudomonas fluorencens* e *P. putida*. As bactérias do gênero *Stenotrophomonas* são frequentes membros da comunidade microbiana da rizosfera das plantas. Diferentes estirpes desse gênero têm sido utilizadas no controle de fitopatógenos (NAKAYAMA et al., 1999; BERG et al., 2005) e na promoção de crescimento de plantas (LUCON et al., 2008). Além disso, alguns isolados de *Stenotrophomonas nitritireducens* têm demonstrado a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (FINKMAN et al., 2000).

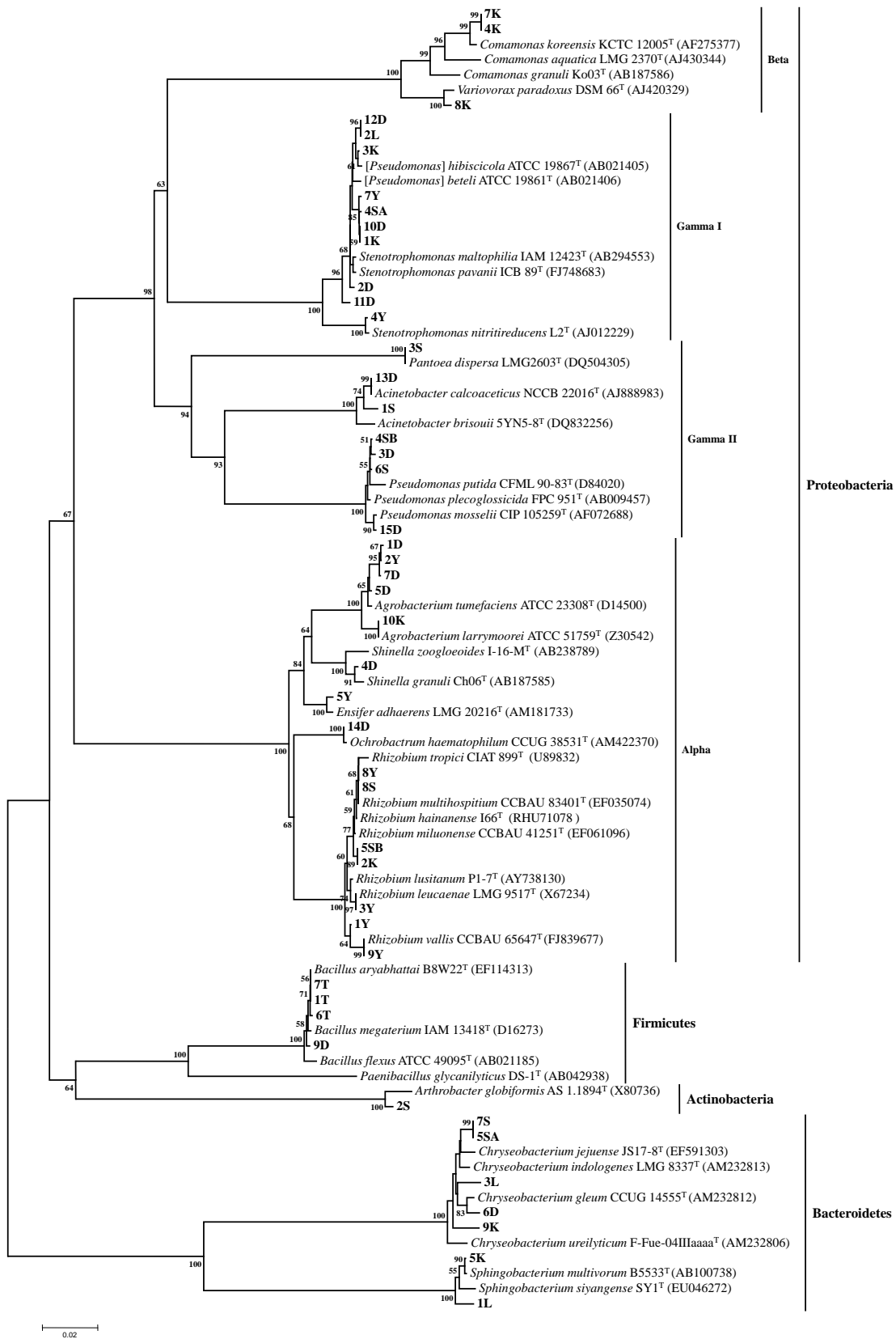


Figura 5. Árvore filogenética de seqüências do gene 16S RNAr (1164 nucleotídeos) de isolados, obtidos de extrato de nódulos de feijoeiro e estirpes relacionadas. A árvore foi construída utilizando-se o método Neighbor-Joining e modelo Kimura-2 com *bootstrap* de 1000 replicatas.

O filo Bacterioidetes é formado por bactérias Gram-negativas e possui entre seus representantes benéficos, microrganismos de solo que produzem húmus. O filo Firmicutes é composto por bactérias Gram-positivas com baixo teor de guanina e citosina, dividindo-se em dois grandes grupos filogenicamente distintos, discriminados de acordo com os teores dessas bases nitrogenadas no DNA (VAL-MORAIS et al., 2009).

Entre os isolados classificados como pertencentes ao filo Firmicutes observa-se que alguns se encontram agrupados a bactérias do gênero *Bacillus*, sendo descritas com grande potencial na solubilização de fósforo nos solos (RODRÍGUES; FRAGA, 1999). Além disso, Sindhu et al. (2002), estudando a interação entre microrganismos relata que *Bacillus* spp. coinoculado com *Bradyrhizobium* spp. melhora a nodulação e o crescimento das plantas de feijão mungo (*Vigna radiata* [L.] Wilzeck.). Esses resultados sugerem a possibilidade de interações positivas entre as bactérias fixadores de N e as promotoras de crescimento no extrato de nódulos.

O filo Actinobacteria é composto por bactérias com alto teor de guanina e citosina, compreendendo o grupo dos organismos da família Actinomycetalis e gêneros relacionados (STACKBRANDT et al., 1997). Esse grupo possui grande importância, sendo responsável pela produção de antibióticos responsáveis pelo controle de diversos grupos bacterianos.

Entre os 15 grupos de bactérias encontrados no extrato de nódulos II, a predominância foi de bactérias do gênero *Stenotrophomonas* com 17%, seguidas de *Rhizobium* (15%), *Pseudomonas* (13%), *Agrobacterium* (11%), *Chryseobacterium* (11%) e *Bacillus* (9%), além de outras com menor expressão (Figura 6). Essa diversidade sugere que extrato de nódulos além de ser fonte de rizóbios, constitui-se de outros grupos de bactérias, sugerindo uma interação positiva entre esses grupos em benefício do crescimento da planta.

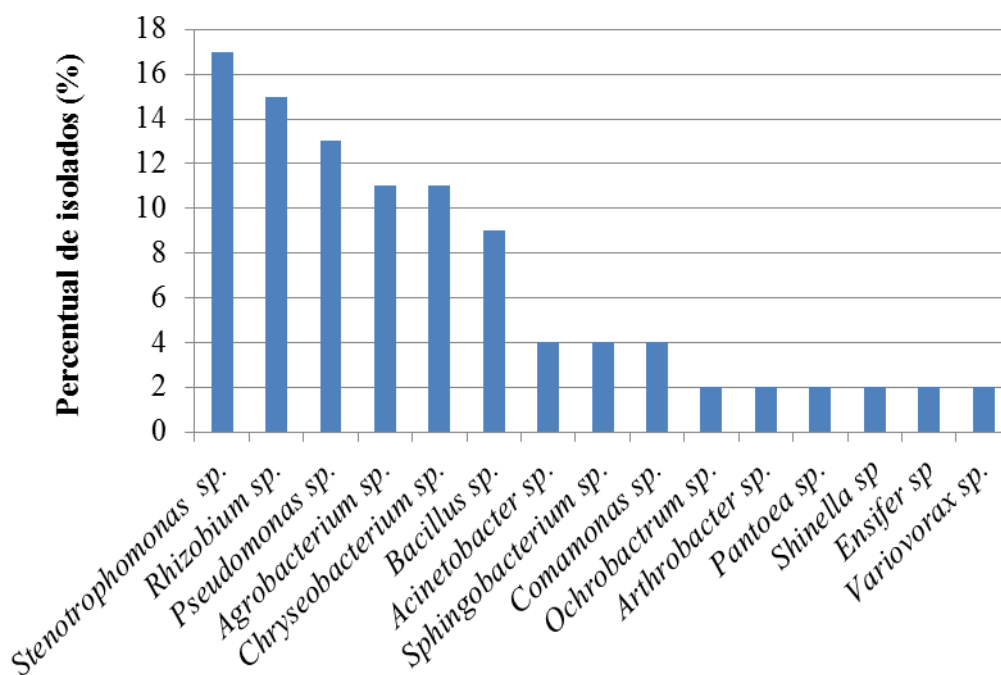


Figura 6. Percentagem (%) dos grupos de bactérias obtidos no extrato de nódulos, após o sequenciamento do gene 16S RNAr.

5 CONCLUSÕES

Esse trabalho avaliou o desempenho de uma prática alternativa de inoculação de sementes de feijoeiro cv. Ouro Vermelho a base de extratos de nódulos.

A inoculação com extrato de nódulos sob condições de casa de vegetação, é capaz de promover até os 35 dias após o plantio, desempenho similar ao inoculante rizobiano em relação aos seguintes parâmetros: número e massa seca de nódulos; teor e N acumulado na parte aérea.

A concentração de bactérias capazes de formar nódulos presentes no extrato de nódulos é estimada em 2×10^5 células mL⁻¹.

Os meios YMA e SF são os que recuperam maior número de isolados do extrato de nódulos (10^9 UFC mL⁻¹).

Os principais gêneros bacterianos presentes no extrato de nódulos: *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium* e *Sphingobacterium*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse trabalho têm grande importância na busca de alternativas à inoculação tradicional, direcionando-se principalmente ao pequeno produtor de feijão que tem dificuldade de encontrar o inoculante comercial. O uso da prática alternativa de inoculação a base de extrato de nódulos pode maximizar a FBN na cultura do feijoeiro, além de favorecer outras características relevantes, ajudando a reduzir custos de produção e aumentando o lucro do produtor.

A diversidade bacteriana encontrada sugere que além de fixação biológica de nitrogênio devem estar presentes outras características capazes de promover o crescimento de plantas e proporcionar interações benéficas entre os microrganismos presentes.

Apesar dos resultados promissores novos estudos em condições controladas e em condições de campo com variações de solo, extratos de nódulos e variedades de feijoeiro devem ser realizados, buscando concretizar e validar essa prática.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANE, M. I. V.; VIEIRA, C.; NOVAIS, R. F.; ARAÚJO, G. A. A. Adubação nitrogenada e molíbdica da cultura do feijão na zona da mata de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, n. 3, p. 643-650, 1999.

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 996-1006, 1997.

ANPII – Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes. **Vendas de inoculantes das empresas filiadas à ANPII**. 2013. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/?estatistica/2/>>. Acesso em: 17/08/2013

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

AUSUBEL F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York, USA: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1992.

AZEVEDO, C. M. A.; SILVA, F. A. **Regras para o Acesso Legal ao Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente – Departamento do Patrimônio Genético, 2005.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 234 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 1996.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1673-1685, 2005.

BRANDELERO, E. M.; PEIXOTO, C. P.; RALISCH, R. Nodulação de cultivares de soja e seus efeitos no rendimento de grãos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 581-588, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3-7.

BRITO, O. R.; OTSUBO, A. A.; MERCANTE, F. M.; OTSUBO, V. H. N. Inoculação com *Rhizobium tropici* e a adubação nitrogenada em linhagens de feijão preto. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 33, 2011, Uberlândia, MG. **Anais...** Viçosa, MG: SBCS, 2011.

BURR, T. J.; SCHORTH, M. N.; SUSLOW, T. V. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**, v. 68, p. 1377-1383, 1978.

CANHOS, V. P.; VAZOLLER, R. F. Diversidade no domínio bactéria. In: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. M. (Org.). **Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 1 Microorganismos & Vírus.** São Paulo: FAPESP, 1997. p. 1-13.

CARNEIRO, J. E. S.; SILVA, L. C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; ARAÚJO, G. A. A.; CARNEIRO, P. C. S.; GIÚDICE, M. P. D.; MENEZES JÚNIOR, J. A. N.; RAMALHO, M. A. P.; PELOSO, M. J. D.; ABREU, A. F. B.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. 'Ouro Vermelho': new red bean cultivar for Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, East Lansing**, v. 49, p. 281-282, 2006.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão.** 2 ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 143-170.

CHAGAS, J. M. Considerações sobre a cultura do feijão de inverno em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 178, p. 5-8, 1994.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Estudo de prospecção de mercado: safra 2012/2013.** Brasília, 2012.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento, julho de 2013.** Brasília, 2013.

DÖBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. **Biotecnologia Ciência**, p. 2-3, 1997.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia.** Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 1999. 38 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 110).

FERREIRA, A. N.; ARF, O.; CARVALHO, M. A. C.; ARAÚJO, R. S.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 507-512, 2000.

FERREIRA, C. M.; SANTOS, M. L.; BRAGA, M. J.; PELOSO, M. J. D. Aspectos econômicos. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão.** 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p.19-40.

FERREIRA, P. A. A.; SILVA, M. A. P.; CASSETARI, A.; RUFFINI, M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2210-2212, 2009.

FINKMANN, W.; ALTENDORF, K.; STACKEBRANDT, E.; LIPSKI, A. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 273-282, 2000.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology.** New York: McGraw-Hill Book Company, 1928. 145p.

FREIRE, J. R. J.; VERNETTI, F. J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 5, p. 117-126, 1999.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, 2012.

HANSEN, A. P.; YONEYAMA, T.; KOUCHI, H.; MARTIN, P. Respiration and nitrogen fixation of hydroponically cultured *Phaseolus vulgaris* L. cv. OAC Rico and a supernodulating mutant. **Planta**, v. 189, n. 4, p. 546-556, 1993.

HARDARSON, G.; BLISS, F. A.; CIGALES-RIVERO, M. R.; HENSON, R. A.; KIPE-NOLT, J. A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABRIALES, J. J.; PEREIRA, P. A. A.; SANABRIA, C. A.; TSAI, S. M. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. **Plant and Soil**, v. 152, n. 1, p. 59-70, 1993.

HAWERROTH, F. J.; CRESTANI, M.; SANTOS, J. C. P. Desempenho de cultivares de feijoeiro sob inoculação com *Rhizobium* e relação entre os caracteres componentes do rendimento de grãos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 897-908, 2011.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v. 149, n. 1, p. 95-102, 1993.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.; VARGAS, M. A. T. Fixação biológica do N₂ na cultura do feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 1997. p. 187-294.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 2, p. 88-93, 2003.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Inoculante em soja. **Informativo Grupo Bio soja**, n. 6, p. 3, 2007.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; MERCANTE, F. M. **Tecnologia de fixação biológica do nitrogênio com o feijoeiro**: viabilidade em pequenas propriedades familiares e em propriedades tecnificadas. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2013. 30 p. (Embrapa Soja. Documentos, 338).

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006. Agricultura familiar. Primeiros resultados**: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, 2009.

INIAP – Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. **Metodos de Campo**. In: Curso Eco-Suelos: los secretos de la vida del suelo y su manejo para una agricultura más sostenible/ Encuentro entre agricultores experimentadores y taller de manejo ecológico de suelos 26-28 de junio 2002. 2002. 43 p. (INIAP/Estación Experimental Sta. Catalina).

JORDAN, D C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N R; HOLT, J G (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians e Wilkins, 1984. p. 235-244.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

LUCON, C. M. M.; AKAMATSU, M. A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 691-697, 2008.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 417-426, 1991.

MELO, L. C.; MELO, P. G. S.; FARIA, L. C.; DIAZ, J. L. C.; PELOSO, M. J. D.; RAVA, C. A.; COSTA, J. G. C. Interação com ambientes e estabilidade de genótipos de feijoeiro-comum na Região Centro-Sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 715-723, 2007.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; MORAES, C. B.; HUNGRIA, M. **Inoculação do feijoeiro em Unai, MG**: cartilha para o produtor rural. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 16 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 175).

MERCANTE, F. M.; STRALIOTTO, R.; DUQUE, F. F.; FRANCO, A. A. **A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1992. 8 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 10)

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2, p. 121-132, 2002.

MUSANDU, A. A. O.; JOSHUA, O. O. Response of common bean to *Rhizobium* inoculation and fertilizers. **The Journal of Food Tecnology in Africa**, v. 6, n. 4, p. 121-125, 2001.

NAKAYAMA, T.; HOMMA, Y.; HASHIDOKO, Y.; MIZUTANI, J.; TAHARA, S. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4334-4339, 1999.

NOGUEIRA, A. R.; SOUZA, G. B. **Manual de laboratórios**: solo, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313 p.

NOGUEIRA, C. O. G. **Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade das populações que nodulam o feijoeiro-comum em Formiga – MG.** 2005. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005.

PACHECO, R. S.; BRITO, L. F.; FERREIRA, E. P. B.; STRALIOTTO, R.; ARAÚJO, A. P. Crescimento e produção de cultivares de feijoeiro sob inoculação com rizóbio em comparação à adubação nitrogenada. Fertibio, 2012, Maceió, AL. **Anais...** Viçosa, MG: SBCS, 2012.

PEIXOTO, M. **Extensão Rural no Brasil:** uma abordagem histórica da legislação. Brasília, DF: Consultoria Legislativa do Senado Federal, 2008. 50p.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; REIS, V. M. Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. (Ed.). **Biotecnologia:** estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 247-281.

REIS, V. M. Como fazer uma agricultura verde usando o mais antigo processo de obtenção de nitrogênio em plantas. **Acta Scientiae et Technicae**, v. 1, n. 1, p. 15-23, 2013.

RODRÍGUES, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROSAS, S. B.; ANDRÉS, J. A.; ROVERA, M.; CORREA, N. S. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 3502-3505, 2006.

RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B.; MATSUI, E.; VICTORIA, R. L.; TSAI SAITO, S. M. Field evaluation of N₂-fixation and N-utilization by phaseolus bean varieties determined by ¹⁵N isotope dilution. **Plant and Soil**, v. 65, n. 3, p. 397-407, 1982.

SALGADO, L. T.; VIEIRA, R. F. Macronutrientes na cultura do feijão. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 178, p. 11-19, 1994.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 2, p. 374-377, 1993.

SEIFFERT, N. S. **Leguminosas para pastagens no Brasil central.** Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte, 1984. 131 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 7).

SELDIN, L.; PENIDO, E. G. C. Identification of *Bacillus azotofixans* using API tests. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 52, n. 5, p. 403-409, 1986.

SINDHU, S. S.; GUPTA, S. K.; SUNEJA, S.; DADARWAL, K. R. Enhancement of green gram nodulation and growth by *Bacillus* species. **Biologia Plantarum**, v. 45, n. 1, p. 117-120, 2002.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 479-491, 1997.

STRALIOTTO, R. **A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro.** Brasília: Embrapa, 2002. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbnl_inocula_feijoeiro>. Acesso em: 13/8/2013.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAYLOR, R. W.; WILLIAMS, M. L.; SISTANI, K. R. N₂ fixation by soybean-Bradyrhizobium combinations under acidity, low P and high Al stresses. **Plant and Soil**, v. 131, n. 2, p. 293-300, 1991.

TSAI, S. M.; BONETTI, R.; AGBALA, S. M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, v. 152, n. 1, p. 131-138, 1993.

VAL-MORAES, S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS, E. G. M.; CARARETO-ALVES, L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, p. 7-16, 2009.

VARGAS, A. A. T.; SILVEIRA, J. S. M.; ATHAYDE, J. T.; ATHAYDE, A.; PACOVA, B. E. V. Comparação entre genótipos de feijão quanto à capacidade nodulante e à produtividade com inoculação com rizóbios e/ou adubação de N-mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 15, p.267-272, 1991.

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

WANG, M. L.; CHEN, Z. B.; BARKLEY, N. A.; NEWMAN, M. L.; KIM, W.; RAYMER, P.; PEDERSON, G. A. Characterization of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz) germplasm by transferred SSRs from wheat, maize and sorghum. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n. 4, p. 779-791, 2006.

WUTKE, E. B.; AMBROSANO, E. J.; RAZERA, L. F.; MEDINA, P. F.; CARVALHO, L. H.; KIKUTI, H. **Bancos comunitários de sementes: cartilha para agricultores.** Campinas, SP: MAPA/FUNDAG, 2007. 20 p.

WUTKE, E. B.; AMBROSANO, E. J.; DIAS, R. P.; LAURINO, M. S.; GONÇALVES, J. R. A. **Bancos comunitários de sementes: informações técnicas.** Brasília, DF: MAPA, 2012. 52 p.

8 ANEXOS

A – Solução nutritiva de Norris modificada

B – Como fazer a inoculação

C – Meios de cultura

D – Bactérias de extrato de nódulos

Anexo A – Solução nutritiva de Norris modificada

Tabela 10. Solução nutritiva de Norris modificada.

Reagente	Quantidade	Preparo da solução estoque
K_2HPO_4	1 mL	Solução 1 M (87,1 g em 0,5 L de água destilada esterilizada)
KCL	1 mL	Solução 1 M (37,26 g em 0,5 L de água destilada esterilizada)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 mL	Solução 1 M (123,23 g em 0,5 L de água destilada esterilizada)
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,344 g	
Solução de micronutrientes para a solução de Norris	0,5 mL	H_3BO_3 ...1,43 g $MnSO_4 \cdot H_2O$...2,03g $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$...0,22 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$...0,08 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$...0,01 g Completar o volume para 1 L com água destilada esterilizada
Solução de Fe para a solução de Norris	0,5 mL	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$...5 g Ácido cítrico...5 g Completar o volume para 1 L com água destilada esterilizada
Água destilada esterilizada	Completar o volume de 1 L	
Obs. 1 - Para volumes de solução maiores que 1 L multiplicar o volume da solução pelo volume ou massa do reagente listado acima		
Obs. 2 - Para o preparo da solução estoque usar vidraria e água esterilizadas		

Anexo B – Como fazer a inoculação

1. Misturar 200 a 300 mL (um copo de requeijão) de água ao conteúdo do pacote (250g) até formar uma pasta homogênea.
2. Misturar esta pasta com as sementes até que todas elas sejam envolvidas por uma camada uniforme de inoculante. Para melhorar a aderência, tem sido recomendado substituir a água por uma solução açucarada, preparada dissolvendo-se sete colheres de sopa de açúcar cristal em um litro de água. Todo esse procedimento deve ser feito à sombra.
3. Espalhar as sementes e deixar secar em um lugar sombreado, fresco e arejado. Sementes assim inoculadas podem ser plantadas até o dia seguinte ao da inoculação; caso contrário as sementes devem ser reinoculadas.
4. Cada dose de 250 g (água + inoculante) deve ser usada para as seguintes quantidades de sementes, conforme seu tamanho:
 - Sementes pequenas: 10 Kg (estilozantes, desmodium, alfafa, trevo, *Acacia mangium*, etc);
 - Sementes médias: 20 Kg (calopogônio, soja perene, mimosas, leucena, gliricídia, siratro, centrosema, *Calliandra* spp., etc);
 - Sementes grandes: 50 Kg (soja, feijão-caupi, amendoim, guandu, ervilha, fava, eritrina (mulungú), mucuna, feijão-de-porco, etc.) Para soja e feijão, recomenda-se usar até o dobro da dosagem, ou seja, 500 g de inoculante.

Anexo C – Meios de Cultura

Tabela 11. Meio DYGS (Dextrose Yeast Extract).

Reagente	Quantidade
Ácido glutâmico	1,5 g
Ácido málico	2,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Dextrose	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Ágar	15,0 g
Completar com 1 L de água destilada	

Tabela 12. Meio LB (Luria-Bertani).

Reagente	Quantidade
Extrato de levedura	5,0 g
NaCl	10,0 g
Triptona	10,0 g
Ágar	15,0 g
Completar com 1 L de água destilada	

Tabela 13. Meio KB (King B).

Reagente	Quantidade
Glicerol	10,0 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Peptona	20,0 g
Ágar	15,0 g
Completar com 1 L de água destilada	

Tabela 14. Meio SF (Solubilização de Fósforo) modificado.

Reagente	Quantidade
Dextrose	20,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,0 g
Ágar	15,0 g
Completar com 1 L de água destilada	

Tabela 15. Meio YMA (Yeast Extract Mannitol Agar) com azul de bromotimol.

Reagente	Quantidade
Extrato de levedura	0,4 g
K ₂ HPO ₄ (solução a 10%)	1,0 mL
KH ₂ PO ₄ (solução a 10%)	4,0 mL
Manitol (solução a 10%)	10,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (solução a 10%)	2,0 mL
NaCl (solução a 10%)	1,0 mL
Azul de bromotimol (0,5% em 0,2N de KOH)	5,0 mL
Ágar	15,0 g
Completar com 1 L de água destilada	

Tabela 16. Meio TBNR.

Reagente	Quantidade
Biotina (solução a 0,1%)	1,0 mL
Dextrose	10,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
FeCl ₃ .6H ₂ O (solução a 1%)	1,0 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O (solução a 1%)	2,0 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (solução a 1%)	0,5 mL
NaOH 2N	2,0 mL
Solução de micronutrientes de Norris modificada	1,0 mL
Tiamina (solução a 0,1%)	1,0 mL
Azul de bromotimol	2,0 mL
Ágar	12,0 g
Completar com 1 L de água destilada	

Anexo D – Bactérias de extrato de nódulos



Figura 7. Isolado 5D – Meio DYGS.

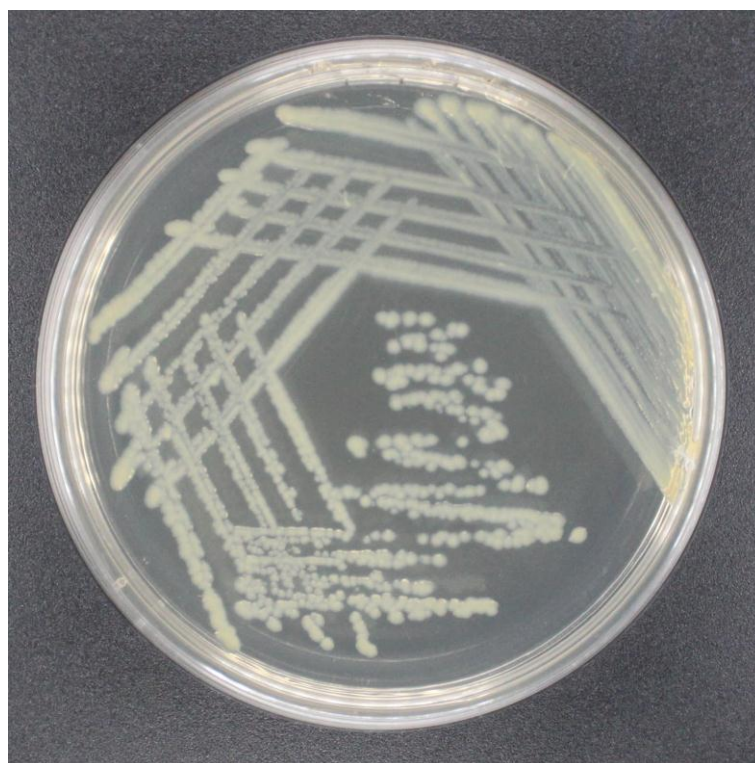


Figura 8. Isolado 3K – Meio KB.



Figura 9. Isolado L3 – Meio LB.



Figura 10. Isolado S3 – Meio SF.



Figura 11. Isolado 8Y – Meio YMA.



Figura 12. Isolado 1L – Meio LB.