

**INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJOEIRO COM RIZÓBIOS LOCALMENTE ADAPTADOS:
PADRONIZAÇÃO DA PRÁTICA ALTERNATIVA E CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE
BACTERIANA DO NÓDULO¹**

Brauly Martins Rocha²

Norma Gouvêa Rumjanek³

Claudia Alexandrino de Alencar⁴

Jakson Leite⁵

Anelise Dias⁶

Resumo

Na literatura existem alguns relatos de uso de inoculantes rizobianos à base de macerado de nódulos, porém, não existe uma metodologia padronizada. Essa prática bem elaborada e prontamente disponível ao agricultor de feijão pode representar uma alternativa para otimizar a fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo é propor uma formulação de inoculante à base de um macerado de nódulos de raízes do feijoeiro, caracterizar a sua comunidade bacteriana e avaliar o desempenho da formulação como alternativa ao inoculante rizobiano comercial. Foram conduzidos experimentos em casa de vegetação com dois preparados de nódulos de feijoeiro, cultivados no município de Rio Pomba, MG. A eficiência do preparado de nódulos foi comparada à do inoculante comercial, composto pelas 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, as massas frescas e secas dos nódulos, as massas secas da parte aérea e das raízes, o teor e o conteúdo de N acumulado na parte aérea foram avaliadas em experimentos sob condições axênicas e vasos com solo. Foi também caracterizada a comunidade bacteriana dos nódulos por meio do sequenciamento da região do 16S rRNA. O preparado de nódulos demonstrou eficiência superior ao inoculante rizobiano quanta à biomassa da parte aérea aos 28 DAP quando cultivada em vasos com solo. Nessas condições, o número de nódulos foi superior em cerca de 60% ao inoculante comercial aos 35 DAP. Além disso, foi demonstrado o efeito do preparado de nódulos sobre a razão parte aérea/raiz nas plantas crescidas sob condições axênicas aos 30 DAP, proporcionando aumentos de 40%, 45% e 60%, respectivamente, em relação aos tratamentos inoculante rizobiano, N recomendado e Controle. A caracterização genética de 47 isolados obtidos revelou expressiva diversidade de gêneros bacterianos no preparado de nódulos, sendo os principais: *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium* e *Sphingobacterium*. A inoculação com preparado de nódulos demonstra potencial para maximizar a promoção de crescimento de plantas de feijoeiro.

Palavras-chave: Agricultura Orgânica. Rizóbio. Comunidade Bacteriana de Nódulos.

**INOCULATION OF BEAN SEEDS WITH LOCALLY ADAPTED RHIZOBIA: STANDARDIZATION
OF ALTERNATIVE PRACTICE AND CHARACTERIZATION OF THE NODULE BACTERIAL
COMMUNITY**

Abstract

There are some reports in the literature on the use of rhizobial inoculants based on nodule maceration, but without a standardized methodology. A well-designed and readily available practice could represent an alternative to optimize the biological nitrogen fixation on beans. In this context, the objective of the present study is to propose an inoculant formulation based on a bean nodule macerate, to characterize its bacterial community, and to evaluate its performance

¹ Este trabalho faz parte da Dissertação do primeiro autor intitulada “Prática Alternativa de Inoculação de Sementes de Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Ouro Vermelho) com Estirpes Rizobianas Localmente Adaptadas” do Programa de Pós-graduação em Agricultura Orgânica (Parceria: UFRRJ, Embrapa Agrobiologia e Pesagro-Rio).

² Mestre em Agricultura Orgânica pela UFRRJ. Técnico em Agropecuária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba. E-mail: brauly.martins@ifsudestemg.edu.br

³ Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia. E-mail: norma.rumjanek@embrapa.br

⁴ Bióloga. E-mail: claudialindaalencar@gmail.com

⁵ Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará - Campus Itaituba. E-mail: jakson.leite@ifpa.edu.br

⁶ Professora da UFRRJ. E-mail: anelise.dias@gmail.com

as an alternative to the rhizobium commercial inoculant. Experiments were conducted in a greenhouse with two preparations of bean nodules, grown in the municipality of Rio Pomba, MG. The efficiency of the nodule preparation was compared to that of the commercial inoculant, composed of the strains registered at the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), and the application of N recommended for the culture. Up to 35 days after planting, nodule number, nodule fresh and dry masses, shoot and root dry masses, shoot N content were evaluated under axenic conditions and in a pot filled with soil experiment. In addition, the nodule bacterial microbiome was characterized using the sequencing of the 16S rRNA region. The nodule preparation showed higher efficiency than the commercial inoculant on the shoot part biomass at 28 DAP when grown in pots with soil. Under these conditions, the number of nodules was about 60% higher than the commercial inoculant at 35 DAP. In addition, the effect of the nodule preparation on the shoot / root ratio in plants grown under axenic conditions at 30 DAP was demonstrated, providing increases of 40%, 45% and 60%, respectively, in relation to the treatments with rhizobial inoculant, N Recommended and Control. The genetic characterization of 47 isolates obtained revealed a significant diversity of bacterial genera in the nodule preparation, the main ones being: *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium* and *Sphingobacterium*. Inoculation with nodule preparation shows potential to maximize the growth promotion of bean plants.

Keywords: Organic Agriculture. Rhizobium. Nodule Bacterial Community.

1 Introdução

No Brasil, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma importante fonte de proteínas e sais minerais da população. Essa cultura tem grande potencial em sistemas orgânicos de produção no país, porque se adapta bem às diferentes condições edafoclimáticas no país. A adesão dos agricultores aos sistemas orgânicos de produção via certificação vem aumentando ao longo dos anos em várias partes do mundo

Entre as limitações do cultivo orgânico do feijoeiro destaca-se a falta de informações técnicas adaptadas para o feijão, a qual destacamos o manejo da fertilidade do solo nesses sistemas de cultivo. O nitrogênio é o nutriente mais absorvido pelo feijoal, seguido de potássio, cálcio, enxofre, magnésio e fósforo (HAAG *et al.*, 1967; COBRA NETO; ACCORSI; MALAVOLTA, 1971) e o que mais influencia o crescimento da cultura (NASCENTE *et al.*, 2017). O feijão absorve N, principalmente por duas fontes: solo (adubação ou mineralização da matéria orgânica) e fixação biológica de N (FBN).

Os aportes de N no solo para o feijão em sistemas orgânicos podem advir de compostos orgânicos, biofertilizantes, adubos verdes e resíduos vegetais, como o farelo de mamona. Contanto, a possibilidade de se explorar a FBN da cultura durante o seu próprio ciclo pode diminuir a necessidade de aportes de N diretamente no solo. Além disso, sendo o feijão um fixador pobre do N atmosférico com maior variabilidade no processo simbiótico em relação à soja (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008), ainda é possível maximizar a FBN a partir da inoculação com estirpes eficientes ou elites selecionadas (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991; HUNGRIA *et al.*, 2000; 2003).

A prática de inoculação com essas estirpes é permitida no cultivo orgânico do feijão, mas a produção e a distribuição do inoculante são limitadas e incapazes de atender aos agricultores dispersos em todo o território nacional e ao cultivo ao longo de todo o ano, configurando-se em um cenário muito diferente do que ocorre com o cultivo da soja. Nos dados da Associação dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), 0,4% dos inoculantes vendidos em 2018 pelas empresas filiadas foram destinados para a produção de feijão, enquanto a maior fração, 87%, para a produção de soja (ANPII, 2018).

Nos últimos anos alguns trabalhos têm apresentado alternativas à inoculação tradicional. Uma proposta para preparo de um inoculante alternativo à base de nódulos de solo da própria propriedade foi descrita (INIAP, 2002). O procedimento é simples: nódulos ativos (cor rosa) são coletados de raízes e posteriormente lavados, homogeneizados em liquidificador (água com açúcar), misturados com turfa e aplicados às sementes. Procedimento semelhante utilizou nódulos macerados em água, aos quais foram adicionados fosfato natural, calcário, pó de carvão ou argila, o que facilitou a visualização na mistura com as sementes (WUTKE *et al.*, 2007). Foi também relatada uma metodologia que utiliza apenas o macerado de nódulos com um pouco de açúcar diluído, visando aumentar a adesão às sementes (WUTKE *et al.*, 2012). Foi sugerido por esses autores que a prática é benéfica para a manutenção e o aumento da população de rizóbios bem adaptados ao local de plantio.

Apesar desses relatos, não foram encontrados estudos que demonstrassem a viabilidade técnica dessa prática e que determinassem uma metodologia padronizada: número de células, estabilidade do inóculo, veículo disponível, etc. Portanto, avançar nesses estudos configura-se em 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, disponível ao agricultor.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo é propor uma formulação de inoculante à base de um macerado de nódulos de raízes do feijoeiro, caracterizar a sua comunidade bacteriana e avaliar o desempenho da formulação como alternativa ao inoculante rizobiano comercial.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção das preparações de nódulos

Foram obtidas duas preparações de nódulos, I e II, provenientes de nódulos de plantas de feijoeiro de áreas com cultivos sucessivos da cultura. As plantas foram retiradas com o auxílio de uma pá reta com aproximadamente 30 dias da semeadura. Suas raízes foram lavadas, retirando-se nódulos suficientes para preencher uma medida correspondente a 20 mL, sendo acrescentados 50 mL de água filtrada. A suspensão foi homogeneizada em liquidificador e, em seguida, filtrada. Os nódulos para a preparação I foram obtidos em uma área de plantio de feijão, cultivar Ouro Vermelho, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba, localizado à Av. Dr. José Sebastião da Paixão, s/n, Bairro Lindo Vale, Rio Pomba, MG. Os nódulos para a preparação II foram provenientes de plantas de feijoeiro, cultivar Ouro Vermelho, do Sítio Humaitá, 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).

2.2 Avaliação da inoculação de sementes de feijoeiro com preparado 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 e em duas coletas aos 15 e 30 dias após o plantio (DAP). Os tratamentos foram: preparado de nódulos (PrepNod); inoculante rizobiano (Inoc); nitrogênio recomendado, 50 Kg ha⁻¹ (NRec); e controle (Cont). Foram semeadas quatro sementes por vaso inoculadas com preparado 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 e 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 e o tratamento nitrogenado recebeu 50 Kg ha⁻¹ de N na forma de ureia, parcelados semanalmente. As variáveis avaliadas foram: massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e razão parte aérea/raiz aos 15 e 30 DAP; teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas (N mg) aos 30 DAP. O teor de N foi determinado de acordo com o método de Kjedahl (HILDEBRAND, 1976). As diferenças entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3 Avaliação da inoculação de sementes de feijoeiro com preparado 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: preparado de nódulos (PrepNod); 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 preparado de nódulos I foi misturado a um veículo alternativo, procedendo-se, em seguida, à inoculação das sementes. Foi preparado em fogo baixo uma mistura de 12 gramas de amido de milho em 60 mL de água, que após alcançar a temperatura ambiente foi acrescentada a um volume de 40 mL de nódulos e homogeneizada em liquidificador. Após realizado esse procedimento, foram retirados 30 mL do inoculante alternativo (preparado de nódulos) e misturados com 150 gramas de sementes de feijão em um saco plástico, esperando secar à sombra por uma hora para fazer o plantio. O inoculante rizobiano foi composto pelas mesmas estirpes do experimento anterior (Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088) em veículo turfoso, inoculando-se as sementes na proporção de 250 g de inoculante 250 mL de água para cada 50 Kg de sementes. O inoculante foi misturado com à água e adicionado às sementes, misturando-se novamente. Também esperou-se secar à sombra por uma hora para fazer o plantio. Aos 12 DAP, as plantas receberam 30 mL de solução nutritiva de Norris modificada (2x). 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 teor de nitrogênio foi determinado de acordo com o método de Kjedahl (HILDEBRAND, 1976). As diferenças entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.4 Quantificação e isolamento de bactérias totais no preparado de nódulos II cultiváveis *in vitro*

O preparado 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 glicerol/água (20% v/v¹) a -70 °C.

2.5 Caracterização dos isolados do preparado de nódulos II obtidos a partir de diferentes meios de cultura

2.5.1 Amplificação do gene 16S RNAr

O gene 16S RNAr dos diferentes isolados bacterianos do preparado de nódulos II, obtidos em cada meio de cultivo, foi amplificado usando os iniciadores 27f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1492r (5'CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTG3') (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 na adição de 1 μl de água destilada e esterilizada. Ambos os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1% m/v¹) com voltagem de 80 V no tampão TAE (1x) por 1 h, em seguida os géis foram colocados em brometo de etídio, descorados em água por 30 minutos e, posteriormente, visualizados em fotodocumentador sob luz UV.

2.5.2 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 estirpes 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).

3. Resultados e Discussão

3.1 Avaliação da inoculação de sementes de feijoeiro com o preparado 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 o preparado de nódulos e com o inoculante rizobiano estavam bem noduladas, embora o número de nódulos não tenha diferido significativamente entre os dois tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da inoculação com preparado de nódulos sobre o crescimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) aos 15 e 30 DAP. Número de nódulos por planta (NN planta⁻¹); massa seca de nódulos em miligramas por planta (MSN mg planta⁻¹); massa seca de parte aérea em gramas por planta (MSPA g planta⁻¹); teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio total em miligramas por planta (N mg planta⁻¹). Tratamentos: PrepNod (preparado 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	NN planta ⁻¹		MSN mg planta ⁻¹		MSPA g planta ⁻¹		N %	N mg planta ⁻¹
	15	30	15 ^{ns}	30	15 ^{ns}	30		
PrepNod	36,75 a	171,25 b	14	133 a	0,17	0,63 b	3,48 b	22 b
Inoc	35,00 a	240,50 a	9	102 b	1,20	0,66 b	3,26 b	21 b
NRec	0,00 b	0,00 c	0	0 c	0,22	1,30 a	5,40 a	41 a
Cont	0,00 b	7,00 c	0	1 c	0,21	0,36 b	1,99 c	7 b
CV (%)	25,07		156,28		25,07		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.

Aos 30 DAP, o número de nódulos das plantas que receberam o inoculante foi significativamente superior às que foram tratadas com o preparado de nódulos. Já a massa seca de nódulos (MSN) proveniente da inoculação com o preparado de nódulos foi 30% superior à dos nódulos das plantas que receberam o inoculante. A massa média do nódulo individual (MSN/ NN) foi de 0,77 mg para o tratamento com preparado de nódulos e de 0,42 mg para o inoculante rizobiano, indicando um aumento médio de 77% para os nódulos das plantas inoculadas com o preparado de nódulo. Brandelero, Peixoto e Ralisch (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 eram correlacionados à nodulação. Entretanto, existem relatos na literatura que negam a existência de uma correlação linear entre os componentes da nodulação e a fixação de nitrogênio atmosférico (HANSEN *et al.*, 1993).

Embora não tenham sido constatadas diferenças significativas aos 30 dias após o plantio, entre os tratamentos que receberam o inoculante rizobiano ou o preparado de nódulos com as plantas controle não inoculadas, os valores de biomassa foram cerca de 80% superiores aos das plantas controle. Já a biomassa do tratamento nitrogenado foi significativamente superior à dos demais.

Os tratamentos inoculados com o preparado de nódulos e o inoculante rizobiano promoveram um aumento significativo em torno de 70% no teor de N na parte aérea em relação ao controle. Para essa variável, não houve diferença significativa entre os tratamentos inoculados (PrepNod e Inoc), indicando que a aplicação do preparado de nódulos pode substituir o inoculante comercial considerando a contribuição da fixação biológica de nitrogênio. Ressalta-se ainda que aos 30 DAP as plantas inoculadas com o preparado de nódulos ou com o inoculante rizobiano apresentavam visualmente um verde mais intenso em relação às plantas controle, revelando a interferência positiva da inoculação no conteúdo de N foliar.

Aos 30 DAP as plantas inoculadas com o preparado de nódulos mostraram superioridade estatística em relação aos demais tratamentos na razão parte aérea/raiz (Tabela 2), proporcionando aumentos de 40%, 45% e 60%, respectivamente, em relação aos tratamentos inoculante rizobiano, N recomendado e controle. A maior eficiência da área radicular pode estar associada à promoção do crescimento vegetal por rizobactérias. Bactérias endofíticas não rizobianas têm sido encontradas em nódulos do feijoeiro, tais como as do gênero *Bacillus* (KORIR *et al.*, 2017) e podem estar associadas a maior eficiência da área radicular indicada pelo incremento no índice parte aérea/raiz, observado após a aplicação do preparado de nódulos. As bactérias que induzem a formação de nódulos em leguminosas também apresentam mecanismos de promoção de crescimento vegetal por meio de mecanismos diretos que incluem a fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização de fosfato e produção de fitohormônios e ACC deaminase, além de mecanismos indiretos que incluem a produção de sideróforos (VELAZQUEZ *et al.*, 2019).

Tabela 2. Efeito dos tratamentos 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: PrepNod (preparado 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	
	15 ns	(CV= 17,05%)
PreNod	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.

3.2 Avaliação da inoculação de sementes de feijoeiro com preparado 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 preparado de nódulos ou o inoculante apresentavam maior média de número de nódulos (NN), diferindo-se significativamente dos demais tratamentos (Tabela 3); essa tendência continuou sendo observada aos 35 DAP, porém, as plantas inoculadas com preparado de nódulos apresentaram resultados significativamente superior em 64% ao inoculante rizobiano. Esse padrão se repetiu para a variável massa seca de nódulos (MSN), todavia, não houve diferenças significativas. Os resultados obtidos para a nodulação nos tratamentos que receberam o preparado de nódulos e o inoculante rizobiano concordam com as descrições realizadas por Vargas *et al.* (1991) e Straliotto (2002), destacando que valores superiores a 20 nódulos por planta indicam boa nodulação.

Tabela 3. Efeito da inoculação com preparado 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: PrepNod (preparado 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)	7 ^{ns}	14 ^{ns}	21 ^{ns}	28	35
----- MSPA g planta ⁻¹ (CV=16,75%) -----					
PrepNod	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
----- NN planta ⁻¹ (CV=67%) -----					
PrepNod	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 ⁻¹ (CV=77,16%) -----					
PrepNod.	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 que recebeu o preparado de nódulos apresentou superioridade significativa em relação ao tratamento que recebeu inoculante rizobiano, ao qual não diferiu significativamente do controle, mostrando influência do preparado de nódulos sobre essa variável; no entanto, aos 35 DAP essa diferença não foi mais observada. 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) observou-se aos 35 DAP que a inoculação com o preparado de nódulos foi superior aos demais tratamentos (Tabela 4), sugerindo que os microrganismos contidos no preparado de nódulos foram eficientes no acúmulo de N na parte aérea das plantas, porém, só foi constatado diferença significativa com o controle não inoculado.

Tabela 4. Efeito da inoculação com preparado de nódulos sobre o teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio total acumulado por planta (mg planta⁻¹), na parte aérea das plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) aos 21, 28 e 35 DAP. Tratamentos: PrepNod (preparado 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
PrepNod	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.

Os resultados sugerem que a inoculação com o preparado de nódulos pode ser superior à inoculação com as estirpes comerciais nas condições do experimento. É possível que o preparado à base de nódulos esteja enriquecendo as comunidades microbianas dos nódulos com bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). Um estudo realizado com 30 espécies leguminosas revelou que o principal grupo bacteriano residente nos nódulos pertencia às espécies de rizobios tradicionais, contudo, cerca de 15% dos isolados foram caracterizados como espécies endofíticas não rizobianas (ENR) e os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* foram os mais abundantes (DE MEYER *et al.*, 2015). Não há consenso se as espécies ENR presentes nos nódulos apresentam alguma funcionalidade, mas é certo que as espécies rizobianas não são as únicas nos nódulos das leguminosas. É cada vez mais comum relatos para diferentes culturas onde são descritos os benefícios advindos da co-inoculação da estirpe rizobiana com espécies BPCVs. No feijão-comum, a co-inoculação com *Azospirillum brasilense* é capaz de promover aumentos de produtividade superiores à inoculação apenas com a estirpe rizobiana (HUNGRIA *et al.*, 2013). Incremento na produção de grãos em feijão-comum também foi observado após inoculação com a estirpe rizobiana e uma mistura de micorriza arbuscular, *Azospirillum* sp. e *Bacillus circulans* (MASSOUD; MORSY; EL-BATANONY, 2009). A co-inoculação com *Glomus intraradices* promoveu a maior eficiência no aproveitamento do fósforo quando este mineral se apresentava em baixas concentrações no solo (TAJINI; TRABELSI; DREVON, 2011). Estirpes de *Pseudomonas* sp. ou *P. fluorescens*, de *Bacillus* sp. ou de *Paenibacillus polymyxa* ou *B. megaterium* também apresentaram bons resultados para o feijão-comum quando co-inoculadas a estirpe rizobiana (YADEGARI; ASADI RAHMANI, 2010; STAJKOVIĆ *et al.*, 2011; KORIR *et al.*, 2017). A co-inoculação da estirpe rizobiana com uma estirpe do gênero *Bradyrhizobium* mostrou resultados promissores no sentido de melhorar a interação simbiótica entre *R. tropici* e o feijão-comum (JESUS *et al.*, 2018). A co-inoculação com uma estirpe de *Burkholderia fungorum* mostrou incremento em relação à inoculação com a estirpe de *Rhizobium* (LONGATTI; MARRA; MOREIRA, 2013). O desempenho da co-inoculação indica que a associação de estirpes de PGPR com a estirpe fixadora do nitrogênio atmosférico pode trazer vantagens para o inoculante.

3.3 Quantificação e isolamento de bactérias totais no preparado de nódulos II cultiváveis *in vitro*

A seleção dos seis meios de cultura para o isolamento de bactérias totais do preparado 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 3). 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 preparado 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, preparado 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 sugerir a importância dessa característica no desempenho do preparado 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, preparado de levedura e ácidos orgânicos, sendo rico em nutrientes, vitaminas e 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, preparado de levedura e cloreto de sódio, sendo apropriado para o cultivo de diversos microrganismos, em especial bactérias (DÖBEREINER *et al.*, 1999).

O meio KB contém peptona (proteína que surge da 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, se comparado aos demais meios utilizados.

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

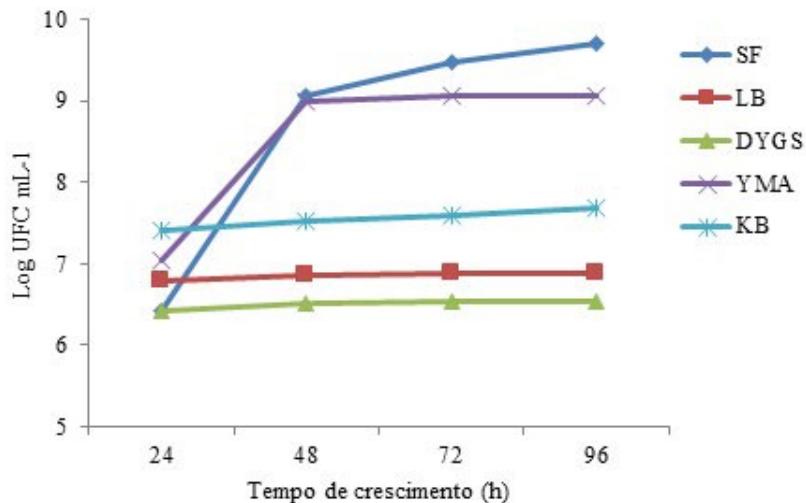


Figura 3. Número total de colônias microbianas obtidas a partir do preparado de nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em diferentes meios de cultivo até 96 horas de crescimento.

O filograma construído com as sequências dos isolados obtidos a partir do preparado de nódulos e de estirpes tipo é apresentado na Figura 4. Observa-se um agrupamento em quatro *phyla*: *Actinobacteria* (2%); *Bacteroidetes* (15%); *Firmicutes* (8,5%); e *Proteobacteria* (74,5%), incluindo *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gamaproteobacteria*.

O filo *Proteobacteria* apresentou a maior parte das bactérias encontradas. Esse filo é composto por bactérias Gram-negativas, que apresentam grande diversidade de morfologia celular e fisiológica. Possuem várias estratégias para obtenção de energia, incluindo metabolismos quimiolitorrótico, quimiorganorrótico e fotorrótico, além de outras vias metabólicas que são adaptadas a diversos nichos (CANHOS; VAZOLLER, 1997). Alguns isolados classificados nesse filo encontram-se agrupados aos 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 preparado de nódulos II, não induziu sintomas característicos nas plantas inoculadas em garrafas “longneck” (dados não mostrados). O gênero *Pseudomonas* possui espécies capazes de atuar como promotoras de crescimento em plantas. Burr, Schorth e Suslow (1978) já demonstravam aumentos significativos na produção de batatas que recebiam inóculos de *Pseudomonas fluorescens* 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; AKAMATSU; HARAKAVA, 2008). Além disso, alguns isolados de *Stenotrophomonas nitritireducens* têm demonstrado a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (FINKMANN *et al.*, 2000).

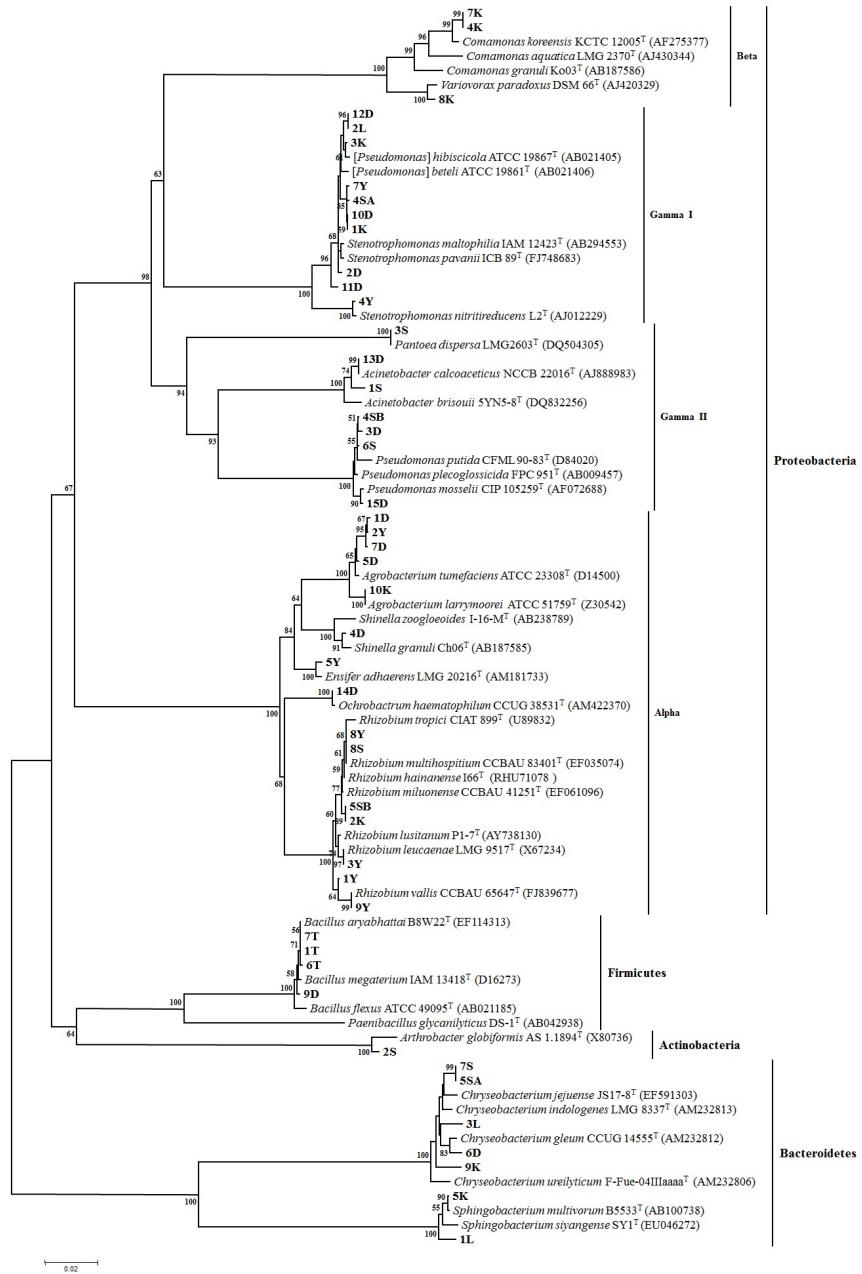


Figura 4. Árvore filogenética de sequências do gene 16S RNAr (1164 nucleotídeos) de isolados, obtidos de preparado de nódulos de feijoeiro e estirpes relacionadas. A árvore foi construída utilizando-se o método Neighbor-Joining e modelo Kimura-2 com *bootstrap* de 1000 replicatas.

O filo *Bacteroidetes* 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 filogeneticamente distintos, discriminados de acordo com os teores dessas bases nitrogenadas no DNA (VAL-MORAES *et al.*, 2009)

Entre os isolados classificados como pertencentes ao filo *Firmicutes*, observa-se que alguns se encontram agrupados com 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, relatam que *Bacillus* spp. co-inoculado 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 fixadoras de N e as promotoras de crescimento no preparado de nódulos.

O filo *Actinobacteria* é composto por bactérias com alto teor de guanina e citosina, compreendendo o grupo dos organismos da ordem Actinomycetales e gêneros relacionados (STACKEBRANDT; RAINY; WARD-RAINY, 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 preparado de nódulos II, a predominância foi de bactérias

do gênero *Stenotrophomonas* com 17%, seguidas de *Rhizobium* (15%), *Pseudomonas* (13%), *Agrobacterium* (11%), *Cryseobacterium* (11%) e *Bacillus* (9%), além de outras com menor expressão (Figura 5). Essa diversidade sugere que o preparado 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.

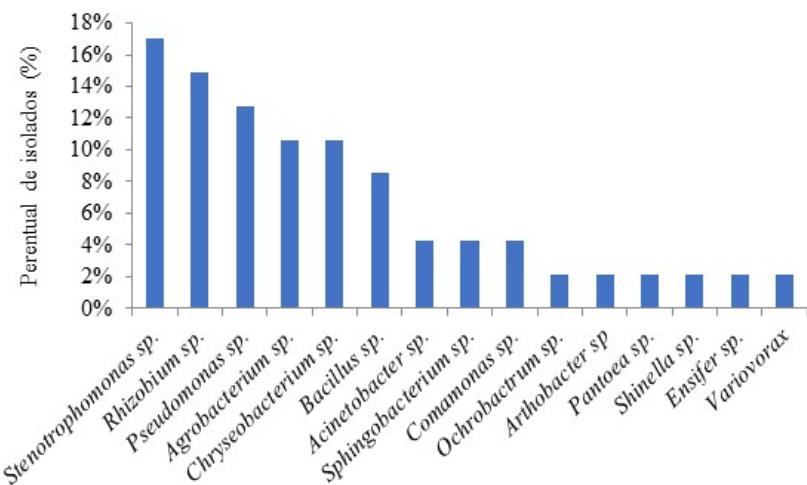


Figura 5. Percentagem (%) dos grupos de bactérias obtidos no preparado de nódulos, após o sequenciamento do gene 16S RNAr

4 Conclusões

- O preparado de nódulos demonstra eficiência similar ao inoculante rizobiano comercial na promoção de crescimento do feijoeiro.
- A caracterização da comunidade bacteriana dos nódulos revela expressiva diversidade de gêneros, entre eles *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium* e *Sphingobacterium*.

5 Referências Bibliográficas

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.

ANPII – Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes. **Estatística**. 2018. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 17 jul. 2020.

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.

BURR, T. J.; SCHORTH, M. N.; SUSLOW, T. V. Increased potato yields by treatment of seed pieces 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.

COBRA NETTO, A.; ACCORSI, W. R.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a nutrição mineral do feijão (*Phaseolus vulgaris* L., var. Roxinho). **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 28, p. 257-274, 1971.

DE MEYER, S. E.; DE BEUF, K.; VEKEMAN, B.; WILLEMS, A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p. 1-11, 2015.

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.; BUZZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 507-512, 2000.

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. 145 p.

HAAG, H. P.; MALAVOLTA, E.; GARGANTINI, H.; GARCIA BLANCO, H. Absorção de nutrientes pela cultura do feijão. **Bragantia**, v. 26, p. 381-391, 1967.

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.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.

HILDEBRAND, C. **Manual de métodos de análise químicas de solo e plantas**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, p. 225, 1976.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013.

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, p. 88-93, 2003.

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, p. 1515-1528, 2000.

INIAP – Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. **Métodos 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).

JESUS, E. C.; LEITE, R. A.; BASTOS, R. A.; ARAGÃO, O. O. S.; ARAÚJO, A. P. Co-inoculation of Bradyrhizobium stimulates the symbiosis efficiency of Rhizobium with common bean. **Plant and Soil**, v. 425, p. 201-215, 2018.

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

KORIR, H.; MUNGAI, N. W.; THUITA, M.; HAMBA, Y.; MASSO, C. Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Common Bean Growth in a Low Phosphorus Soil. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 141, 2017.

LONGATTI, S. M. O.; MARRA, L. M.; MOREIRA, F. M. S. Evaluation of plant growth-promoting traits of Burkholderia and Rhizobium strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 948-959, 2013.

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, p. 417-426, 1991.

MASSOUD, O. N.; MORSY, E. M.; EL-BATANONY, N. H. Field response of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to N₂-fixers *Bacillus circulans* and arbuscular mycorrhizal fungi inoculation through accelerating rock phosphate and feldspar weathering. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, p. 844-852, 2009.

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.

NASCENTE, A. S.; CARVALHO, M. C. S.; MELO, L. C.; ROSA, P. H. Nitrogen management effects on soil mineral nitrogen, plant nutrition and yield of super early of super cycle common bean genotypes. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 26, p. 369-378, 2017.

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.

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

STAJKOVIĆ, O.; DELIĆ, D.; JOŠIĆ, D.; KUZMANOVIĆ, Đ.; RASULIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. Improvement of common bean growth by coinoculation with Rhizobium and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnologica Letters**, v. 16, p. 5919-5926, 2011.

STRALIOTTO, R. **A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro**. Brasília: Embrapa, 2002.

TAJINI, F.; TRABELSI, M.; DREVON, J. J. Co-inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases P use efficiency for N2 fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency in hydroaeroponic culture. **Symbiosis**, v. 53, p. 123-129, 2011.

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.

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.

VELÁZQUEZ, E.; CARRO, L.; FLORES-FÉLIX, J. D.; MENÉNDEZ, E.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; PEIX, A. Bacteria-inducing legume nodules involved in the improvement of plant growth, health and nutrition. In: KUMAR, V., PRASAD, R., KUMAR, M., CHOUDHARY, D. (ed.). **Microbiome in plant health and disease**. Springer: Singapore, 2019, p. 79-104.

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, p. 20, 2007.

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, p. 52, 2012.

YADEGARI, M.; ASADI RAHMANI, H. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, p. 792-799, 2010.