

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS - GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Caracterização e Seleção de Rizóbios
de Mucuna**

Andréa Aparecida de Lima

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS
DE MUCUNA**

ANDRÉA APARECIDA DE LIMA

Sob a Orientação do Pesquisador
Gustavo Ribeiro Xavier

e Co-orientação da Pesquisadora
Norma Gouvêa Rumjanek

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Março de 2009

631.874

L732c

T

Lima, Andréa Aparecida de, 1980-
Caracterização e seleção de Rizóbios
de Mucuna / Andréa Aparecida de Lima - 2009.
92f. : il.

Orientador: Gustavo Ribeiro Xavier.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de
Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 57-69.

1. Adubação verde - Teses. 2. Nitrogênio
- Fixação - Teses. 3. Simbiose - Teses. 3.
Ecologia agrícola - Teses. I. Xavier,
Gustavo Ribeiro. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-
Graduação em Agronomia. 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 AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

ANDRÉA APARECIDA DE LIMA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 06/03/2009

Gustavo Ribeiro Xavier. Dr. Embrapa Agrobiologia
Orientador

Eduardo Lima. Dr. UFRRJ

Carolina Ettiene de Rosália e Silva Santos. Dra. UFRPE

DEDICATÓRIA

Dedico à minha filha Alice, razão do meu viver, à minha mãe Alair que sempre me apoiou e me deu amor, ao meu pai Lauro “*in memoriam*” pelo exemplo e ao meu marido Diogo pela compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar pela existência e pelo imenso amor que tens por nós.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Ao CPGA-CS pelo apoio.

À Embrapa Agrobiologia pela estrutura no andamento dos trabalhos.

Ao meu orientador Dr. Gustavo R. Xavier e minha Co-orientadora Dra. Norma G. Rumjanek pelo incentivo e persistência nos trabalhos.

À minha filha Alice pelo amor e carinho mesmo com a minha ausência.

À minha mãe Alair por todo o afeto e confiança dedicados a minha pessoa e pelo exemplo de mulher e mãe e ao meu pai Lauro “in memoriam” pelo carinho.

À minha família, meus irmãos e sobrinhos pelo amor e entendimento. Especial agradecimento ao meu irmão Edson que foi meu espelho pra chegar até aqui.

À minha sogra Girseli, sogro Ubirajara e cunhada Danielle pela ajuda e pelo amor dedicado á minha filha em todos estes anos.

Ao meu marido Diogo pelo companheirismo e compreensão nos momentos mais difíceis.

Às antigas e atuais moradoras do F4-203 e agregadas pela sincera amizade, afeto e cumplicidade.

Aos meus irmãos de Rural, Hugo Oliveira, Alex Machado da Soler e Wallace Luís de Lima, obrigada atenção e amizade.

Às minhas amigas, Fernanda Delgado, Alessandra Dalla Costa, Anita Bueno, Míriam Bianchi e Renata Silva obrigada pelo carinho.

Aos funcionários e estagiários da Embrapa Agrobiologia da casa vegetação Rômulo Hernani, Naldo, Marildo, Serginho e em especial Claudinho que foi sem sombra de dúvidas meu “anjo” em todo o mestrado.

Aos meus amigos João Luiz (essencial no decorrer de todos os experimentos), Paulo Ivan, Samuel e Rosa “minha mãezinha” pela ajuda e amizade.

À Rosana Muzi, pessoa especial e secretária do laboratório de Ecologia microbiana, obrigada por sua eficiência, educação e simpatia. E aos demais componentes do lab. de Ecologia Microbiana.

Às meninas da equipe de adubo verde: Sumaya, Fernanda e Carol pela ajuda nos trabalhos.

A Monalisa e ao pesquisador Bruno pela atenção às análises de nitrogênio.

À Geraldo Baêta pela amizade e profissionalismo.

Ao pessoal da secretaria do Curso de Pós-graduação: Roberto, Marquinhos e Luciene.

Ao pessoal do alojamento da Embrapa.

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional o meu muito obrigada.

BIOGRAFIA

Andréa Aparecida de Lima nasceu na cidade de Irani - SC em 03 de março de 1980. Iniciou o curso de graduação em Ciências Agrícolas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2001, transferindo-se para o curso de Engenharia Agrônômica em 2003, diplomando-se em 2006. Durante a graduação foi Estagiária no Departamento de Solos, área de Biologia dos Solos sob orientação do Dr. Ricardo Luís Louro Berbara e sob a mesma orientação foi bolsista de Iniciação Científica pela Fundação Mokiti Okada. Estagiou no laboratório de Micorrizas na Embrapa Agrobiologia sob a orientação do Dr. Orivaldo Saggin júnior. Em março de 2007 ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo (UFRRJ), sob orientação do Dr. Pesquisador Gustavo Ribeiro Xavier do laboratório de Ecologia microbiana da Embrapa Agrobiologia, obtendo o grau de Mestre em Ciência, em 2009.

RESUMO

LIMA, Andréa Aparecida de. **Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna**. 2009. 92f Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e selecionar rizóbios de mucuna para serem usados como inoculantes. Um primeiro experimento foi montado nas dependências da Embrapa Agrobiologia em vasos com amostras de oito solos coletados no SIPA (Sistema Integrado de Produção Agroecológica) para obter nódulos de mucuna para posterior isolamento e caracterização. O delineamento foi inteiramente casualizado com duas repetições. Com nódulos coletados, procedeu-se então o isolamento e caracterização morfológica dos adubos verdes, dando origem a um dendrograma de similaridade. Representantes desses grupos foram caracterizados por ARDRA, utilizando três enzimas de restrição (*Msp I*, *Hinf I* e *Dde*). Com os isolados obtidos dos nódulos procedeu-se o teste de nodulação para a pré-seleção de isolados mais promissores, sendo avaliado: número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca da parte aérea. No teste de eficiência com as cinco estirpes mais promissoras foi avaliada a massa seca de nódulos, massa fresca e seca da parte aérea, massa seca de raiz e Ntotal da parte aérea. O teste foi realizado em casa de vegetação, o delineamento foi em blocos ao acaso com quatro repetições e duas coletas. O tempo de crescimento e alteração de pH foram determinantes para a formação dos grupos morfológicos de isolados de mucuna. Em geral, os isolados de rizóbio apresentaram resultados similares à testemunha nitrogenada e à estirpe recomendada. Observou-se ampla diversidade de rizóbios de mucuna nas caracterizações fenotípicas e genotípicas realizadas, podendo indicar a existência de novas espécies de rizóbios.

Palavras-chave: Adubação verde. Fixação biológica de nitrogênio. Simbiose.

ABSTRACT

LIMA, Andréa Aparecida de. **Characterization and selection of rhizobia from Mucuna**. 2009. 92p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The objective of this study was to characterize and to select rhizobia from mucuna to be used as inoculants. A first trial was set in the dependencies of Embrapa Agrobiologia, in pots with samples from eight soils collected in SIPA (System of Integrated Agroecological Production) for nodules of mucuna for subsequent isolation and characterization. The design was completely randomized with two replications. With the nodules collected, the isolation and morphological characterization of green manure was made, resulting in a dendrogram of similarity. Representatives of these groups were characterized by ARDRA, using three restriction enzymes (Msp I, I and HinfI DDE). With isolates obtained from nodules it was carried up the nodulation test for pre-selection of most promising isolates, and evaluated: number of nodules, dry weight of nodules and dry weight of shoot. In the five most promising strains from the efficiency test, it was assessed: nodules dry weight, fresh and dry weight of shoot, dry mass of root and shoot, and total N content. The test was conducted in a greenhouse, the design of randomized blocks with four replications and two samplings. The time of growth and change of pH were determinants of the formation of morphological groups from mucuna isolates. In general, the rhizobia strains showed similar results to the control strain and the control for nitrogen. There was wide diversity of rhizobia from mucuna in the performed genotypic and phenotypic characterizations, which may indicate existence of new rhizobia species.

Keywords: Green manure. Biological nitrogen fixation. Symbiosis.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem aérea da área do SIPA e em detalhe os locais de implantação dos experimentos. Foto cedida por Ricardo Eiras Moreria da Rocha. (Escala 1:2.000). 16
- Figura 2.** Nodulação de mucuna anã, cinza e preta em solos coletados no SIPA, Sendo 1, 2 e 3: Planossolo; 4, 7 e 8: Argissolo Amarelo; 5 e 6: Argissolo Vermelho-Amarelo. 22
- Figura 3.** Massa seca da parte aérea de mucuna anã, cinza e preta em solos coletados no SIPA. Sendo: Solos 1, 2 e 3: Planossolo; 4, 7 e 8: Argissolo Amarelo e; 5 e 6: Argissolo Vermelho-Amarelo. 23
- Figura 4.** Percentagem de nodulação de Mucuna preta, M. cinza e M. anã, usadas como adubos verdes em diferentes classes de solos. 23
- Figura 5.** Percentagem de massa seca da parte aérea (MSPA) de Mucuna preta, M. cinza e M. anã, usadas como adubos verdes em diferentes classes de solos. 24
- Figura 6.** Dendrograma de similaridade com base em características morfológicas de isolados de bactérias que nodulam mucuna anã de solos oriundos do SIPA, pelo coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA. 25
- Figura 7.** Dendrograma de similaridade com base em características morfológicas de isolados de bactérias que nodulam mucuna cinza de solos oriundos do SIPA, pelo coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA. 28
- Figura 8.** Dendrograma de similaridade com base em características morfológicas de isolados de bactérias que nodulam mucuna preta de solos oriundos do SIPA, pelo coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA 30
- Figura 9.** Número de isolados de mucuna anã, distribuídos em classes em função de diferença estatística na variável número de nódulos em teste de Scott-knott a nível de significância de 0,05. A sequência de gráficos refere-se a primeira, segunda e terceira etapas dos experimentos de nodulação com mucuna anã. Os números dentro dos colchetes { } referem-se ao número de nódulos. 33
- Figura 10.** Número de nódulos em 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna anã. A sequência de gráficos refere-se a primeira, segunda e terceira etapas dos experimentos de nodulação com mucuna anã. 34
- Figura 11.** Matéria seca da parte aérea de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna anã em casa de vegetação. A sequência de gráficos refere-se a primeira, segunda e terceira etapas dos experimentos de nodulação com mucuna anã. 35
- Figura 12.** Matéria seca da parte aérea de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna anã em casa de vegetação. A sequência de gráficos refere-se a primeira, segunda e terceira etapas dos experimentos de nodulação com mucuna anã. 36
- Figura 13.** Número de isolados de mucuna cinza, distribuídos em classes em função de diferença estatística em teste de Scott-knott a nível de significância de 0,05. 38
- Figura 14.** Número de nódulos em 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna cinza. 38
- Figura 15.** Matéria seca da parte aérea de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna cinza em casa de vegetação. 39

Figura 16. Matéria seca de nódulos de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna cinza em casa de vegetação.	39
Figura 17. Número de isolados de mucuna preta distribuídos em classes em função de diferença estatística em teste de Scott-knott em nível de significância de 0,05.....	40
Figura 18. Número de nódulos em 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna preta em casa de vegetação.	41
Figura 19. Matéria seca da parte aérea de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna preta em casa de vegetação.....	41
Figura 20. Matéria seca de nódulos de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna anã em casa de vegetação.	42
Figura 21. Dendrograma de similaridade genética de bactérias isoladas de mucuna anã e clivadas com as enzimas de restrição <i>Msp I</i> , <i>Hinf I</i> e <i>Dde I</i>	49
Figura 22. Dendrograma de similaridade genética de bactérias isoladas de mucuna cinza e clicadas com as enzimas de restrição <i>Msp I</i> , <i>Hinf I</i> e <i>Dde I</i>	51
Figura 23. Dendrograma de similaridade genética de bactérias isoladas de mucuna preta e clicadas com as enzimas de restrição <i>Msp I</i> , <i>Hinf I</i> e <i>Dde I</i>	53
Figura 24. Dendrograma de similaridade genética de bactérias isoladas de mucuna preta, cinza e anã, clivadas com as enzimas de restrição <i>Msp I</i> , <i>Hinf I</i> e <i>Dde</i>	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Gêneros e espécies de rizóbios e seus hospedeiros (Adaptado de ZILLI, 2001; MOREIRA 2008) (Continua).....	5
Tabela 2. Produção de Massa seca (MS) e N fixado em diferentes espécies de mucuna.....	7
Tabela 3. Inoculantes recomendados para adubos verdes no Brasil.....	11
Tabela 4. Histórico de utilização das oito áreas de coleta de solo do SIPA de três anos consecutivos (DIAS, 2007).	14
Tabela 5. Classes de solo do SIPA, sua localização e seu respectivo uso.	15
Tabela 6. Características químicas dos oito solos utilizados neste estudo.	17
Tabela 7. Parâmetros de separação dos grupos no dendrograma de Mucuna anã.	26
Tabela 8. Parâmetros de separação dos grupos no dendrograma de mucuna cinza.	29
Tabela 9. Parâmetros de separação dos grupos no dendrograma de Mucuna preta.	31
Tabela 10. Diversidade, abundância e riqueza de rizóbios em solos do Sistema Integrado de Produção Agroecológica.	32
Tabela 11. Média das variáveis avaliadas (número de nódulos, matéria seca de nódulos e matéria seca da parte aérea) em teste de nodulação dos cinco isolados pré-selecionados para teste de eficiência.	37
Tabela 12. Características das bactérias que apresentaram as melhores médias de MSN e MSPA em teste de nodulação em mucuna anã.	37
Tabela 13. Média das variáveis avaliadas (número de nódulos, matéria seca de nódulos e matéria seca da parte aérea) em teste de nodulação dos cinco isolados pré-selecionados para teste de eficiência.	40
Tabela 14. Características culturais e de solo das bactérias que apresentaram as melhores médias de MSN e MSPA em teste de nodulação em mucuna cinza.	40
Tabela 15. Média das variáveis avaliadas (número de nódulos, matéria seca de nódulos e matéria seca da parte aérea) em teste de nodulação de cinco isolados de mucuna preta pré-selecionados para teste de eficiência.	42
Tabela 16. Características culturais e de solo das bactérias que apresentaram as melhores médias de massa seca de nódulos (MSN) e massa seca da massa seca da parte aérea (MSPA) em teste de nodulação em mucuna preta.	42
Tabela 17. Variáveis analisadas em teste de eficiência em casa de vegetação com cinco isolados de mucuna anã pré-selecionados e três testemunhas em duas épocas.	44
Tabela 18. Variáveis analisadas em teste de eficiência em casa de vegetação com cinco isolados de mucuna cinza pré-selecionados e três testemunhas em duas épocas.....	45
Tabela 19. Variáveis analisadas em teste de eficiência em casa de vegetação com cinco isolados de mucuna preta pré-selecionados e três testemunhas em duas épocas.	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Crise Energética	2
2.2 Contribuição da Adubação Verde na agricultura	3
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio	4
2.4 Interação entre Rizóbio e Adubo Verde	6
2.5 Sobrevivência e Especificidade de Rizóbios	8
2.6 Inoculantes	9
2.7 Caracterização e Seleção de Rizóbios	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Área Experimental.....	14
3.2. Plantio de adubos verdes e coleta de nódulos	17
3.3. Isolamento e Caracterização de Bactérias	17
3.4. Teste de Nodulação	18
3.4.1. Mucuna anã.....	19
3.4.2. Mucuna cinza	19
3.4.3. Mucuna preta	19
3.5. Testes de eficiência de estirpes em condição controlada	20
3.5.1. Mucuna anã, cinza e preta	20
3.6. Caracterização Genotípica de bactérias.....	20
3.6.1. Extração de DNA.....	20
3.6.2. Reação de PCR	21
3.6.3. Análise de restrição.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Nódulos das espécies de mucuna plantados em vasos	22
4.2. Caracterização Fenotípica	24
4.2.1. Caracterização fenotípica de mucuna anã.....	24
4.2.2. Caracterização fenotípica em mucuna cinza.....	27
4.2.3. Caracterização fenotípica em mucuna preta	29

4.3. Diversidade Morfológica de i solados de Rizóbio	31
4.4. Teste de nodulação	32
4.4.1. Teste de nodulação em mucuna anã.	32
4.4.2. Teste de nodulação em mucuna cinza	38
4.4.3. Teste de nodulação em mucuna preta	40
4.5 . Teste de eficiência em casa de vegetação	43
4.6. Caracterização Genotípica	48
4.6.1. Caracterização genotípica por ARDRA em mucuna anã.....	48
4.6.2. Caracterização genotípica por ARDRA em mucuna Cinza.....	50
4.6.3. Caracterização genotípica por ARDRA em mucuna preta	52
4.7. Avaliação do agrupamento dos isolados das três espécies de mucuna através do perfil de restrição	54
5. CONCLUSÕES	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO I	70
ANEXO II.....	73
ANEXO III.....	76

1. INTRODUÇÃO

Com a crise mundial do petróleo e a preocupação ambiental, é cada vez mais evidente a necessidade de tecnologias alternativas mais sustentáveis para os sistemas de produção agrícolas. Além do alto custo energético e financeiro para a obtenção de insumos sintéticos, seu uso na agricultura pode ter efeitos negativos ao ambiente devido às lixiviações acarretando em poluição dos lençóis freáticos. Na agricultura atual a busca por formas alternativas de suprimento de nutrientes às plantas é constante e necessária. Alguns nutrientes são mais comumente limitantes ao crescimento vegetal, como no caso do nitrogênio (N) que tem alta mobilidade no solo sendo facilmente perdido por processos naturais e/ou antropogênicos.

O uso de espécies de leguminosas tem sido muito difundido e tem sido responsável também pela maximização da fixação biológica de nitrogênio (FBN) nos sistemas agrícolas. A prática da adubação verde para suprir nitrogênio ao sistema vem crescendo nos últimos anos, sendo uma forma racional e benéfica para o ambiente, fornecendo grande parte do N exigido pela cultura principal e de importância econômica, além do aporte de matéria orgânica. A mucuna apresenta elevada taxa de FBN, tolerância às altas temperaturas, à seca, à sombra, ligeiramente resistente ao encharcamento além de serem supressores de nematóides.

A FBN é resultado da associação simbiótica entre a planta e bactérias diazotróficas, responsáveis pela redução do N_2 à NH_3^+ forma essa assimilada pelas plantas. Além dos fatores intrínsecos da simbiose esse processo de FBN é influenciado pelas características edafo-climáticas, refletindo nas diferentes respostas em relação a sobrevivência, competitividade, faixa hospedeira, especificidade e eficiência simbiótica das estirpes usadas na prática de inoculação de sementes (BRATTI et al., 2005).

O sucesso para otimizar a FBN depende da seleção e especificidade simbiótica na interação rizóbio e planta. As estirpes usadas como inoculante para mucuna foram selecionadas há vários anos e também recomendadas para outras culturas. A seleção contínua de rizóbios específicos para essas culturas pode aumentar a eficiência agrônômica da FBN, aumentar a biomassa vegetal e o teor de N-total na planta.

Para isso é necessário o cumprimento de várias etapas que engloba desde o estudo morfológico, genético e de eficiência das bactérias fixadoras de nitrogênio como também fatores ambientais, de adaptação e especificidade de espécies.

O objetivo do trabalho foi caracterizar e selecionar rizóbios eficientes que foram isolados de nódulos de mucuna oriundos do SIPA (Sistema Integrado de Produção Agroecológica) no município de Seropédica – RJ.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Crise Energética

Os combustíveis fósseis (petróleo, gás natural e carvão) contribuem com cerca de 80% do total da oferta mundial de energia. Previsões para os próximos anos mostram consumo de petróleo ainda crescente, de 85 milhões de barris por dia em 2006 para 118 em 2030 (HESTER, 2006; EIA-DOE, 2007), com pico para a produção mundial de petróleo estimada entre 2010 e 2020 (KERR, 1998). A depender das taxas de produção e de consumo, as reservas atualmente conhecidas de combustíveis fósseis podem atender um período de cerca de 41 a 700 anos (GOLDEMBERG E JOHANSSON, 2004; GOLDEMBERG, 2007).

A combinação da insaciável demanda energética mundial com a expectativa de declínio da produção tem implicações óbvias para a segurança. Dentre os 10 maiores países consumidores do mundo, sete deles apresentam déficit na produção. Ao longo dos últimos anos, os preços do barril de petróleo oscilaram de US\$ 25 dólares (janeiro/2000) para mais de US\$ 140 (junho/2008). Atualmente (janeiro/2009) está abaixo dos US\$ 40 (EIA-DOE, 2009).

A finitude dos combustíveis fósseis, a instabilidade nos preços e na política nas regiões mais ricas em petróleo, associada às preocupações para a segurança energética, e mais recentemente a necessidade de responder às alterações climáticas, levaram ao crescente interesse mundial em fontes de energia renováveis (KOH & GHAZOUL, 2008).

Em especial para o Brasil, é verdade que as recentes descobertas brasileiras, na área do pré-sal, podem contribuir para minimizar esse impacto político-econômico, mas a falta de tecnologia para a extração em águas ultraprofundas e, também os custos de produção podem retardar o processo de extração, refino e transporte do óleo, exigindo cada vez mais incentivo para opções renováveis de energia em consonância com a preservação do meio ambiente.

Por outro lado, o Brasil foi pioneiro na produção de biocombustíveis em larga escala, impulsionado pela crise do petróleo dos anos 1970. Diante das altas nos preços do petróleo e baixa do açúcar, o governo militar introduziu etanol à gasolina e ofereceu subsídios para a produção de cana-de-açúcar a fim de produzir bioetanol.

Hoje, transcorridos quase 40 anos, uma nova concepção se instala no Brasil para a cultura dos biocombustíveis. Reduzir a dependência energética a partir de fontes não renováveis e muitas das vezes com disponibilidade limitada, poderá garantir maior competitividade ao produto nacional, sobretudo se tiver associada à redução de custos de produção (KOVALESKI & SOLA, 2004).

Se por um lado, conter a dependência perpassa pela utilização de biocombustível, por outro, uma outra possibilidade é a redução ou eliminação dos adubos nitrogenados nas culturas, cuja síntese requer condições de alta temperatura e pressão obtidos através da combustão de energia fóssil, a partir da técnica análoga à de Haber-Bosch.

A incorporação de nitrogênio (N) via fixação aos diferentes ecossistemas do planeta é bastante elevada, representando uma economia considerável de energia fóssil. Estima-se que a contribuição do processo de fixação biológico de nitrogênio (FBN) para o total de N introduzido em sistemas agrícolas no mundo, correspondente a 65% (REIS et al, 2006).

Para o crescimento econômico de um país, aumento da oferta de trabalho e renda, é necessário o investimento em energia, principalmente renovável, minimizando os impactos ambientais (KOVALESKI & SOLA, 2004).

2.2 Contribuição da Adubação Verde na agricultura

O nitrogênio é o nutriente que mais comumente limita a produtividade agrícola em solos tropicais (URQUIAGA & ZAPATA, 2000). A utilização de resíduos orgânicos é uma das práticas mais antigas aplicadas na agricultura seja via compostagem ou da adubação verde. Na utilização de plantas de cobertura de solo enfatiza-se no uso de espécies com distintas qualidades para rotação ou consórcio com culturas principal e de interesse econômico (ESPINDOLA et al., 2005).

As leguminosas herbáceas constituem algumas das plantas mais utilizadas como adubos verdes, embora espécies de outras famílias botânicas também sejam frequentemente utilizadas. A adubação verde é uma prática agrícola que consiste no plantio de espécies vegetais, tanto de ciclo anual como perenes, em sistema de rotação ou em consórcio com culturas de interesse econômico. Esta prática é caracterizada por melhorar as condições químicas, físicas e biológicas do solo, através da redução das perdas por erosão, aumento do teor de matéria orgânica, da capacidade de troca catiônica, da reciclagem dos nutrientes (KIEHL, 1985) e pelo controle de nematóides e de plantas invasoras (MOJTAHEDI et al., 1993; STAMPFORD et al., 1994; DE-POLLI et al., 1996; BIEDERBECK et al., 1998; ALCÂNTARA et al., 2000).

O fornecimento de matéria orgânica por leguminosas utilizadas como adubos verdes propicia aumento na atividade microbiana (FILSER, 1995;) contribuindo na ciclagem de nutrientes (PANKHURST & LYNCH, 1994) elevam o aporte de nitrogênio ao solo, diminuindo e em muitos casos eliminando o uso de fertilizantes nitrogenados (CREWS & PEOPLES, 2004, GUERRA et al, 2007, SILVA et al., 2007) na manutenção da umidade do solo e redução da oscilação térmica da superfície do solo (SIDIRAS et al.,1984) além da reposição de N ao solo que fora extraído com a colheita.

A forma mais comum de utilização de plantas leguminosas como fonte de N para o solo e sua utilização sob a forma de pré-cultivo, em que o adubo verde precede as culturas principais, que se beneficia posteriormente com a mineralização do nitrogênio. No entanto, em condições tropicais úmidas, existem limitações em relação ao fornecimento de N em razão das altas temperaturas e excessiva umidade, que propiciam uma mineralização acelerada dos resíduos (SÉGUY et al., 1997) citado por Castro et al. (2004)

As condições edafoclimáticas interferem diferentemente sobre o rendimento das diferentes espécies e na escolha do adubo verde. Sendo uma das razões da diferença no comportamento das espécies quando plantadas em locais diferentes, o diferencial na produtividade entre duas espécies pode ser devido à maior capacidade de uma delas em absorver e assimilar nutrientes menos disponíveis à planta, isto para uma mesma condição de solo. Maior tolerância às doenças e pragas, estresse e sensibilidade ao fotoperíodo são também características que interferem no rendimento das espécies (RIBASKI et al., 2000).

Espíndola et al (1997) recomendou diversos parâmetros para serem usados na escolha de leguminosas para adubação verde, sendo citados como tais: tolerância à seca e a geada; elevada produção de matéria verde e seca da planta; altos níveis de Nitrogênio; ciclagem de nutrientes pouco suscetíveis à pragas e são altamente desenvolvidos em seu sistema radicular.

Espíndola (1997) comenta ainda que apesar de condições desfavoráveis como a baixa fertilidade do solo, a *Crotalaria spectabilis* adapta-se a tais condições, justificando entre outros benefícios a utilização destas leguminosas como adubo verde.

Mulongoy e Akobundu (1990) conduziram experimentos com um número de leguminosas que abrangem as culturas incluindo *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema pubescens*, *Mucuna pruriens* var. *utilis*, *Psophocarpus palustres* e *Pueraria phaseoloides* pelo potencial dessas culturas em sistema de cobertura. Rendimentos anuais de matéria seca dessas

leguminosas variaram entre 1,5 e 7,5 toneladas ha⁻¹, com doses de N de 30 a 300 kg.ha⁻¹ por ano. Observando que o verdadeiro impacto na conservação do solo e sustentabilidade foi demonstrado pela resposta no milho para efeitos residuais dos sistemas de cobertura com *P. Palustris* e *C. pubescens*.

Oliveira et al (2006) verificaram que o uso de guandu como adubo verde, em faixas intercalares, mostrou-se eficiente no controle de plantas daninhas, contribuindo para a melhoria da fertilidade do solo com a poda da faixa de guandu, aportando cerca de 6,58 t.ha⁻¹ de biomassa seca e 159 kg.ha⁻¹ de N e a ciclagem de macronutrientes como P, K Ca e Mg ocorreram nas proporções de 20, 136, 64 e 16 kg ha⁻¹ respectivamente. Mascarenhas et al (1967) observaram que com o uso de *Crotalaria juncea* como adubo verde houve incremento na produtividade de feijão de mais de 30%. Andrioli et al. (2008) observaram que a utilização de crotalaria no cultivo de milho em sistema de plantio direto, proporcionou maior produtividade de grãos e acúmulo de N em relação ao milho e lablab, em pré-safra.

Espíndola (2006) em estudos com plantas de cobertura observaram diferentes padrões de composição dos resíduos vegetais e liberação de nutrientes, podendo influenciar negativamente na disponibilidade destes para a cultura principal. Neste mesmo estudo, as leguminosas, amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*), cudzu tropical (*Pueraria phaseoloides*) e siratro (*Macroptilum atropurpureum*) apresentaram rápida liberação de N, quando comparadas ao capim-colonião (*Panicum maximum*), já que este causou imobilização do N. Chagas et al (2007) observaram que liberação de K foi mais rápida em comparação com a liberação de N pelos resíduos de feijão, sendo este similar à dinâmica de decomposição.

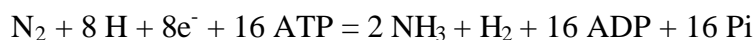
Algumas leguminosas usadas como adubo verde apresentam benefícios, como o potencial na supressão a *Meloidogyne* spp.; essas plantas inibem a presença do nematóide não deixando que ele complete seu ciclo. . Dentre elas estão a mucuna anã (*Mucuna deeringiana* Bort), mucuna preta (*Mucuna aterrima*) e *C. spectabilis* (VALLE et al., 1996; DIAS-ARIEIRA et al, 2003).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

Na agricultura sustentável, a fixação biológica de N₂ é uma importante via de entrada de nitrogênio em solos agrícolas, além da aplicação de adubos orgânicos e minerais (SHARMA et al., 2005; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Neste contexto, o cultivo de leguminosas é de grande importância devido à simbiose com bactérias diazotróficas (BABIC et al, 2008).

A fixação biológica de Nitrogênio (FBN) definida como a redução de N₂ à NH₃, pela ação da nitrogenase (Equação 1), é um dos processos mais conhecidos e importantes que ocorrem nos solos relacionados à conservação da vida e são realizados por microrganismos procariotos, promovendo a fixação biológica através da simbiose com plantas leguminosas (MOREIRA, 2008), A simbiose ocorre em detrimento da disponibilização de aminoácidos pela bactéria através da fixação do Nitrogênio e a disponibilização de carboidratos pela planta em benefício das bactérias (FREIRE, 1992)

Equação 1: Estequiometria da reação de redução de N₂ a NH₃.



A nitrogenase é a enzima responsável pela redução do N₂ que pode ser inibida por alguns fatores como: disponibilidade energética da célula, idade fisiológica, presença de

alguns aminoácidos essenciais, concentração de O₂; disponibilidade de O₂ e N em excesso, principalmente o amônio (REIS et al., 2006; GUPTA & LIPSET, 1981).

Beijerinck observou a formação de nódulos em raízes de ervilha por bactérias diazotróficas que hoje são conhecidas por rizóbios. Essas bactérias pertencem a alpha-proteobacteria, e estão distribuídas em seis gêneros: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium* (Tabela 1) e 46 espécies baseada em informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas (GARRITY & HOLT, 2001; GRAHAM et al. 1991).

Tabela 1. Gêneros e espécies de rizóbios e seus hospedeiros (Adaptado de ZILLI, 2001; MOREIRA 2008) (Continua).

Gêneros	Espécies	Hospedeiros	Autores
<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie et al., 1998 ^a
		<i>Lotus arabicus</i>	
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et al., 1988
		<i>Glycine</i> spp., <i>Vigna unguiculata</i>	Kuykendall et al., 1992
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i> spp., <i>V. unguiculata</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i>	Jordan, 1982 e 1984
	<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine</i> spp.	Xu et al., 1995
	<i>B. yuanmimngense</i>	<i>Lespedeza</i> spp.	Yao et al, 2002
	<i>B. canariense</i>	<i>Lupinus</i> spp, <i>Adenocarpus</i> spp. <i>Lupinus</i> spp	Vinuesa et al, 2005
	<i>B. spp</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	Van Berkun and earddly, 2002, van
	<i>B. Blastobacter</i>		Berkun at al, 2006
	<i>B. denitrificans</i>		
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang et al., 1999
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et al., 1994
	<i>M. huakuui</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen et al., 1991 e 1997
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.	Jarvis et al., 1982, 1997
	<i>M. mediteraneum</i>	<i>C. arietinum</i>	Nour et al., 1995
	<i>M. plurifariun</i>	<i>Acacia</i> spp., <i>Leucaena</i> spp.	De Lajudie et al., 1998b
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velásquez et al, 2001
	<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al, 2004
	<i>M. spetentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al, 2004
	<i>M. plurifalium</i>	<i>Prosopis juliflora</i> , <i>Neptunia oleraceae</i>	De Lajudie et al, 1998
<i>M. tiashanense</i>		<i>Glycyrrhiza</i> spp., <i>Halimodendron. holodendron</i> , <i>Sophora</i> spp. <i>G. max</i>	Chen et al., 1995
<i>Rhizobium</i>	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolos vulgaris</i>	Segovia et al., 1993
	<i>R. gallicum</i>	<i>P. vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i> spp.	Lindström et al., 1989
	<i>R. giardinii</i>	<i>P. vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
	<i>R.etli biovar mimosae</i>	<i>P. vulgaris</i>	Wang et al, 1999
	<i>R. yanglingense</i>	<i>P. vulgaris</i>	Tan et al, 2001
	<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini et al, 2002
	<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i> spp.	Wei et al, 2002
	<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i> spp	Wei et al, 2003
	<i>R. daejeonense</i>	<i>Medicago sativa</i>	Quan et al, 2005

	<i>R. hainanense</i>	<i>Stylosantes</i> sp, <i>Cetrosema</i> sp., <i>Tephrosia</i> sp., <i>Desmodium</i> <i>sinuantum</i> , <i>V. unguiculata</i> , <i>Arachis hipogea</i> , <i>Desmodium</i> <i>triquetrum</i> .	Chen et al., 1997
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbaceae</i> , <i>leucaena</i> <i>leucocephala</i> , <i>Sesbania rostrata</i> .	Wang et al., 1998
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>Macroptilium</i> <i>atropurpureum</i>	Jordam et al., 1984
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i> , <i>Vicia vilosa</i> .	van Berkun et al., 1998
	<i>R. tropici</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>Leucaena sculenta</i> , <i>L.</i> <i>leucocephala</i>	Martinez-Romero et al., 1991
	<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chislensis</i>	Nick et al., 1999
	<i>S. fredii</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>Glycine</i> spp. <i>V. unguiculata</i> , <i>Cajanus cajan</i>	Scholla, 1984 e de Lajudie et al., 1994
	<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chislensis</i>	Nick et al., 1999
	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	Jarvis et al., 1992 e de Lajudie et al., 1994
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i> spp.	Rome et al., 1996
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i> spp., <i>Acacia</i> spp., <i>L. leucocephala</i> , <i>N. oleracea</i>	de Lajudie et al., 1994
	<i>S. teranga</i>	<i>Sesbania</i> spp., <i>Acacia</i> spp., <i>L. leucocephala</i> , <i>N. oleracea</i>	de Lajudie et al., 1994
	<i>S. xinjiangensis</i>	<i>Glycine max</i>	Chen et al., 1988
	<i>S. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Wang et al, 2002
	<i>S. Kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Wei et al, 2002
	<i>S. americanum</i>	<i>Acácia</i> spp., <i>P. vulgaris</i>	Toledo et al. 2003

2.4 Interação entre Rizóbio e Adubo Verde

Agroecosistema define-se por:

“Os agrossistemas podem ser definidos como sistemas que produzem alimentos e fibras, um processo que é governado por muitos fatores e componentes, como: o tipo de solo, sistemas de cultivo e sistemas de manejos. Todas essas interferências no solo podem provocar alterações na composição da sua biota e em especial os microrganismos que são mediadores dos principais processos de ciclagem dos nutrientes. A importância dos microrganismos nestes sistemas depende dos grupos funcionais, na qual são participantes ativos em vários processos para a nutrição das plantas, como as bactérias diazotróficas, que são responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico”

LANZE et al, 2007.

SMYTH et al. (1991) conferem a potencialidade dos adubos verdes em substituir os adubos minerais à simbiose de leguminosas. Porém fatores como clima e solo e manejo das culturas influenciam na contribuição de biomassa vegetal e no N disponibilizado pelas leguminosas em consórcio com culturas de interesse econômico (RAO e MATHUVA, 2000).

Lacerda e Silva (2006) realizaram análises em solos conservados, degradados, com e sem inoculação com rizóbio, com a finalidade de observar os benefícios da rotação de cultura com o feijão-de-porco e da adubação verde nas características do solo. No solo conservado, o notável aumento de 53,7% no teor de matéria orgânica influenciou significativamente a densidade global, a qual diminuiu em 9,7% conduzindo, em consequência, a um aumento de 12,2% para a porosidade, em relação aos valores encontrados para o solo degradado. Os autores concluíram que os efeitos prejudiciais da erosão e benéficas da conservação do solo foram evidenciados em todas as propriedades físicas e químicas, particularmente no teor de

matéria orgânica. As melhores condições físicas e químicas encontradas no solo conservado potencializaram os efeitos positivos da inoculação com rizóbios, associada à rotação de feijão-de-porco com o algodão.

Em sistemas agrícolas a cobertura vegetal com leguminosas, a umidade, a temperatura, o pH, e os teores de fósforo no solo são fatores que mais influenciam a sobrevivência de rizóbios no solo (HIRSCH, 1996). No entanto, fatores não menos importantes, mas de menor ocorrência, como por exemplo, alta salinidade, carência de micronutrientes e contaminações com metais pesados e resíduos orgânicos também afetam significativamente a população de rizóbio presente no solo (ZILLI, 2001, MENDONÇA & SCHIAVINATO, 2005).

A temperatura do solo é uma variável ambiental que também geralmente afeta a atividade biológica dos rizóbios e seus hospedeiros. Segundo Toro, (1996) a faixa de temperatura do ambiente considerada ótima para a maioria das leguminosas nodularem varia entre 20^o a 30^oC. Para as leguminosas temperadas, a alta temperatura, além de afetar a FBN, afeta a própria planta, enquanto que em leguminosas tropicais o que é principalmente afetado é a eficiência da FBN. Baixas temperaturas reduzem a formação de nódulos e a fixação de nitrogênio em leguminosas de clima tropical (PADMANABHAN et al., 1990).

Observa-se aporte de N, proveniente da FBN, por bactérias diazotróficas, quando se cultivam leguminosas de interesse econômico e como adubos verdes para culturas principais (MARTINAZZO, 1989; DE-POLLI et al., 1996; BODDEY et al., 1997; SHARMA et al., 2000, MARTINS et al., 2003), demonstrando o potencial de uso destas associações simbióticas.

Normalmente, as leguminosas contêm altos teores de N em seus tecidos no período de floração, o que significa uma contribuição acima de 150 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ de N, com um percentual de 60% a 80% do N proveniente da fixação biológica de nitrogênio (GILLER, 2001). Considerando-se o sistema solo-planta, a presença das leguminosas representa uma valiosa contribuição para o aporte de N derivado da FBN, que seria suficiente para balancear as exportações de N pela cultura principal. Em um estudo avaliando a produtividade de frutos de berinjela foi observado uma exportação de 40,0 a 70,8 kg.ha⁻¹ de N e a utilização de leguminosas, contribuiu com uma adição de N via FBN que variou de 23 a 104 kg.ha⁻¹ (CASTRO et al., 2005).

Gomez e Zandstra (1977) também observaram um acúmulo de N fixado (kg.ha⁻¹.ano⁻¹) em diferentes espécies de leguminosas: Centrosema (112), Soja perene (160-450), Guandu (41-280), *Leucaena leucocephala* (310-800), Feijão-de-porco (49-190), Calopogônio (370-450), demonstrando o potencial dessas plantas em fixar N.

Tabela 2. Produção de Massa seca (MS) e N fixado em diferentes espécies de mucuna.

Espécies	Produção de MS		N fixado	
	t.ha ⁻¹ .ano		t.ha ⁻¹ .ano	
	Calegari, 1998	Garcia 2002	Gomez e Zandstra, 1977	Calegari, 1998
Mucuna preta	4-7,5	9,96	157	157
Mucuna cinza	5 a 9	11,6	-----	-----
Mucuna anã	3,5 a 6,5	3,48	-----	76 a 282

O excesso de N no solo reduz a nodulação de plantas e o processo de FBN (STAMPFORD et al., 1995, ZILLI et al., 2007). A planta apresenta uma economia de energia

quando obtém N do solo em comparação a obtenção via FBN e desta forma, preferencialmente, a planta utiliza N disponível no solo em detrimento da formação do processo de FBN. Contudo, a existência de estirpes de rizóbio capazes de fixar N, mesmo em condições de alto teor de N no solo, (FERNANDEZ et al., 1986), caracteriza um espaço para novos estudos incluindo também respostas em relação à especificidade e a capacidade competitiva do rizóbio no solo (RUMJANEK et al, 2005).

A partir de um estudo nos anos de 2004 e 2005 na área do SIPA (Sistema Integrado de Produção Agroecológica – Fazendinha km 47), foram coletados nódulos de diferentes adubos-verdes não inoculados, mas efetivos. Uma coleção de 306 isolados obtidos de nódulos de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*), cunhã (*Clitoria ternatea*), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), guandu (*Cajanus cajan*), crotalaria (*Crotalaria juncea*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, *C. mucronata* e *C. breviflora*) e mucuna anã (*Mucuna deeringeana*) e mucuna cinza (*Mucuna pruriens*) foi obtida e caracterizada culturalmente. Neste trabalho observou-se uma alta diversidade de rizóbios e uma forte relação de especificidade dos adubos-verdes (BRATTI et al., 2005).

2.5 Sobrevivência e Especificidade de Rizóbios

O estabelecimento da nodulação envolve diferentes mecanismos, como (1) reconhecimento molecular entre a planta e rizóbio, (2) formação do cordão de infecção e invasão dos rizóbios (3), formação dos nódulos, (4) conversão de bactérias em bacterióides e (5) estabelecimento da fixação biológica de nitrogênio (FREIBERG et al. 1997). Dentre essas etapas, o reconhecimento molecular entre rizóbios e plantas hospedeiras é um passo crítico para determinar a faixa hospedeira de rizóbios.

A simbiose entre leguminosa e rizóbio apresenta, geralmente, um elevado grau de especificidade baseada na troca de sinais químicos entre os parceiros. Moléculas de lipoligossacarídeos, conhecidas como fatores Nod, atuam como sinais morfogênicos específicos capazes de induzir deformação no pêlo radicular, divisão células corticais da raiz e formação dos nódulos (CARDINALE et al., 2008). Simbioses promíscuas são consideradas amplamente distribuídas e mais antigas do que as simbioses restritivas que representam maior especialização e são limitados a determinados nichos (PERRET et al. 2000). A promiscuidade, compreendida como a capacidade da leguminosa associar-se com diversas espécies e estirpes de rizóbio, é extremamente relevante no caso das leguminosas tropicais (THIES et al., 1991a).

Algumas estirpes bacterianas apresentam elevada especificidade ao hospedeiro, tais como *Mesorhizobium huakuii*, que só pode ser nodulada com a leguminosa *Astragalus sinicus* (CHENG et al. 2006), enquanto que alguns rizóbios, como a estirpe NGR234, pode nodular uma ampla gama de hospedeiros, incluindo *Parasponia*, não leguminosa (PUEPPKE BROUGHTON et al, 1999).

As espécies hospedeiras são um dos fatores mais importantes para efeito da distribuição da população indígena de rizóbios. A presença da leguminosa proporciona condições ecológicas específicas para selecionar estirpes com alta capacidade de adaptação para a planta hospedeira, para que possam adquirir alta competitividade e de estabelecer-se com sucesso (ZHANG et al., 2007).

No caso do *Phaseolus vulgaris* (feijão comum), existem limitações à otimização da produção por meio de inoculação, destacando-se a competição das estirpes procedentes do inoculante com as nativas predominantes no nódulo do hospedeiro, a temperatura e acidez elevadas e ao ciclo da cultura ser relativamente curto (MOREIRA, 2008).

Starkanova et al. (1999) afirmaram que algumas estirpes de rizóbio têm a capacidade de solubilizar fosfatos disponibilizando-os para si e para a planta hospedeira, proporcionando o crescimento destas. A diminuição da população desses rizóbios no solo pode ser causada por uma concentração elevada de alumínio tóxico e devido ao pH acidificado (HUNGRIA & VARGAS, 2000), no entanto existem microrganismos tolerantes a esses fatores adversos (KAWAI et al., 2000). Em função dos princípios de Agricultura sustentável e natural, o uso de estirpes eficientes e adaptadas torna-se fundamental para reduzir aplicação de insumos no solo (HARA & OLIVEIRA, 2005).

O valor do pH na faixa de neutro a pouco alcalino ajuda na exudação de carbono pelas raízes das plantas, interferindo na sobrevivência e competição do rizóbio no solo, porque compostos de carbono são substratos para os microrganismos que vivem na rizosfera (TORO, 1996).

Além da eficiência simbiótica, a capacidade de sobrevivência no solo e a habilidade competitiva com a população rizobiana nativa ou naturalizada do solo são características altamente desejáveis em estirpes de rizóbios recomendadas para inoculação em leguminosas (BROCKWELL, 1981). Essas características têm sido frequentemente relacionadas à maior resistência das estirpes a antibióticos, ao Al e a temperaturas elevadas (OLIVEIRA & GRAHAM, 1990; WOLFF et al., 1991; XAVIER et al., 1998, FERNANDES et al., 2003).

Segundo Munns & Keyser (1981), o alumínio reduz a atividade das células de rizóbio próximas a divisão celular, aumentando o tempo de geração de células. Ocorrendo uma queda na população de rizóbio, uma vez que a taxa de mortalidade se torna mais alta que a multiplicação celular, representando segundo Wani et al. (1995), um fator limitante à sobrevivência e ao estabelecimento do rizóbio no solo.

A umidade do solo interfere diretamente no metabolismo celular da bactéria e da planta, bem como no processo de FBN, sendo a sua carência ou excesso fator determinante da permanência e multiplicação da bactéria no solo (SANGINGA et al., 1992).

A estrutura e comportamento da população de rizóbio presente no solo são critérios que precisam ser considerados no momento da seleção de inoculantes (THIES et al., 1991B), pois a densidade, efetividade e habilidade competitiva são características da população de rizóbio nativo que afetam grandemente as respostas de inoculação (CHATEL et al. 1968).

A adoção de tecnologias sustentáveis que permitam a conservação dos recursos naturais e promovam uma melhoria na qualidade de vida da população configura-se como um componente importante para garantir cidadania e dignidade aos agricultores. Dentro desse contexto, a inoculação de estirpes de rizóbio em leguminosas pode suprir em parte ou totalmente a necessidade de nitrogênio da cultura através de FBN. Além dos programas de melhoramento da planta, torna-se necessário a otimização do processo de FBN privilegiando a seleção das estirpes concomitante ao melhoramento vegetal, considerando os estudos de especificidade entre o macro e microssimbionte, a eficiência agrônômica e a adaptabilidade das estirpes frente às características regionais, culminado na recomendação das estirpes para a cultura como inoculante (RUMJANEK et al., 2006).

Stewart et al. (1991), ao comentarem sobre a definição de uma agricultura sustentável, recomendam pesquisas sobre práticas de produção, utilizando-se a biotecnologia, destacando-se neste contexto a adubação verde, associada à inoculação com rizóbio, como uma das técnicas mais promissoras para recuperação de solos degradados, a baixo custo.

2.6 Inoculantes

Inoculante é todo material contendo microrganismos e que atua em prol ao desenvolvimento das plantas. O inoculante contém bactérias específicas para cada espécie de

leguminosa. Portanto, o inoculante preparado para uma leguminosa não pode ser utilizado em outras espécies. Algumas das vantagens do uso do inoculante em leguminosas são: melhoria na qualidade do solo, diminuição considerável no uso de adubação nitrogenada, economia para o agricultor, aumento na produtividade da lavoura, produto natural, sem prejuízo para o meio ambiente. (PAVAN & MOREIRA FILHO, 1998; Site: EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2008).

Geralmente, quanto maior a população nativa de rizóbio no solo, mais difícil é a introdução com sucesso da estirpe inoculante (THIES et al., 1991b). Tem sido freqüentemente observado que inoculantes reconhecidos como eficientes quanto à atividade de FBN não conseguem garantir uma boa nodulação, pois são incapazes de se estabelecer no solo e competir com a microbiota nativa. Assim, a introdução de estirpes mais eficientes em um solo contendo população de rizóbio nativa ou naturalizada estabelecida pode ser prejudicada, devido à baixa competitividade e falta de adaptação das estirpes inoculantes às condições ambientais locais (NEVES & RUMJANEK, 1997).

A inoculação de leguminosas com rizóbio tem sido amplamente utilizada nos sistemas agrícolas, para melhorar produtividade da cultura no campo. No entanto, inoculantes rizobianos disponíveis comercialmente muitas vezes não conseguem se estabelecer nos solos com as populações nativas de rizóbios (HARTMANN et al., 1998). Nesse contexto, a seleção das mais eficazes e competitivas estirpes é necessária (SIKORA et al., 1997). É geralmente aceito que as populações nativas estejam mais bem adaptadas ao seu ambiente e, portanto, são capazes de formar uma simbiose mais eficaz do que inoculantes comerciais isoladas a partir de um tipo de solo distantes ou independentes (GANDEE et al., 1999; BRADIC et al., 2003).

No entanto, algumas estirpes hoje recomendadas para adubos-verdes, foram originalmente isolados a quase 40 anos e em outras leguminosas hospedeiras e segundo a Instrução Normativa, nº 10 de 2006, do MAPA, existem mais de um inoculante recomendado para mais de uma espécie de adubo verde (Tabela 3). A exemplo da estirpe BR 2801 (SEMIA 6157), isolada de *Indigofera* no ano de 1966 e recomendada para cunhã e guandu, as estirpes BR 2003 (SEMIA 6156) e BR 2811 (SEMIA 6158) isoladas de *Crotalaria spectabilis* e recomendada para feijão de porco, estirpe BR 2811 (SEMIA 6158), também é recomendada para *Mucuna* spp., enquanto a estirpe BR 2001 (SEMIA 6145) (BRASIL, 2006) material coletado na Libéria, Africa, isolado de *C. juncea*, em 1967 e recomendada para cunhã (ROSA PITARD, informações do banco de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia).

Particularmente no caso da estirpe BR2001 (SEMIA 6145), esta estirpe desde 2004 era recomendada também para a cultura do feijão-caupi, mas devido à ineficiência no campo e a incapacidade de competir com a população nativa, esta estirpe deixou de ser recomendada para esta cultura na última atualização das estirpes autorizadas (MAPA, IN nº 10, de 21 de março de 2006). Em recentes estudos com feijão-caupi, 3 novas estirpes (SEMIA 6461, 6462 e 6463) passaram a ser recomendada para esta cultura (MARTINS, et al., 2003 e LACERDA, et al., 2004).

Já no caso de mucuna-preta utilizando as estirpes BR7701 (6 H3, Embrapa/CNPAB) e BR 7702 (TAL 574, Niftal-Hawai) e feijão de porco utilizando as estirpes BR 2003 (IJ, Embrapa/CPAC) e BR 3102 (SMS300, IAC) Rodrigues et al., (1994) não observaram efeito da inoculação destas estirpes em relação a nodulação espontânea do solo.

Estes dados vêm mostrar que nos últimos anos, além da concepção de seleção de rizóbios, que passa pelo processo de coleta e isolamento das bactérias, estudos voltados para caracterizar a diversidade e ecologia de rizóbios (XAVIER et al., 1998, FERNANDES et al., 2003), fazem parte da estratégia para a seleção de materiais mais promissores e adaptáveis às condições edafo-climáticas das culturas.

Tabela 3. Inoculantes recomendados para adubos verdes no Brasil.

Adubo verde		Sp. do microrganismo	Número na coleção oficial (SEMIA)
Nome vulgar	Espécie		
Calopogônio	<i>Calopogonio</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6152
Feijão de Porco	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6156, 6158
Crotalária	<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6145, 6156
Crotalária	<i>Crotalaria spectabilis</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6156, 6158
Feijão Guarda,	<i>Cyamopolis tetragonoloba</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6145, 6319
Tremoço	<i>Lupinus</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	928, 938
Kudzu	<i>Pueraria phaseoloides</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6175
Feijão mucuna	<i>Stizolobium atterimum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6158

Portanto, para se explorar de forma mais otimizada a FBN, é necessário que se conheça a ecologia dessas bactérias antes do desenvolvimento do inoculante (RUMJANEK et al., 2005). A análise qualitativa mostra que as características fenotípicas dos microrganismos são influenciadas por condições edafo-climáticas específicas, bem como a presença de plantas leguminosas parece ser um forte determinante da diversidade da população de rizóbio (SINGLETON & TAVARES, 1986; HIRSCH et al., 1993).

2.7 Caracterização e Seleção de Rizóbios

A interação entre leguminosas e rizóbios é um exemplo de associação biológica intensamente estudada, cujos benefícios para a sustentabilidade agrícola são reconhecidos devido ao processo de FBN, refletido no aumento da produtividade vegetal, na recuperação de áreas degradadas, no incremento da fertilidade e da matéria orgânica do solo. Entretanto, sua principal aplicabilidade, em curto prazo, indiscutivelmente está associada à economia no uso de fertilizantes nitrogenados industrializados, através inoculação de estirpes selecionadas de rizóbio (BRATTI et al, 2005).

A seleção de uma estirpe de rizóbio para ser utilizada como inoculante deve priorizar tanto os aspectos relacionados a FBN propriamente dita, quanto àqueles relacionados à sua sobrevivência e estabelecimento no solo, assim como características que garantam a capacidade competitiva frente às estirpes nativas. A grande atenção que tem sido dada a esses fatores é decorrente da expectativa de se aumentar à produtividade através do estabelecimento de estirpes mais eficientes (MARTINS, 2003).

A seleção de uma estirpe de rizóbio a ser utilizada como inoculante para uma determinada leguminosa é um processo demorado que passa por uma série de etapas. Inicialmente, é preciso avaliar uma coleção de estirpes quanto à eficiência para as condições requeridas de uso. As estirpes consideradas eficientes devem, em seguida, ser testadas quanto a sua capacidade de competir com a microbiota nativa o que irá determinar a capacidade de colonização da raiz e a formação dos nódulos (NEVES & RUMJANEK, 1998).

Solos com níveis de pH próximo à neutralidade favorecem a presença de microrganismos produtores de antibióticos, supondo que rizóbios que vivem nessas condições sejam mais tolerantes. Inversamente, o solo ácido pode abrigar populações mais sensíveis (LOMBARDI, 1995). A caracterização das populações que apresentam como atributo a

resistência intrínseca a antibióticos tem sido usada como técnica na ecologia da comunidade bacteriana nos solos (PEREIRA et al 1994; XAVIER et al., 1998).

Por muito tempo a taxonomia de microrganismos recebeu pouca importância, devido às dificuldades de classificação utilizadas pelos métodos tradicionais, com base essencialmente em características fenotípicas e fisiológicas. O estudo taxonômico além da enorme contribuição na avaliação da biodiversidade no ambiente, fornece também informações em relação à expressão de características fisiológicas que podem ser correlacionadas com fatores ambientais (BULL et al. 1992).

Segundo Souza et al (2008) os parâmetros de massa de nódulos e massa da parte aérea foram eficientes na avaliação da fixação biológica de nitrogênio em soja, quando seus coeficientes de variação atingem no máximo de 33 e 18%, respectivamente, que contribuiu com 72 a 88% do nitrogênio total da parte aérea.

O conhecimento do padrão de distribuição desses grupos morfológicos pode ser o ponto de partida para a seleção devido à capacidade das leguminosas fixarem nitrogênio atmosférico em associação com rizóbios específicos para cada adubo verde, visando à utilização como inoculante para essas culturas (BRATTI et al., 2005).

Martins et al. (1996) analisaram a variabilidade existente na população de rizóbios, inicialmente tomando como base a caracterização morfológica dos isolados em meio de cultura seguida de eficiência em casa de vegetação, usando os grupos mais discriminantes. A partir desse trabalho, associado à seleção de outras características intrínsecas do rizóbio, como tolerância a antibiótico (XAVIER et al., 1998), foi possível selecionar uma estirpe capaz de alcançar patamares de até 30% de produtividade do feijão-caupi em relação ao controle não inoculado (MARTINS et al., 2003).

Estudos da população de rizóbio do solo possuem papel fundamental, pois o entendimento da composição, das características simbióticas e adaptativas, bem como da taxonomia da população de rizóbio do solo, podem possibilitar a seleção e introdução de novos inoculantes de rizóbio com maior eficiência simbiótica e capacidade competitiva (ZILLI, 2001)

Alguns autores estudaram a nodulação de várias leguminosas em ambientes tropicais e observaram grande variação na efetividade na faixa hospedeira, sendo necessário um manejo adequado para que se possam selecionar estirpes específicas para uso agrônomico, onde alta produtividade e percentagem de nitrogênio fixado são essenciais (THIES et al., 1991).

Comumente se tem dividido os rizóbios em grupos, em razão da velocidade de crescimento, como sugerido primeiramente por Lohnis & Hansen (1921), sendo crescimento rápido (*Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*), crescimento intermediário (*Mesorhizobium* e *Allorhizobium*) e crescimento lento (*Bradyrhizobium*).

A caracterização dessas bactérias a partir da tolerância a temperatura também tem sido utilizada. Fernandes et al (2003), observaram que o crescimento de cinco estirpes não foi alterado a 35°C, comparando com a temperatura de 28°C, somente uma estirpe cresceu a 45°C e o diâmetro das colônias nesta temperatura foi equivalente à metade do observado quando a bactéria foi incubada a 28°C. Temperaturas elevadas têm, representado um dos principais fatores limitantes a FBN em regiões tropicais, já que afetam praticamente todas as etapas de crescimento do rizóbio e das plantas hospedeiras, sendo os efeitos ainda mais críticos na relação simbiótica (HUNGRIA & VARGAS, 2000), Concluindo que os limites de temperatura para FBN com leguminosas tropicais se situam entre 27°C e 40°C.

Mudanças na forma de caracterizar fenotipicamente as bactérias diazotróficas provavelmente ocorrerão no grupo dos rizóbios que nodulam as leguminosas tropicais, tanto pela aplicação de técnicas moleculares como pela combinação de características morfológicas e genotípicas que conferem maiores informações no estudo de diversidade (SILVA, 1999).

À medida que aumenta o uso de técnicas de biologia molecular e imunologia, mais informações sobre os diferentes grupos de rizóbio são constatados, focalizando rizóbios associados a leguminosas tropicais (ZILLI, 2001).

Em estudos com feijão e leucena, sendo usadas como plantas-isca em solos do Cerrado, verificou-se alta diversidade de rizóbios, com presença de três diferentes espécies de rizóbio: *Rhizobium etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. tropici*, constatadas através de análises moleculares (MERCANTE, 1997). O contínuo cultivo pode propiciar a seleção de microrganismos mais adaptados as condições de cultivo agrícola (PERIN et al., 2004; PEREIRA, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área Experimental

A coleta de amostras de solo foi realizada em área do Sistema de Manejo Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), também conhecido como Fazendinha, localizado no município de Seropédica, RJ. Esta área é um campo experimental mantido pela Embrapa Agrobiologia, UFRRJ e PESAGRO-EES, com aproximadamente 70 ha, dos quais 30 ha são formados de horto e área de preservação permanente, 20 ha são destinados à formação de pastagens para criação de bovinos e outros 20 ha destinados à produção de hortaliças, cereais, frutíferas, cana-de-açúcar e cafeicultura.

O SIPA situa-se a 33 m de altitude, 22° 46` S e 43° 41` O. O clima é do tipo Aw, com estação chuvosa que inicia-se em setembro, estendendo-se até março. Nesse período a temperatura do ar alcança valores de até 40° C à sombra com relativa frequência. A partir de maio a taxa de precipitação pluviométrica diminui de forma acentuada, alcançando valores mínimos nos meses de julho e agosto. Os solos predominantes na área são classificados como Argissolo Vermelho-Amarelo e Planossolos e apresentam baixa fertilidade natural.

Esse sistema foi criado como espaço motivador do exercício da agroecologia em bases científicas, programado para o aproveitamento das potencialidades locais, com base na integração lavoura-pecuária, envolvendo plena diversificação de cultivos e algumas criações, dentro de estratégia de sustentabilidade e estabilização da atividade de produção. Foi implantado em 1993 e acumula mais de 15 anos de experiência em sistemas orgânicos de produção, onde o uso de leguminosas como adubo verde é constante (Site: EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2008).

As coletas de solo foram realizadas em oito áreas do SIPA, em dezembro de 2007, para a implantação de experimentos em vasos.

Tabela 4. Histórico de utilização das oito áreas de coleta de solo do SIPA de três anos consecutivos (DIAS, 2007).

ÁREA	2003	2004	2005
1	Sorgo	Sorgo	Guandu
2	Guandu.	feijão-de-porco.	Feijão-de-porco.
3	Pousio ? feijão.	Pousio.	Pousio.
4	Mandioca.	Mandioca ? crotalária.	Crotalária ? Batata-doce.
5	Cebolinha e salsa ? batatinha ? Feijão.	Milho? crotalária ? Mucuna ? crotalária.	Milho ? crotalária ? caupi.
6	Mucuna ? hortaliça ? milho e mucuna.	Milho e mucuna? crotalária ? mucuna ? milho e mucuna.	Milho e mucuna ? hortaliça.
7	Crotalária e mucuna ? couve ? milho e mucuna	Milho e mucuna ? couve ? milho	Milho ? couve
8	Sorgo ? repolho ? vagem alessa	Milheto e crotalária ? batata-doce ? milho	Milho ? batata-doce

Tabela 5. Classes de solo do SIPA, sua localização e seu respectivo uso (Espíndola, Comunicação pessoal, 2007).

Legenda	Classe de Solo	Localização	Utilização da área (2007)
1	Planossolo	Perto do PSA (Projeto de Sanidade Animal)	Cultura mais recente: Guandu (roçado)
2	Planossolo	Gleba II	Plantio de crotalária e rami
3	Planossolo	Gleba XXIV	Cultura anterior: Crotalária
4	Argissolo Amarelo	Gleba XIV	Rotação guandu-crotalária. Atualmente guandu.
5	Argissolo Vermelho-Amarelo	Gleba XX	Área atualmente desnuda. Culturas anteriores foram mucuna e milho.
6	Argissolo Vermelho-Amarelo	Gleba X	Plantio de milho, cultura anterior mucuna.
7	Argissolo Amarelo	Gleba IX	Cultura atual Berinjela em (plantio direto), anteriormente mucuna.
8	Argissolo Amarelo	Gleba VII	Área preparada para plantio (arada). Cultura anterior: crotalária.

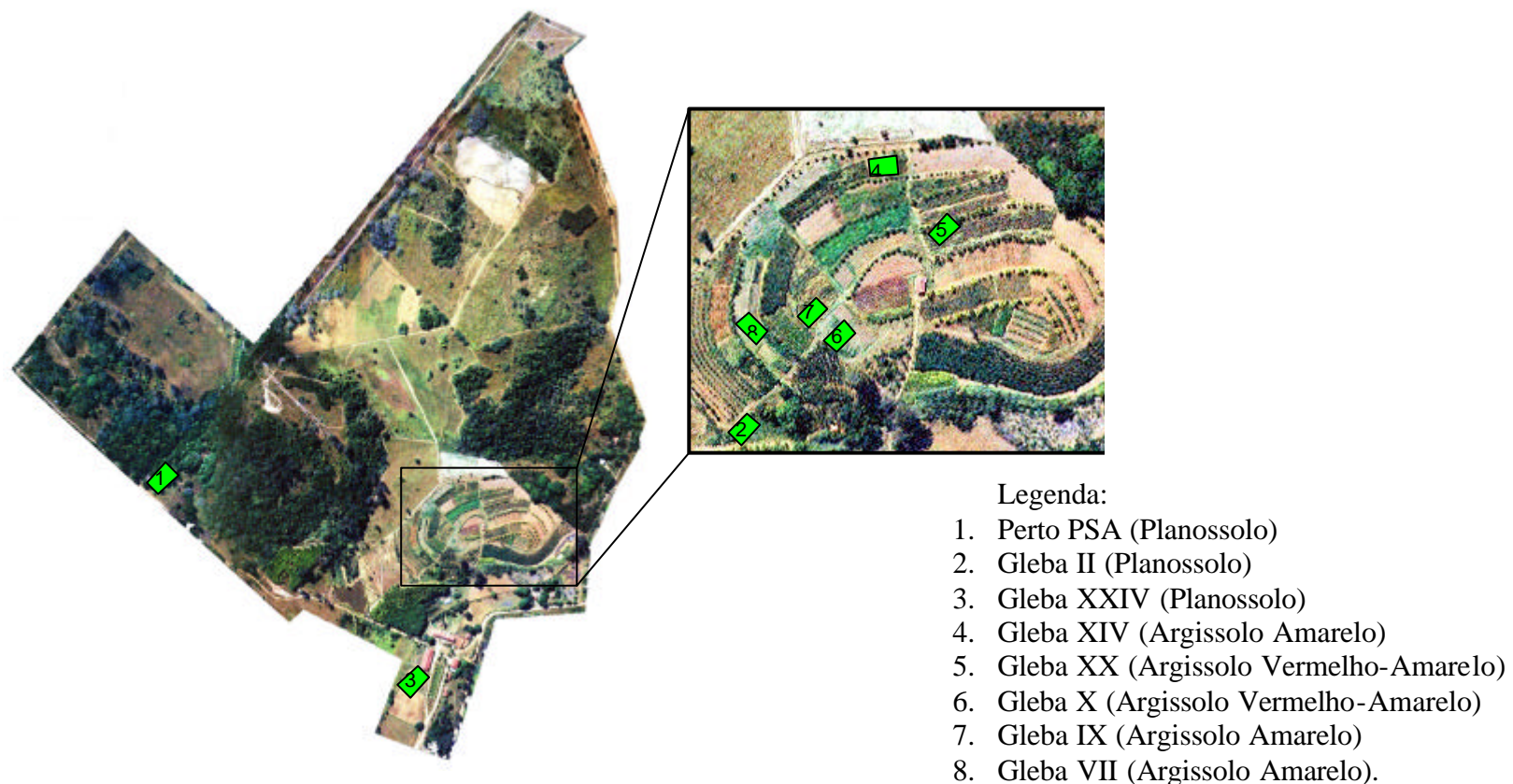


Figura 1. Imagem aérea do SIPA e em detalhe os locais de implantação dos experimentos. Foto cedida por Ricardo Eiras Moreira da Rocha. (Escala 1:2.000).

3.2. Plantio de adubos verdes e coleta de nódulos

As sementes de mucuna cinza (*Mucuna pruriens*), mucuna preta (*Mucuna aterrima*) e mucuna anã (*Mucuna deeringiana*) foram obtidas da produção da Fazendinha Agroecológica e o plantio foi conduzido nas dependências da Embrapa Agrobiologia – Seropédica – RJ, utilizando vasos com capacidade de 5 kg contendo oito amostras de solos do SIPA (Tabela 5 e Figura 1), sem a prática de inoculação. As amostras de solo foram analisadas quanto à fertilidade do solo de acordo com EMBRAPA (1997) (Tabela 6).

Tabela 6. Características químicas dos oito solos utilizados neste estudo.

Solos do SIPA	pH em água	Análise de Solo								
		Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	C	MO	N
		-----cmolc/dm ³ -----				--mg/dm ³ --		-----g.kg ⁻¹ -----		
1	5,4	0,1	2,3	1,7	0,6	19,6	36	7,4	12,8	0,82
2	5,2	0,1	2,4	1,6	0,8	7,0	18	3,6	6,10	0,49
3	6,6	0,1	6,4	4,4	2,1	234,3	104	8,9	15,4	1,28
4	6,0	0,1	4,6	2,4	2,2	20,1	81	9,5	16,4	1,22
5	6,4	0,0	4,4	2,8	1,6	65,4	108	7,1	12,3	1,20
6	5,2	0,2	1,0	0,5	0,5	13,4	22	2,4	4,10	0,33
7	5,7	0,1	2,2	1,5	0,6	21,3	48	3,6	6,10	0,56
8	5,8	0,1	2,0	1,1	0,9	65,7	59	3,0	5,10	0,55

O experimento foi conduzido entre os meses de dezembro de 2007 e fevereiro de 2008, os vasos foram enterrados e a superfície alinhada ao solo, sendo mantidos ao ar livre com o objetivo de manter um microclima simulando assim condições de campo. Foram semeadas duas sementes por vaso e, durante o ciclo foram realizados tratamentos culturais com a retirada manual de invasoras, a irrigação das plantas foi feita por rega manual e o tutoramento das plantas com auxílio de bambú. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com duas repetições de cada espécie de mucuna para cada solo, totalizando 48 vasos (3 espécies x 8 solos x 2 repetições).

Aos 60 dias após o plantio iniciou-se a coleta das plantas. A parte aérea foi destacada das plantas, seca em estufa (a 65°C por 72h) e pesada para a obtenção da massa seca (MS) e as raízes foram coletadas em fevereiro de 2008 nas dependências da Embrapa Agrobiologia.

As raízes foram lavadas em água corrente com auxílio de uma peneira e os nódulos retirados, secos em papel toalha, contados, e estocados em recipientes contendo sílica-gel para a desidratação dos nódulos, sem perda da viabilidade das bactérias e para posterior isolamento.

3.3. Isolamento e Caracterização de Bactérias

Inicialmente, cinco (05) nódulos retirados de cada vaso de mucuna anã, cinza e preta, foram re-hidratados em água destilada e estéril por cerca de 40 minutos, em seguida foi realizada lavagem com etanol (p.a.) durante 30 segundos, para reduzir a tensão superficial, seguida de desinfestação superficial com peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30% p.a.) durante 3 minutos, em seguida 10 lavagens com água destilada estéril.

Os 80 nódulos de cada espécie de mucuna foram desinfestados assepticamente e pressionados com uma pinça sobre o meio YMA (FRED & WAKSMAN, 1928, VINCENT, 1970), contendo vermelho congo (0,25%) em placa de Petri, com o objetivo de separar

rizóbios de possível contaminação. O meio YMA é composto de: manitol (para bactérias de crescimento lento)-10g e para bactérias de crescimento rápido com *Rhizobium* adicionar sacarose; K_2HPO_4 - sol.10%:1ml; KH_2PO_4 -sol. 10%: 4 ml; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -sol.10%:2ml; NaCl-sol.10%: 1ml; Extrato de levedura: 0,4g; vermelho congo (0,25%), O pH deve ser ajustado na faixa de 6,8 a 7,0; adicionar Agar: 15g/L. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias isoladas, as mesmas foram repicadas para novas placas, contendo o meio YMA (FRED & WAKSMAN, 1928, VINCENT, 1970) com azul de bromotimol: 0,5% em 0,2N de KOH: 5ml, em placa de Petri, com incubação de 28°C, para obter sua purificação, isolamento e posterior caracterização e armazenamento dos isolados.

A caracterização morfofisiológica dos isolados foi realizada de um a seis dias após o aparecimento das colônias isoladas (Anexo I, II e III). Os parâmetros avaliados foram: tempo de crescimento de cada isolado, considerando: crescimento rápido (até três dias) ou lento (quatro ou mais dias); reação de pH do meio de cultura após o crescimento das bactérias, observado pela coloração do mesmo, contendo o indicador azul de bromotimol (ácido, alcalino ou neutro); tamanho da colônia (mm); forma da colônia (circular ou irregular); elevação (plana ou com elevação); borda (inteira ou irregular); transparência (opaca, translúcida ou transparente); aparência (homogênea ou heterogênea) e cor (branca ou amarela).

Em relação ao muco produzido, foram avaliados os aspectos quanto a: aderência à alça de platina, observada pela remoção do muco da superfície do meio de cultura (limpando ou não); e elasticidade, observada pela formação ou não de fio, no momento da remoção do muco do meio de cultura (1= sem elasticidade, 2= pouca elasticidade, 3= muita elasticidade), placa limpa (sim ou não).

Uma matriz de dados originais foi construída, com 80 isolados de rizóbios caracterizados de cada espécie de mucuna e cinco estirpes padrão. Os isolados foram comparados por seu grau de similaridade estimado pelo coeficiente de Jacard (Sj), agrupados pelo método UPGMA e representados graficamente por um dendrograma obtido pelo programa NTSYS-pc, versão 2.1.

Cinco estirpes padrão foram usadas na comparação com as bactérias isoladas, são elas BR5410 (*Allorhizobium cauli*), BR 29 (*Bradyrhizobium elkani*), BR 521 (*Mesorhizobium ciceri*), BR 322 (*Rhizobium tropici*), BR 112 (*Sinorhizobium fredii*).

Os isolados de rizóbios foram acondicionados em eppendorfs contendo solução estoque (meio 79 sem indicador) com glicerol 30% e armazenados em superfreezer a -70°C para garantir a manutenção das amostras para estudos futuros.

A partir dos isolados de rizóbios caracterizados fenotipicamente, foram calculados os índices de diversidade de Shannon-Weaver, abundância de Simpson e riqueza de Margalef para as oito áreas de coleta de solo (ODUM, 1988; PINTO-COELHO, 2000).

3.4. Teste de Nodulação

Este teste foi usado como primeira estratégia para verificar a capacidade da coleção de 240 isolados em nodular os hospedeiros de origem, em casa de vegetação e utilizando substrato estéril. Para tal, foram instalados três experimentos de acordo com a espécie de hospedeiro, a capacidade disponível em casa de vegetação e o tempo de crescimento dos isolados e os solos coletados. A estirpe BR 2811 usada nos experimentos de nodulação das três espécies de mucuna (anã, cinza e preta), foi obtida do banco de coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, sob responsabilidade da curadora Rosa Pittard.

3.4.1. *Mucuna anã*

O experimento foi feito dividindo-se em três etapas: A primeira consistiu na instalação do experimento com parte dos isolados de nódulos de mucuna anã. O experimento foi instado em junho de 2008, e, conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia. O delineamento foi em blocos ao acaso, contendo 35 isolados com duas repetições cada. O segundo experimento foi instalado em julho de 2008 e o delineamento também foi em blocos ao acaso, com 35 isolados e duas repetições cada. Já terceiro foi instalado em outubro de 2008 com dez isolados (completando o teste dos 80 isolados da espécie), uma estirpe recomendada comercialmente para essa espécie (BR2811) e um controle negativo (sem inoculação) com duas repetições cada.

Foram utilizados vasos de Leonard modificados e autoclavados, tendo como substrato areia e vermiculita na proporção de 2:1 (v:v) (VINCENT, 1970). Por ocasião do plantio, as sementes foram imersas em álcool etílico 95% por 30 segundos para facilitar o contato do tegumento com a solução desinfetante, em seguida estas foram desinfetadas com Peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30% p.a.) por três minutos e lavadas 10 vezes seguidas em água destilada estéril. Foram plantadas três sementes em cada vaso e aos 7 dias após a germinação (DAE) foram desbastadas deixando uma planta por vaso.

Os isolados foram crescidos em meio 79 líquido (FRED e WAKSMAN, 1928) a 28° C com agitação constante de 150 rotações por minuto, de um a seis dias de acordo com o tempo de crescimento de cada bactéria. No período de sete dias aproximadamente após a germinação foi efetuada a inoculação com 1,0 mL de suspensão contendo as isolados em teste com cerca de 10⁹ células de rizóbio por mL de meio (FERNANDES e FERNANDES, 2000). As plantas inoculadas foram cobertas com uma camada de dois cm de areia esterilizada para prevenir possíveis contaminações. Semanalmente, em cada vaso, foi realizada a aplicação de solução nutritiva isenta de nitrogênio (NORRIS & T'MANNETJE, 1964) e sempre que necessário foi adicionada água estéril. A solução nutritiva é composta de: (1) KCl: 5,96g; (2) K₂HPO₄: 2,0g; (3) KH₂PO₄: 4,0g; (4) CaSO₄.2H₂O: 13,76g; (5) MgSO₄.7H₂O: 19,72g; (6) CuSO₄.5H₂O: 3 mg; ZnSO₄.7H₂O: 9 mg; MnSO₄.2H₂O: 8 mg; (NH₄)₆Mo.7O₂₄.4H₂O: 0,4 mg; H₃BO₃: 29 g; (7) FeSO₄.4H₂O: 100 mg; Ácido Cítrico: 100 mg, para 40 litros de água estéril. Entre 45 e 50 dias após o plantio (DAP), os nódulos foram retirados das raízes, contados, em seguida os nódulos e a parte aérea foram embalados em sacos de papel e levados a estufa a uma temperatura de 65° C até apresentar peso constante.

Os dados foram avaliados através do software Sisvar[®] (Universidade Federal de Lavras). Foi realizada a análise de variância e o teste de comparação de médias utilizado foi o teste de Scott-Knott a 5% de significância.

3.4.2. *Mucuna cinza*

O experimento com isolados de mucuna cinza foi instalado em casa de vegetação (Embrapa Agrobiologia), no início de agosto de 2008. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, contendo 80 isolados, uma estirpe recomendada (BR 2811) e um controle negativo (sem inoculação) com duas repetições cada tratamento. Os procedimentos na montagem e monitoramento do experimento foram iguais ao descrito no item anterior. A coleta dos nódulos e da parte aérea foi realizada entre 45-50 DAP, em final de setembro de 2008.

3.4.3. *Mucuna preta*

O experimento com isolados de mucuna preta foi realizado em uma única etapa e, instalado em casa de vegetação estéril (Embrapa Agrobiologia), no final de outubro de 2008. O delineamento foi em blocos ao acaso, contendo 80 isolados, uma estirpe recomendada (BR 2811) e um controle (negativo) com duas repetições cada. Os procedimentos na montagem e

monitoramento do experimento foram iguais ao descrito no item 3.4.1. A coleta dos nódulos e da parte aérea foi realizada aos 45 dias após o plantio (DAP), início de dezembro de 2008.

3.5. Testes de eficiência de estirpes em condição controlada

De acordo com os resultados dos testes de nodulação, foram selecionados cinco isolados de cada espécie de mucuna para os testes de eficiência. Essas estirpes foram depositas no banco de coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.

3.5.1. Mucuna anã, cinza e preta

O delineamento foi em blocos ao acaso com oito tratamentos de cada espécie (cinco isolados pré-selecionados, uma estirpe recomendada para mucuna a BR 2811 obtida do banco de coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, um tratamento sem inoculação e com aplicação de N (100 mg de N.vaso⁻¹.semana⁻¹) na forma N ((NH₄)₂SO₄), parcelado semanalmente e um tratamento controle (sem inoculação e sem N), com quatro repetições e duas coletas (8 x 4 x 2), totalizando 64 vasos para cada espécie de mucuna (anã, cinza e preta). Para o plantio as sementes foram imersas em álcool etílico 95% por 30 segundos, em seguida estas foram desinfestadas com Peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30% p.a.) por 3 minutos e lavadas 10 vezes seguidas em água estéril.

Foram plantadas três sementes em cada vaso de Leonard (VINCENT, 1970) autoclavado (areia e vermiculita, 2:1, v/v) contendo 250 ml de solução nutritiva modificada de Norris (NORRIS & T'MANNETJE, 1964). Os isolados foram crescidos em meio 79 líquido, a 28° C de um a seis dias (de acordo com o tempo de crescimento de cada bactéria), mantidos sob agitação. Os isolados foram inoculados, utilizando 1,0 ml da suspensão de rizóbios em fase de crescimento exponencial. Foram avaliados os seguintes parâmetros: a massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de nódulos (MSN), massa seca da raiz (MSR) e N total (parte aérea), pelo método semi-micro KJELDAHL (LIAO, 1981). Os dados foram avaliados através do software SAEG (Universidade Federal de Viçosa). Foi realizada a análise de variância e o teste de comparação de médias Scott-Knott a 5% de significância.

3.6. Caracterização Genotípica de bactérias

3.6.1. Extração de DNA

De acordo com os resultados obtidos do dendrograma com as características morfológicas dos isolados, foram selecionados 66 isolados representantes (22 de mucuna anã, 20 de mucuna cinza e 14 de mucuna preta) para a caracterização do perfil de restrição de DNA pela técnica de Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).

Foram utilizadas 19 espécies de bactérias diazotróficas obtidas do banco de coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, sendo: BR 525 (*Sinorhizobium medicae*), BR 7411(*Sinorhizobium meliloti*), BR 522 (*Mesorhizobium mediterraneum*), BR 527 (*Sinorhizobium. terangeae*), BR 526 (*Sinorhizobium sahelii*), BR 112 (*Sinorhizobium fredii*), BR 113(*B elkanii*), BR 114 (*Bradyrhizobium japonicum*), BR 521 (*Mesorhizobium siceri*), BR523 (*Mesorhizobium. tianshanense*), BR524 (*Mesorhizobium. huakuii*), BR 10016 (*Rhizobium tropicii II*), BR 529 (*Rhizobium giardinii*), BR 10026 (*Rhizobium etei*), BR 10052 (*Rhizobium leguminosarum bv.*), BR7606 (*Rhizobium .leguminosarum Bortri folii*), BR 528 (*Rhizobium gallicum*), BR 5401 (*Azospirillum doberanae*) e BR 5410 (*Azorhizobium caulinadans*). O DNA extraído foi submetido à eletroforese (100 V; 30 min.) em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio (10 ppm), um corante fluorescente que se intercala entre as bases do DNA e, sob radiação ultravioleta permite a visualização do DNA.

3.6.2. Reação de PCR

A reação de PCR foi dimensionada para volume final de 35 uL contendo tampão de reação 1X, MgCl₂ 1,5 mM, Taq DNA polimerase 1,75U (Invitrogen cat. N° 11615-010), BSA 0,3ug/uL, dNTP 250 uM e 0,2 uM de cada iniciador. Os iniciadores utilizados foram Y1 que está compreendido entre a região 20 a 43 do gene 16S rDNA de *E.Coli* e Y3 (Odee et al. 2002) que corresponde a região 1507 a 1482 do gene 16S rDNA de *E. coli*. A amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 93° C por 5 min seguidos de 35 ciclos de 93°C por 1 min, 62°C por 1 min e 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10 min.

3.6.3. Análise de restrição

A análise de restrição procedeu-se utilizando as endonucleases de restrição *DdeI*, *MspI* e *HinfI*, utilizando 5uL de DNA amplificado seguindo as orientações do fabricante. O DNA digerido foi analisado em gel horizontal a 3% de agarose em tampão TBE 0,5% por 3 horas a voltagem constante de 75 V onde se utilizou nas laterais do gel o marcador de peso molecular ϕ X174 (Invitrogen cat. N° 10488-037). Os fragmentos do DNA digerido foram analisados pelo programa Gel Compar 2.0 *Applied Maths* baseado no coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Nódulos das espécies de mucuna plantados em vasos

Os dados do experimento implantado nas dependências da Embrapa Agrobiologia com três espécies de mucuna foram: número de nódulos e peso de matéria seca da parte aérea.

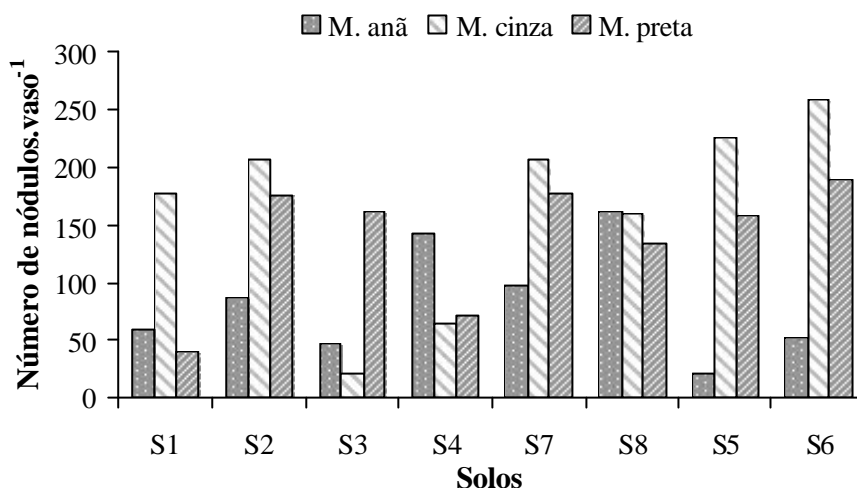


Figura 2. Nodulação de mucuna anã, cinza e preta em solos coletados no SIPA, sendo 1, 2 e 3: Planossolos; 4, 7 e 8: Argissolos Amarelos; 5 e 6: Argissolos Vermelho-Amarelos.

A mucuna anã nodulou mais abundantemente nos solos 4, 7 e 8, da classe Argissolo Amarelo (Figura 2), equivalentes a 24,21; 21,34 e 14,74%, respectivamente. No solo 6 (Argissolo Vermelho-Amarelo) a mucuna cinza obteve o maior valor, com cerca de 20% dos nódulos totais desta espécie, seguido do solo 5, da mesma classe de solo, e equivalente à 15,6%. Estes foram também os maiores valores comparados com as demais espécies, podendo o tipo de solo e o manejo ter influenciado na nodulação de cada espécie de mucuna. Esses resultados corroboram com Aguirre e Valdes (1993) que afirmaram que a ocorrência de resposta variável à infecção de rizóbios em solos de regiões tropicais pode depender da espécie infectada, do tipo de solo e seu uso.

Já a mucuna preta apresentou maior nodulação no solo 6 (17,1%), no solo 2 (16,02%) e no solo 7 (15,84%), das classes de Argissolo Vermelho-Amarelo, Planossolo e Argissolo Amarelo, respectivamente.

A maior média de peso de massa seca (MS) foi observada na mucuna preta do solo 4 (Argissolo Amarelo), com 112 g por planta em solo coletado em área com plantio de adubo verde, com a segunda maior média também da mucuna preta com 100 g por planta no solo 7 (Argissolo Amarelo) em área de plantio direto com berinjela. A mucuna cinza obteve sua maior média no solo 6, com 95g de massa seca por planta. Mulongoy e Akobundu (1990) verificaram elevada produção de massa seca de *Mucuna pruriens* var. *utilis*, podendo chegar a mais de 5 t.ha⁻¹ com a contribuição de N de mais de 100 kg.ha⁻¹.

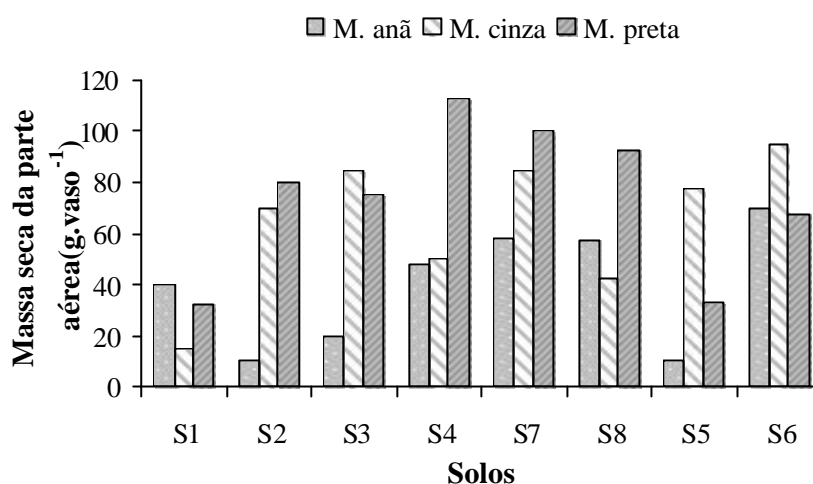


Figura 3. Massa seca da parte aérea de mucuna anã, cinza e preta em solos coletados no SIPA. Sendo: Solos 1, 2 e 3: Planossolos; 4, 7 e 8: Argissolos Amarelos e; 5 e 6: Argissolos Vermelho-Amarelos.

Com relação a mucuna anã o solo 6 obteve maior percentual de massa seca, com 22,34% do total para esta espécie, seguido dos solos 7 e 8 com 18,61 e 18,35%, respectivamente. Já os menores percentuais foram encontrados no solo 2 e 5 com 3,19% para cada, correspondendo a 10g de MS por planta.

A Figura 4 indica o total de nodulação em cada espécie, representado por percentagem, não indicando que o total de nodulação foi semelhante entre espécies. A mucuna preta obteve em Argissolo Vermelho-Amarelo cerca de 40% da nodulação total da espécie em comparação com os demais solos. Enquanto 45% da nodulação total da M. cinza também estão concentrados no Argissolo Vermelho-Amarelo. Estes resultados sugerem que para as espécies mucuna cinza e preta o Argissolo Vermelho-Amarelo proporcionou melhores condições no parâmetro nodulação. Embora o crescimento dos nódulos seja afetado pelo excesso de N, pequenas doses podem estimular tanto o crescimento da planta como aumentar a massa de nódulos produzidos (ARAÚJO & CARVALHO, 2006), como se verificou certa quantidade de nitrogênio no solo (Tabela 5).

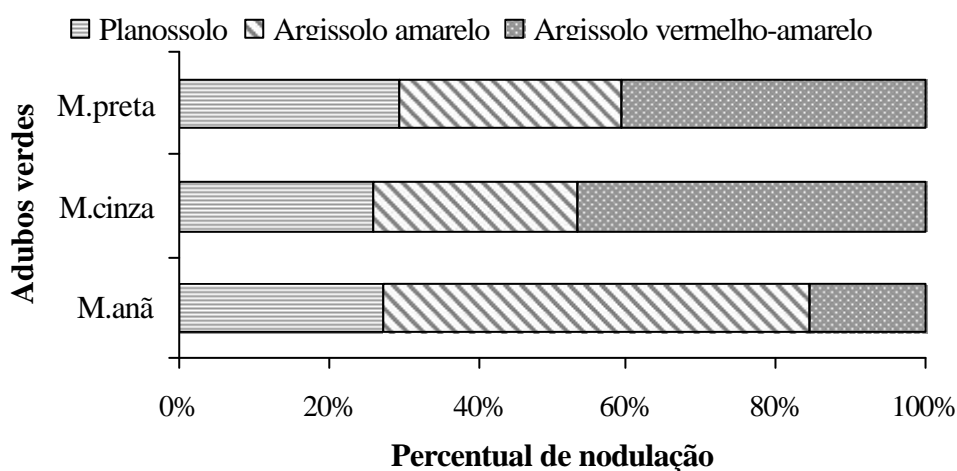


Figura 4. Percentagem de nodulação de Mucuna preta, M. cinza e M. anã, usadas como adubos verdes em diferentes classes de solos.

Já na mucuna anã cerca de 60% dos nódulos são de Argissolo Amarelo, 15% são de Argissolo Vermelho-Amarelo e 25% de solos coletados em área de Planossolo, indicando que o primeiro solo influenciou positivamente na nodulação.

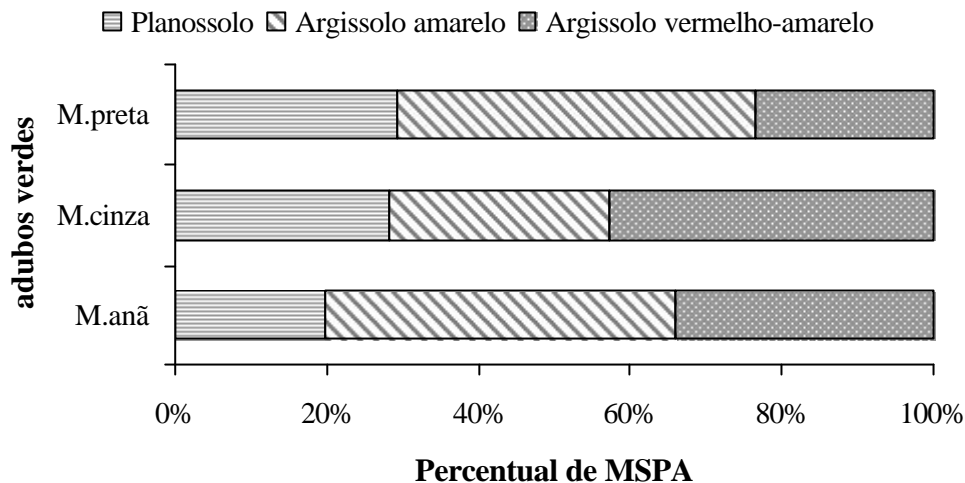


Figura 5. Percentagem de massa seca da parte aérea (MSPA) de Mucuna preta, M. cinza e M. anã, usadas como adubos verdes em diferentes classes de solos.

Em mucuna preta e anã o maior percentual de massa seca da parte aérea foi no Argissolo Amarelo, com 40,10 e 42,31% do total de cada espécie, respectivamente. Na mucuna cinza por sua vez o Argissolo Vermelho-Amarelo obteve o maior percentual de massa seca com mais de 39,24% do total desta espécie (Figura 5). As classes de Argissolo podem estar proporcionando condições mais favoráveis ao desenvolvimento das mucunas confirmadas pelos resultados da análise química (Tabela 5) principalmente do solo 7 (Argissolo Amarelo) com altas quantidades de nutrientes, fornecidos pelo sistema com rotações que permitam plantio direto e, que é o mais equilibrado de todas as áreas coletadas.

4.2. Caracterização Fenotípica

4.2.1. Caracterização fenotípica de mucuna anã

Foi realizada a caracterização fenotípica de 80 isolados de nódulos de mucuna anã, provenientes do experimento em vasos com oito solos da Fazendinha. A tabela com as informações fenotípicas é apresentada no Anexo I.

O dendrograma abaixo (Figura 6) mostra a similaridade entre as bactérias isoladas de nódulos de mucuna anã.

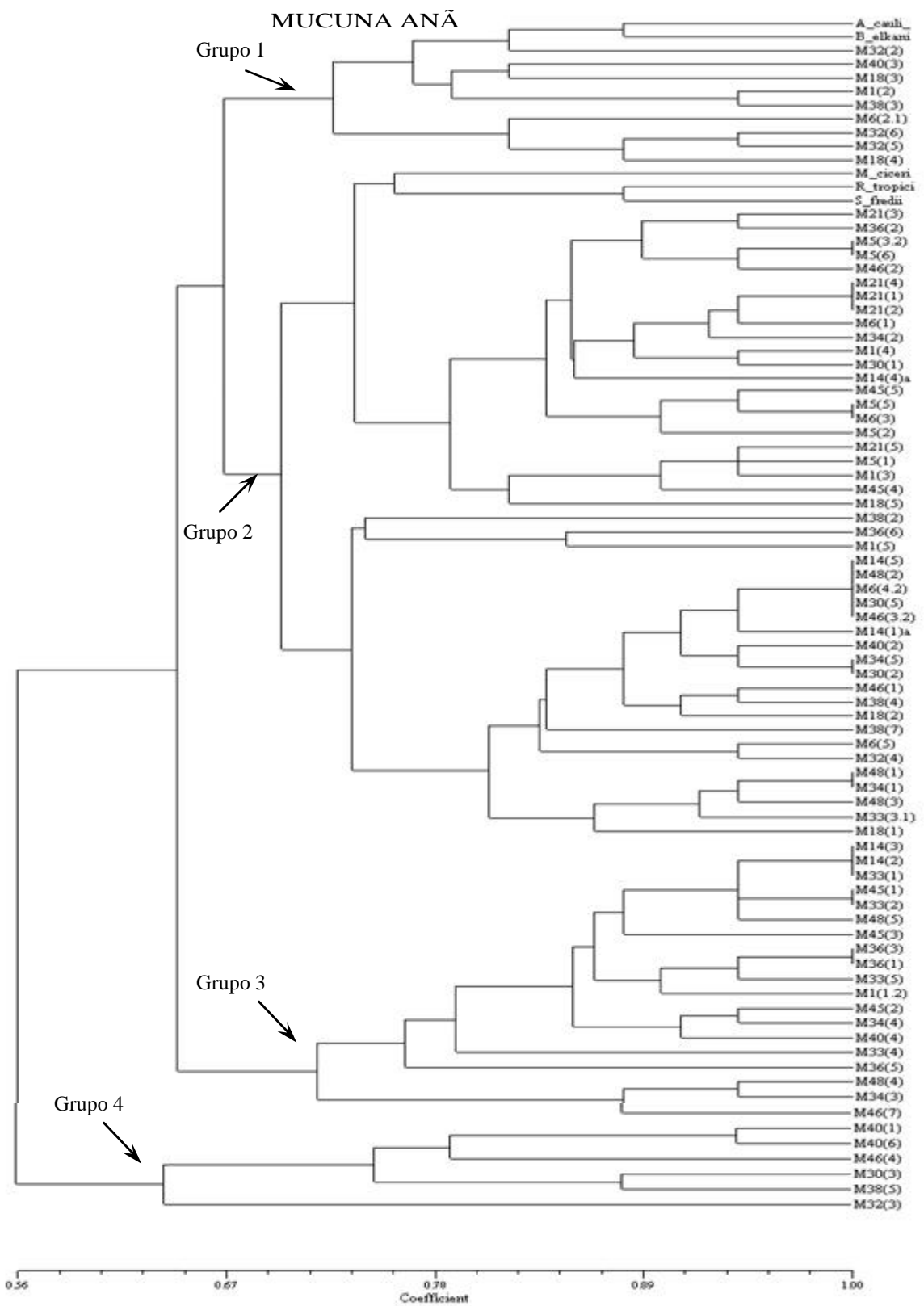


Figura 6. Dendrograma de similaridade com base em características morfológicas de isolados de bactérias que nodulam mucuna anã de solos oriundos do SIPA, pelo coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA.

A partir das informações fenotípicas, foi possível a construção de um dendrograma de similaridade, possibilitando a separação dos isolados em grupos. Foram usadas cinco estirpes padrão para a comparação com as características dos isolados. Em coeficiente de Jaccard de 0,67 obteve-se a divisão em quatro grupos, podendo-se observar grupos bastante distintos (Figura 6).

Entre as características mais relevantes destacam-se o pH e o tempo de crescimento. Em relação ao pH, 84,81% das bactérias acidificam o meio de cultura, enquanto que 15,19% alcalinizaram. A mudança de pH em meio de cultura YMA é, comumente, consistente dentro dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, que apresentam a característica de acidificar o meio de cultura. Enquanto *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* alcalinizam o meio YMA (COUTINHO et al., 2000). Em relação ao tempo de crescimento, 86,08% dos isolados tiveram crescimento rápido e 13,92% crescimento lento. Em solos tropicais sob diferentes manejos, bactérias isoladas de guandu apresentam a característica de crescer rapidamente e acidificar o pH do meio de cultura (FERNANDES JÚNIOR et al, 2008). Bactérias isoladas de amendoim crescido em solos da região nordeste do Brasil também apresentaram grande percentual de bactérias de crescimento ácido e rápido (SANTOS et al., 2007). Bactérias isoladas de solos tropicais utilizando plantas isca como guandu (COUTINHO et al., 1999), feijão-caupi (MARTINS et al., 2003), soja (NICOLÁS et al., 2000), feijão comum (HUNGRIA et al., 2000; GRANGE e HUNGRIA, 2004) e siratro (JESUS et al., 2007) também apresentaram crescimento rápido e capacidade de acidificar o meio de cultura.

Tabela 7. Parâmetros de separação dos grupos no dendrograma de *Mucuna* anã.

Grupos morfológicos	Características do grupo	Características do grupo	Características do grupo
GRUPO 1	Crescimento lento; pH alcalino; Aparência do muco homogêneo.	1.1-Forma circular 1.2-Forma irregular	
GRUPO 2	Crescimento rápido pH ácido; Aparência do muco homogêneo.	2.1-Elevação lente 2.2-Elevação plana	2.1.1-Cor amarela 2.1.2-Cor branca 2.2.1-Borda Recortada 2.2.2-Borda inteira
GRUPO 3	Crescimento rápido pH ácido; Aparência do muco homogêneo.	3.1-Forma circular; elevação lente e convexa. 3.2-Forma irregular; elevação plana.	
GRUPO 4	Crescimento lento; pH alcalino; Aparência do muco heterogêneo.	4.1-Borda inteira 4.2-Borda Recortada	

Segundo Norris (1965) bactérias isoladas de solos alcalinos excretam substâncias que acidificam o meio, sendo uma vantagem competitiva para o rizóbio no solo de origem. Chao e Alexander (1982) afirmam que a sobrevivência das bactérias noduladoras dependem do pH do solo. Confirmando os resultados de fertilidade dos solos utilizados neste trabalho, em que o pH ficou em média 6,0, e solo considerado propício para o crescimento de bactérias ácidas.

Do total de isolados, 83,54% apresentaram forma da colônia circular (figura 6) O tamanho das colônias variou entre <1mm (puntiformes) e 11mm, sendo uma característica importante para o agrupamento dos isolados e, para Herridge & Roughley (1975) e Martins (1997) as menores colônias principalmente as puntiformes foram mais eficientes.

As estirpes padrão *Bradyrhizobium* e o *Allorizobium* apresentaram similaridade em torno de 0,81 com o isolado M32(2). Enquanto o *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*

tiveram similaridade de 0,74 com os isolados do grupo 2 (Figura 6). O grupo 1 apresentou 50% dos isolados oriundos do Planossolo e o grupo 4 apresentou 85,33%, já os demais grupos apresentaram-se dispersos nas classes de solo.

As características que mais contribuíram para a separação em grupos foi o tempo de crescimento e o pH do meio de cultura que variaram dando origem a diversos grupos.

4.2.2. Caracterização fenotípica em mucuna cinza

Os isolados foram divididos em cinco grupos de acordo com a similaridade apresentada, em que a divisão dos grupos ocorreu em 0,76 do coeficiente de Jaccard.

Dentre os isolados 73,75% apresentaram tempo de crescimento rápido e 23,25% lento. Segundo Sprent (1994) bactérias de crescimento rápido são comuns em regiões áridas, devido ao fato de priorizarem a sobrevivência e não a fixação do nitrogênio. Esta região tropical pode estar propiciando condições favoráveis para a seleção destas bactérias.

Isolados de rizóbio de feijão-caupi são mais comuns em regiões tropicais e são em sua maioria de crescimento lento, no entanto observou-se também a presença de bactérias de crescimento rápido nodulando feijão-caupi (MARTINS et al,1997). Resultados diferentes dos encontrados neste trabalho no SIPA, com as bactérias isoladas de mucuna em que a maioria foi de crescimento rápido.

Do total de isolados 71,25% acidificaram o meio e 28,75% alcalinizaram. As características morfológicas de rizóbio fornecem importantes informações para sua identificação e agrupamento, destacando-se, entre várias outras características o tempo de crescimento e a reação de pH em meio de cultura (STOWERS & ELKAN, 1984).

Como característica em destaque também está a forma da colônia, com 76,25% circulares, 46% dos isolados são translúcidos, em relação à elevação, 47,5% apresentam elevação plana e 40% lente, 73,75% apresentam a cor branca. Sendo estas as características de maior destaque na morfologia dos isolados.

Na mucuna cinza, do total de isolados do Argissolo Amarelo 80% apresentaram crescimento rápido e 76% dos isolados alcalinizaram o meio. Como característica importante mostrou-se o tamanho da colônia com 53,33% dos isolados do Argissolo Amarelo apresentando tamanho < 5 mm.

No Planossolo 66,33% dos isolados de mucuna cinza apresentaram pH ácido e 70% crescimento rápido, os isolados com tamanho entre 1 e 4 mm equivaleram a 63,33% do total nesta classe de solo. Dos isolados deste solo 73,33% são circulares e 83,33% apresentam a cor branca.

No Argissolo Vermelho-Amarelo 70% dos isolados de mucuna cinza apresentaram crescimento rápido e pH ácido, 75% com forma circular, 50% com elevação plana, 50% com tamanho entre 1 e 4 mm e 100% com aparência do muco homogênea.

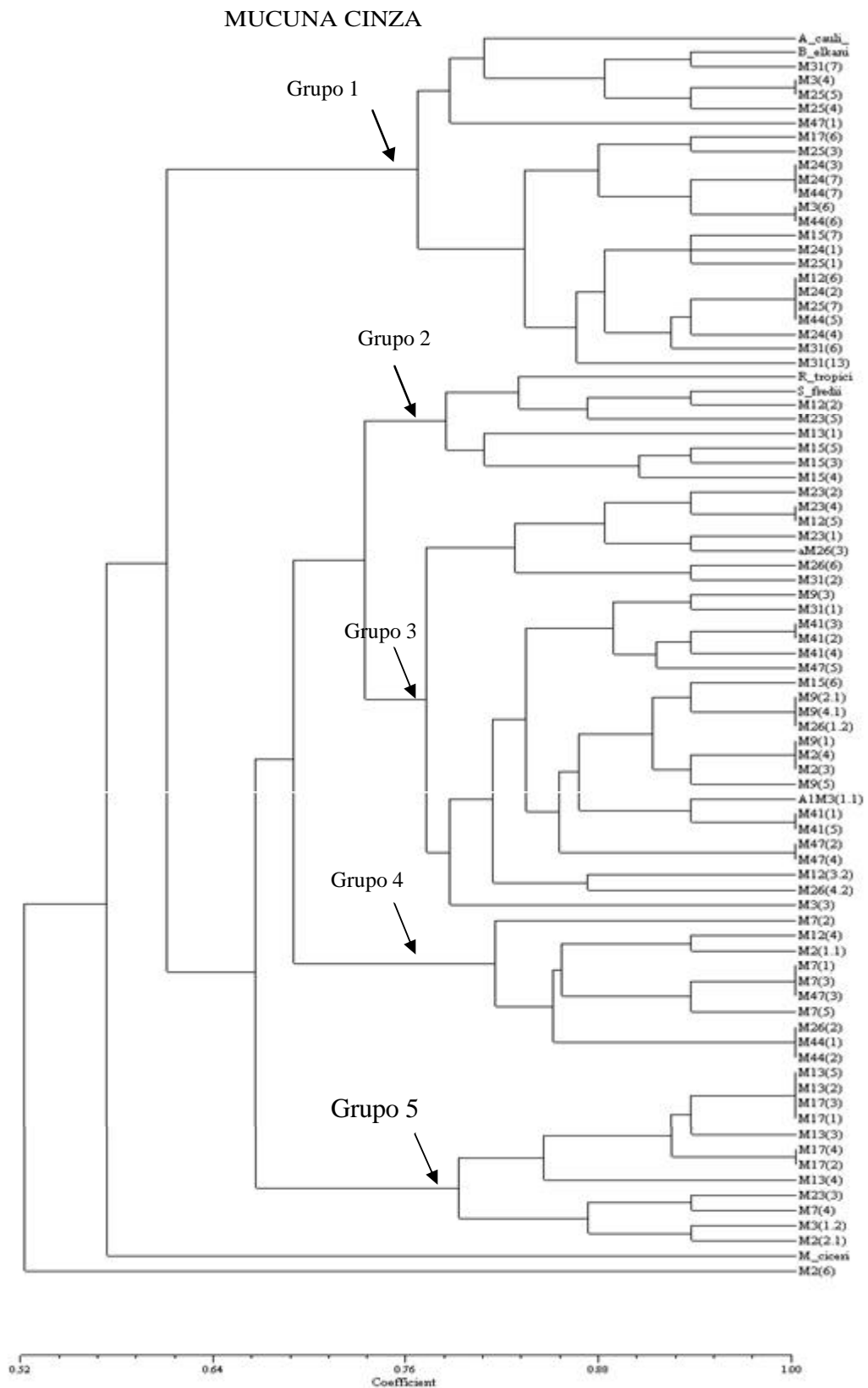


Figura 7. Dendrograma de similaridade com base em características morfológicas de isolados de bactérias que nodulam mucuna cinza de solos oriundos do SIPA, pelo coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA.

Tabela 8. Parâmetros de separação dos grupos no dendrograma de mucuna cinza.

GRUPO 1	Lento; básico;	1.1-convexo 1.2-lente	1.2.1-circular 1.2.2-irregular		
GRUPO 2	Crescimento rápido; pH ácido; ap. colônia HO; Elasticidade 1 ; não limpa placa.	2.1-Convexa; 2.2-plana			
GRUPO 3	Crescimento rápido; pH ácido; ap. colônia HO; Elasticidade 1; limpa placa.	3.1 - Cor branca 3.2-Cor branca com centro amarelado	3.1.1.- Transparente. 3.1.2-opaca 3.2.1-Circular 3.2.2-irregular	Tamanho < 4 mm Tamanho > 4 mm	Tamanho < 1mm Tamanho > 1mm
GRUPO 4	Crescimento rápido; pH ácido; ap. colônia HO; Elasticidade 2; branca e translúcida.	4.1-Irregular; plana 4.2-Circular; plana 4.3-Irregular; lente			
GRUPO 5	Crescimento rápido; pH ácido; ap. colônia HE;	5.1-Não limpa placa 5.2-Limpa placa	5.1.1-Lente 5.1.2-plana 5.2.1- Translúcida 5.2.2-opaca		

A distância morfológica em relação aos padrões indica a possibilidade de ser padrões não descritos no trabalho ou ainda de novas espécies.

4.2.3. Caracterização fenotípica em mucuna preta

A partir da caracterização de bactérias isoladas de nódulos de mucuna preta, foi possível a formação de cinco grupos de acordo com as similaridades e as diferenças apresentadas.

Diante das características observadas, foi possível separar em quatro grupos nos pontos entre 0,68 e 0,79 de similaridade do coeficiente de Jaccard. Na mucuna preta ao contrário das demais espécies, o pH e o tempo de crescimento não foram fatores para formação de grupos, em razão de todos os isolados serem de crescimento rápido e pH ácido. Nesta espécie destacaram-se como parâmetros para a formação de grupos a forma, a elevação e a cor. A ocorrência de bactérias de crescimento lento em regiões tropicais, é mais frequente (MARTINS et al, 1997) diferentemente dos resultados encontrados nos solos do SIPA na espécie de mucuna preta que 100% das bactérias foram rápidas.

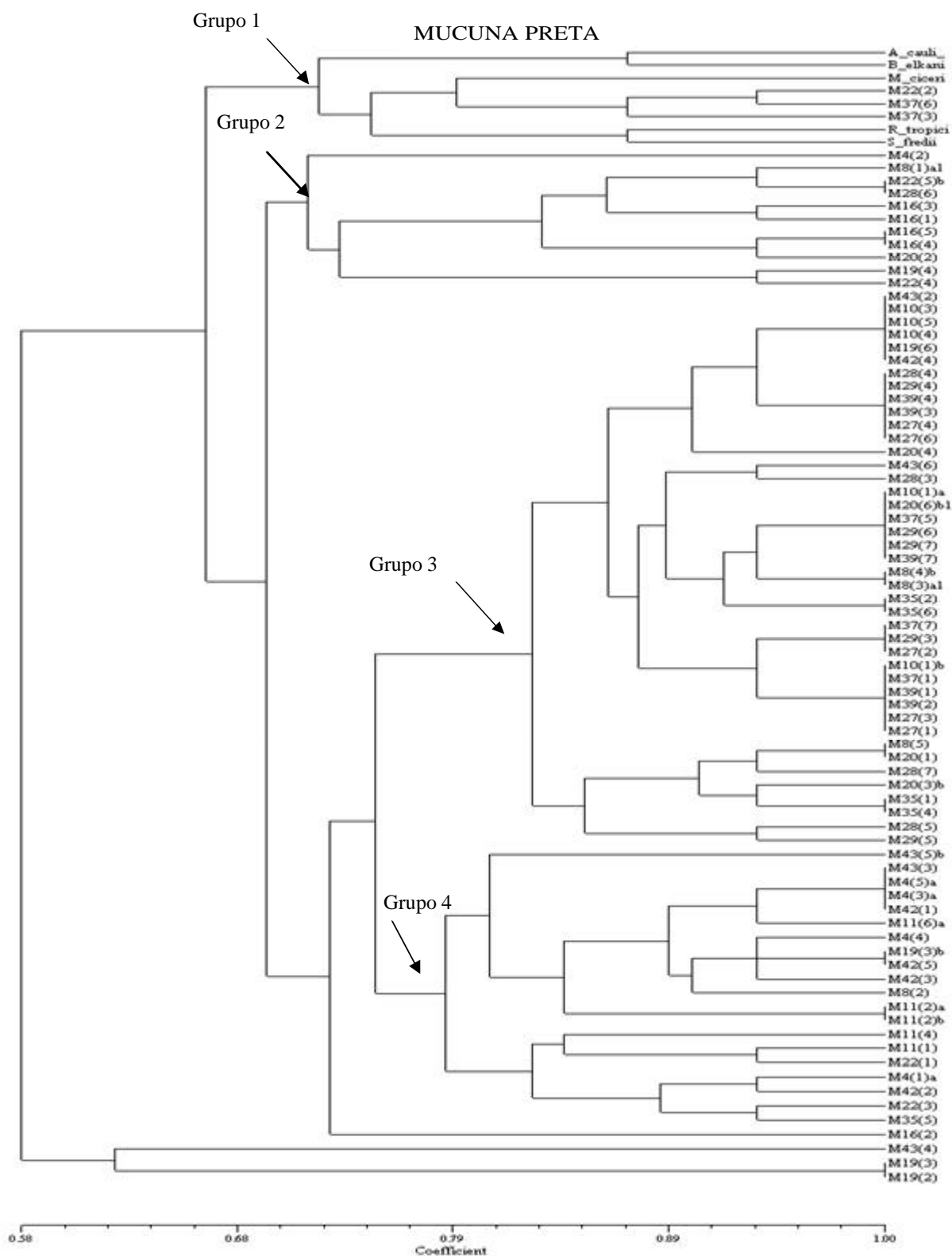


Figura 8. Dendrograma de similaridade com base em características morfológicas de isolados de bactérias que nodulam mucuna preta de solos oriundos do SIPA, pelo coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA

Para a mucuna preta, 92,50% dos isolados caracterizados tiveram a forma circular e 7,5% irregular, 53,75% tiveram elevação plana e 27,5% convexa, enquanto 87,5% dos isolados apresentaram borda da colônia inteira e 16,25% apresentaram a borda recortada. Corroborando com Martins et al (1997) que afirmaram que estirpes de rizóbio independente da forma da colônia, possuem a borda lisa ou inteira. No parâmetro transparência 61,25 do total de isolados foram opacas e 38,75% foram translúcidas, encontrando resultados semelhantes aos de Martins et al (1995), 75,25% apresentaram aparência da colônia homogênea (HO), enquanto que 23,75 foram heterogêneas.

Foram observados apenas 3,75% dos isolados com cor branca da colônia e com borda transparente, 76,25% branco e 20% Amarelo. A morfologia da colônia é muito útil na determinação da eficiência simbiótica das estirpes de Bradyrhizóbium (FUHRMANN, 1990) Apenas 15% dos isolados tiveram aparência do muco homogênea os outros 85% foram heterogêneos, sendo que as características citadas acima tiveram importância fundamental na formação dos grupos.

Tabela 9: Parâmetros de separação dos grupos no dendrograma de Mucuna preta.

GRUPO 1	Elevação convexa; cor branca.	Padrão, amarelo Branco; tamanho > 5 mm. Amarelo; tamanho <5 mm.		
GRUPO 2	lente	Opaca e plana Lente Translúcida; convexa		
GRUPO 3	Translúcida e plana	Recortada inteiro	Cor amarela Cor branca	Tamanho <1 Tamanho >1 inteiro Recortada
GRUPO 4	Opaca	convexo Lente e plana	irregular circular Lente Plana	

No primeiro grupo todos os isolados foram oriundos da classe de Planossolo e agruparam-se com as cinco estirpes usadas como padrão. Nesta classe 96,33% tiveram forma circular, 76,67% apresentaram a cor branca e 53,33% com tamanho <4mm. Dos Isolados obtidos de Argissolo Amarelo 66,33% tiveram tamanho < 4mm e, 60% de cor amarela. Já no Argissolo Vermelho-Amarelo 50% são de cor branca e somente 16,67 são irregulares enquanto que 83,33% foram circulares.

4.3. Diversidade Morfológica de i solados de Rizóbio

As 240 bactérias caracterizadas morfológicamente foram usadas para os índices de Shannon-Weaver, abundância de Simpsons e riqueza de Margalef, índices estes que permitem comparar amostras com diferentes tamanhos de populações (ODUM, 1988).

Tabela 10. Diversidade, abundância e riqueza de rizóbios em solos do Sistema Integrado de Produção Agroecológica.

Solos	Shannon-Weaver	Simpson	Margalef
Solo 1	3,83	0,08	4,66
Solo 2	4,22	0,06	5,88
Solo 3	3,65	0,10	4,37
Solo 4	4,25	0,06	5,94
Solo 5	3,73	0,08	4,70
Solo 6	4,23	0,05	6,47
Solo 7	3,78	0,08	5,00
Solo 8	3,81	0,07	5,05

O solo 4 (tabela 9) com rotação crotalária guandu proporcionou maior diversidade dentre as bactérias caracterizadas morfológicamente, seguido do solo 6 com plantio de milho em que a cultura anterior foi a mucuna. O solo 3, em que a cultura anterior foi crotalária, foi o menos diverso e o mais abundante. Este fato pode ter ocorrido devido ao solo estar atualmente desnudo, podendo estar passando por estresse o que causou a alta abundância constatada pelo índice de Simpson. Enquanto que o menos abundante foi o solo 6 e que foi o segundo mais diverso indicado pelo índice de Shannon-Weaver.

Avaliando a estrutura das comunidades rizobianas através do cálculo de índices ecológicos, Jesus et al. (2007) demonstraram que o manejo da terra pode apresentar influência nas comunidades de bactérias capazes de nodular siratro em três sistemas de manejo na Amazônia. Outros estudos também revelaram que a diversidade e abundância de rizóbios nodulando feijão-caupi em solos de cerrado também podem ser influenciadas pelo sistema de manejo (ZILLI, 2001). Em, todos os solos utilizados neste estudo, a abundância dos grupos foi baixa, indicando a equitabilidade entre os grupos morfológicos (taxonômicos). Assim como a dominância, a diversidade das bactérias nodulantes de mucuna também foi muito elevada nos oito solos. Fernandes Júnior et al. (2008) também encontraram elevada diversidade e baixa dominância em solos sob manejo orgânico.

A elevada diversidade e equitabilidade das comunidades rizobianas encontradas neste estudo corroboram a elevada biodiversidade em agroecossistemas sob manejo orgânico.

4.4. Teste de nodulação

4.4.1. Teste de nodulação em mucuna anã.

O teste de nodulação foi feito com o objetivo de verificar quais das bactérias isoladas foram capazes de nodular seus hospedeiros de origem. Os dados do teste de nodulação foram submetidos à estatística, mas somente número de nódulos foi significativo ao teste de Scott-knott em nível de 5% de significância. Diante disso, a pré-seleção dos cinco melhores isolados foi baseada na massa seca de nódulos e na matéria seca da parte aérea que obteve correlação de ($r = 0,98^*$).

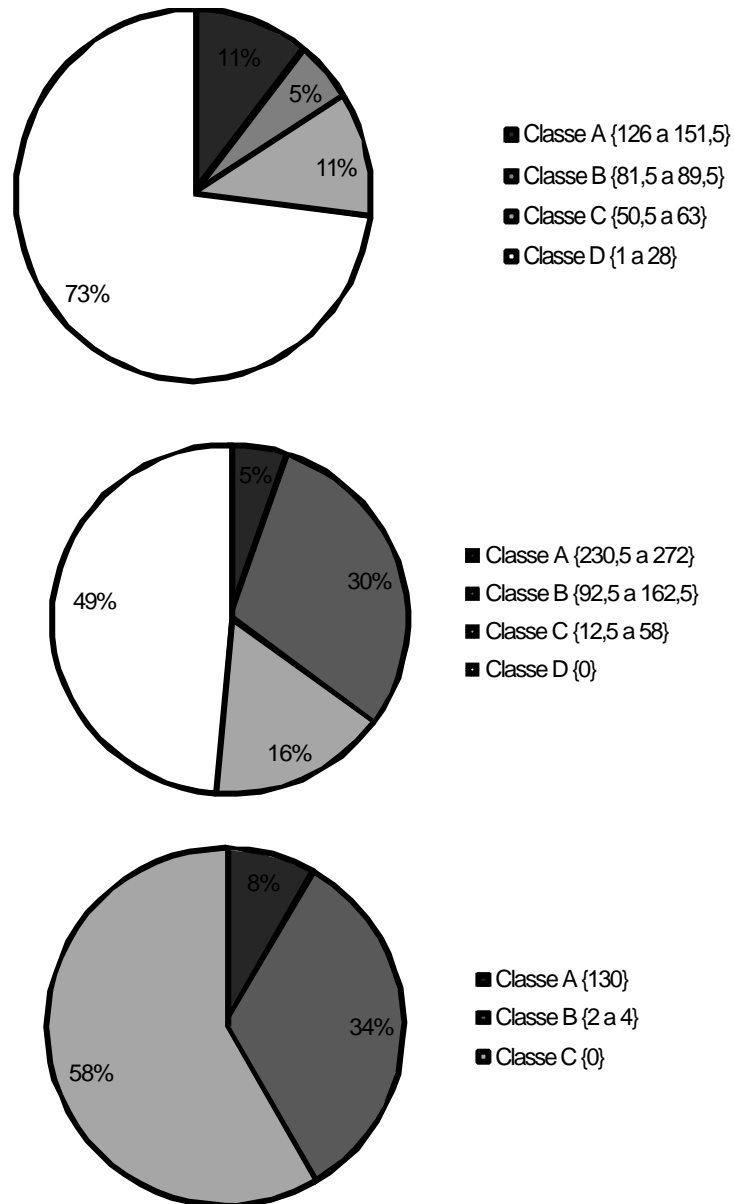


Figura 9. Número de isolados de mucuna anã, distribuídos em classes em função de diferença estatística na variável número de nódulos em teste de Scott-knott em nível de significância de 0,05. A sequência de gráficos refere-se a primeira, segunda e terceira etapas dos experimentos de nodulação com mucuna anã. Os números dentro dos colchetes { } referem-se ao número de nódulos.

A distribuição em classes (Figura 9) foi a forma mais didática para a separação dos 80 isolados. A Classe A refere-se aos maiores valores significativos seguidos pela B, nestas duas classes estão inclusos os cinco melhores isolados que foram submetidos ao teste de eficiência, sendo três isolados pré-selecionados na primeira etapa e dois na segunda.

Segundo García-de los Santos et al (1996) isolados de crescimento rápido que não nodularam podem ter perdido material genético envolvido no processo de nodulação, isto pode ter ocorrido na fase de isolamento em laboratório, justificando os 29% de bactérias totais que não nodularam com resultados semelhantes aos de Zilli (2001). O número de nódulos por apresentar diferença significativa foi usado como parâmetro para a formação das classes.

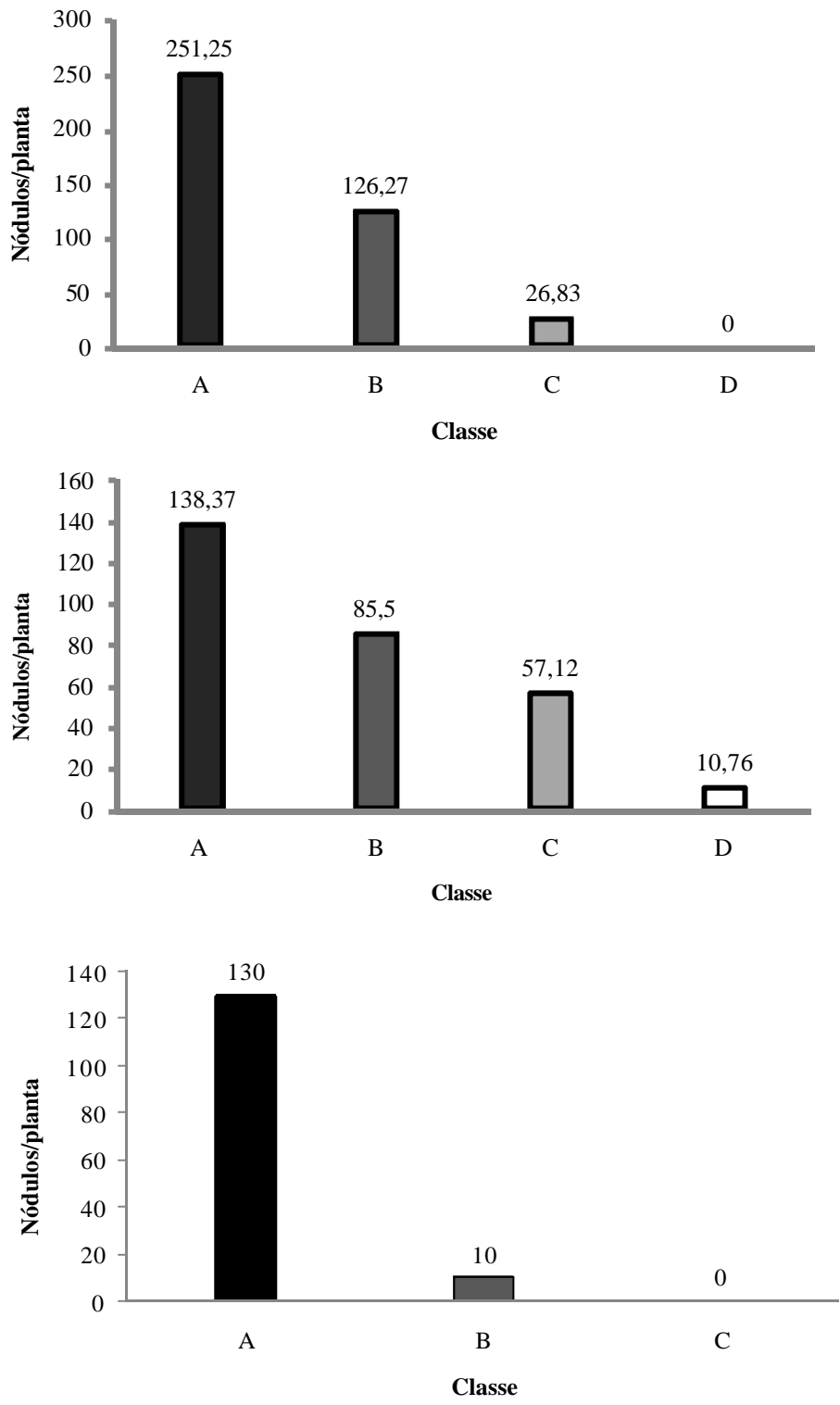


Figura 10. Número de nódulos em 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna anã. A sequência de gráficos refere-se a primeira, segunda e terceira etapas dos experimentos de nodulação com mucuna anã.

Como comentado anteriormente, a divisão em classes foi baseada na variável NN, apesar da escolha dos isolados mais eficientes do teste ser baseado na MSPA e MSN.

A média da classe A foi de 251,25, 138,37 e 130 nódulos na primeira, segunda e terceira etapa do experimento respectivamente, sendo que o número de nódulos nem sempre tem correlação com eficiência, que geralmente são baseados na MSN e MSPA além do Ntotal

que não foi analisado neste teste. A classe D na primeira e segunda etapa e classe C na terceira condizem aos isolados que não apresentaram nodulação. Os isolados pré-selecionados condizem as classes A e B nas duas primeiras etapas. A nodulação depende de fatores ambientais, de solo e da simbiose rizóbio-planta (ZILLI, 2001).

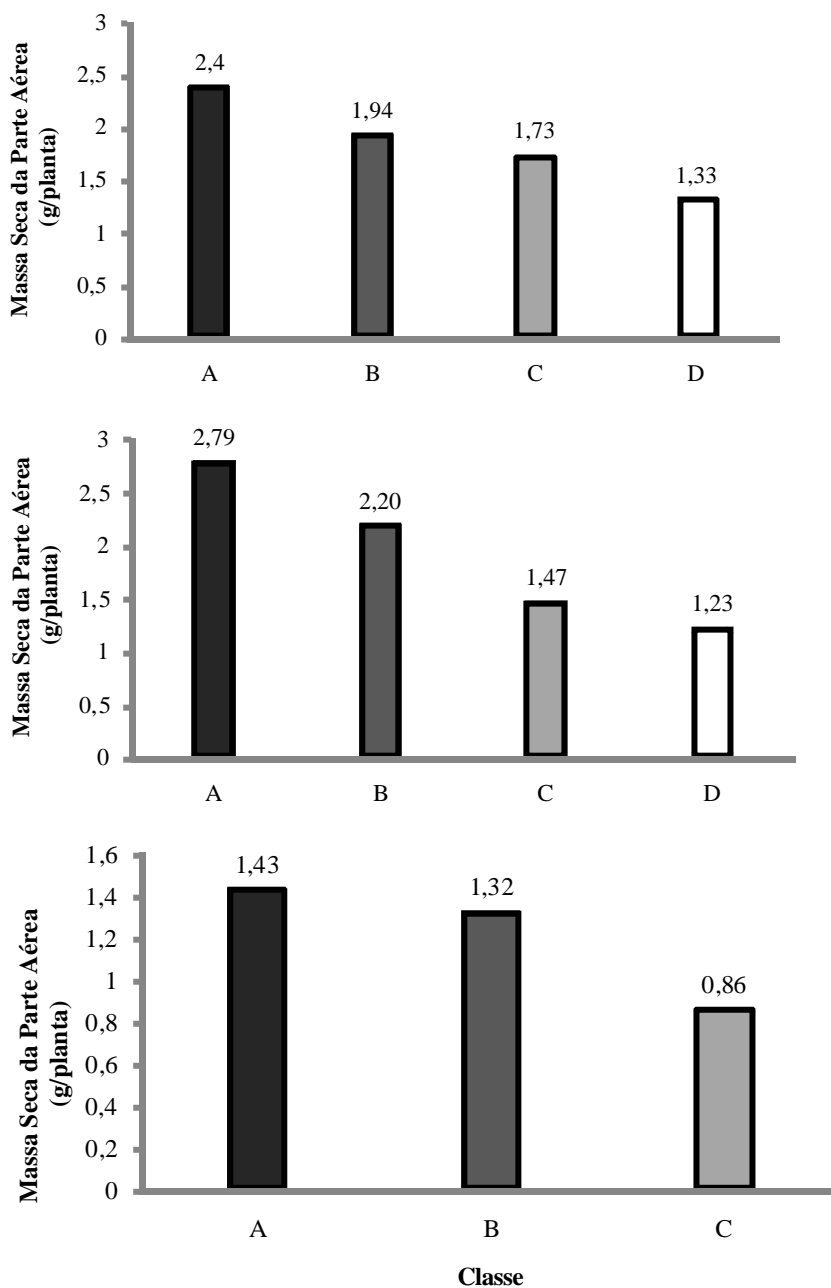


Figura 11. Matéria seca da parte aérea de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna anã em casa de vegetação. A sequência de gráficos refere-se a primeira, segunda e terceira etapas dos experimentos de nodulação com mucuna anã.

A maior média de MSPA foi verificada na classe A sendo proporcional à nodulação. A diferença de MSPA não tem relevância nas classes C e D. A variável matéria seca é um forte indicativo da fixação biológica em leguminosas e neste caso específico da mucuna anã, espécie utilizada para fins de adubo verde. Dobereiner (1966) concluiu que há alta correlação entre a MSPA, MSN e a fixação biológica de nitrogênio.

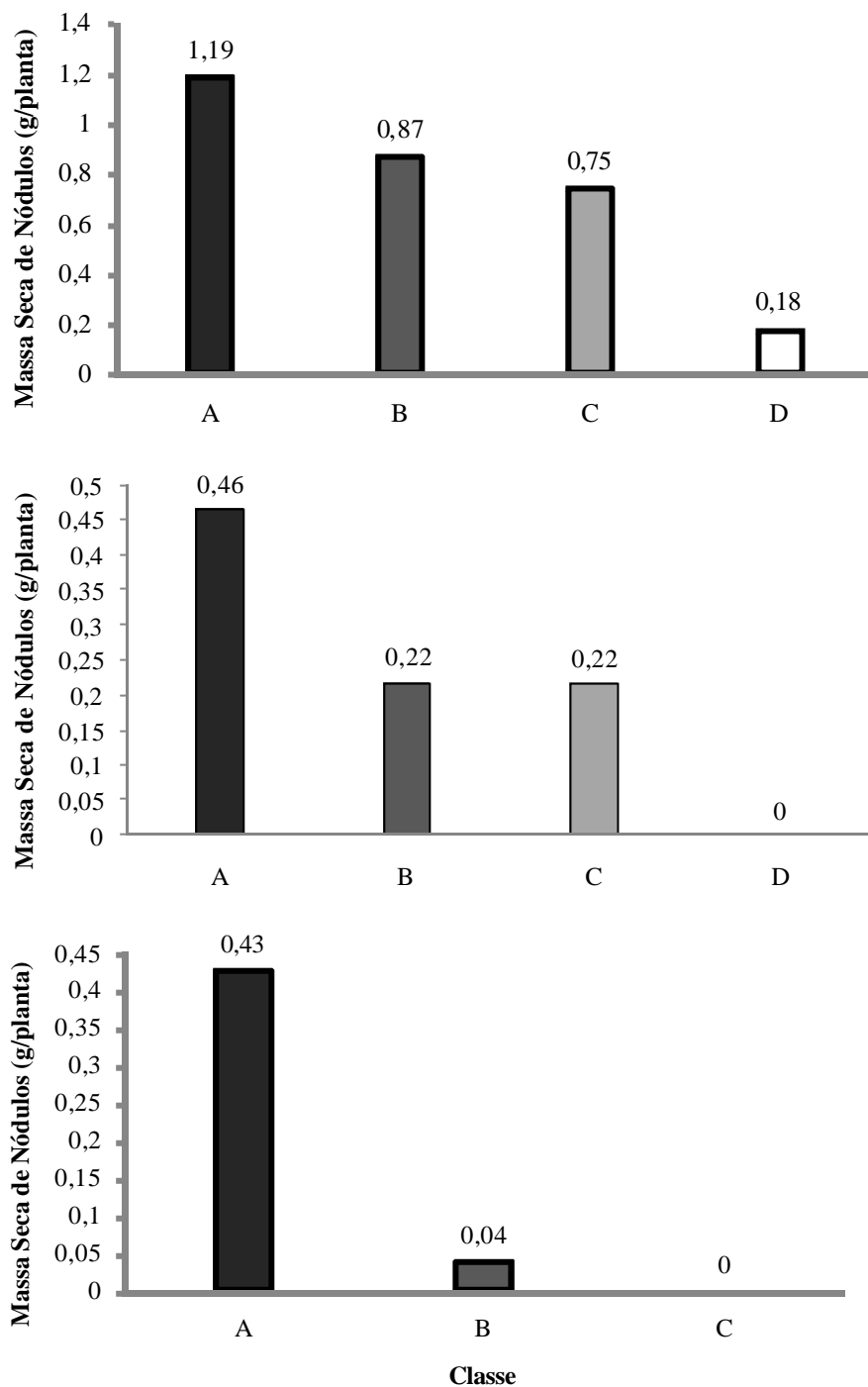


Figura 12. Matéria seca da parte aérea de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna anã em casa de vegetação. A sequência de gráficos refere-se a primeira, segunda e terceira etapas dos experimentos de nodulação com mucuna anã.

Na primeira etapa a média da classe A (1,19g/planta) está em torno de 7 vezes maior que a D (0,18), sendo uma variável essencial para a indicação da presença ou não de bactérias eficientes na fixação biológica do nitrogênio, que juntamente com os dados de matéria seca da parte aérea são positivamente correlacionadas com N fixado (DOBEREINER, 1966). Na segunda etapa a classe A obteve 0,46g/planta enquanto as classes B e C obtiveram média iguais com 0,22g/planta, verificando pouca correlação entre a massa de nódulos e o número de nódulos (variável que originou a divisão em classes).

Tabela 11. Média das variáveis avaliadas (número de nódulos, matéria seca de nódulos e matéria seca da parte aérea) em teste de nodulação dos cinco isolados pré-selecionados para teste de eficiência.

Isolado	Número de Nódulos	Matéria seca de Nódulos (g)	Matéria seca da parte aérea(g)
M38(2)	163	0,3190	2,635
M30(3)	189	0,2025	4,500
M6(2-1)	152	0,3150	2,520
M6(4-2)	139	0,3800	2,805
M6(5)	138	0,2860	3,500

O entendimento dos fatores que influenciam positivo ou negativamente a eficiência da bactéria isolada faz-se necessária, para a busca de estirpes adaptadas a fatores bióticos e abióticos adversos (MARTINS,1995; MARTINS, 1997)

A Tabela 11 mostra as melhores médias de matéria seca de nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) que foram usadas para avaliar os pré-selecionados para o teste de eficiência. O número de nódulos (NN) não foi usado para a seleção, porque somente está mostrando a quantidade de nódulos na planta. As características das bactérias têm grande importância na interpretação dos resultados quanto à nodulação, que pode ser juntamente com a fixação biológica do nitrogênio ser influenciadas por vários fatores: temperatura, condições de solo, como acidez, deficiência de umidade, deficiência de nutrientes, excesso de nitrogênio, estirpes nativas pouco eficientes (VIEIRA, 1999).

Tabela 12. Características das bactérias que apresentaram as melhores médias de MSN e MSPA em teste de nodulação em mucuna anã.

Isolado	Solo	Classe de solo	Tempo de Crescimento	pH
M38(2)	3	Planossolo	Rápido	ácido
M30(3)	4	Argissolo Amarelo	Lento	alcalino
M6(2-1)	5	Argissolo Vermelho-Amarelo	Rápido	alcalino
M6(4-2)	5	Argissolo Vermelho-Amarelo	Rápido	ácido
M6(5)	5	Argissolo Vermelho-Amarelo	Rápido	ácido

Vários autores comentam a influência do tipo de solo na nodulação, e sobrevivência de rizóbios e sua eficiência e adaptação no ambiente. De acordo com Herridge et al. (2008), a proporção média de N derivado da FBN nas principais espécies leguminosas varia de 40 a 75% e a quantidade de nitrogênio fixado por leguminosas varia em função das espécies utilizadas e das condições de clima e de solo, em alguns casos, essa quantidade pode chegar a mais de 100 kg de N/ha (DERPSCH et al., 1991) como no caso das espécies de mucunas estudadas.

Os isolados que obtiveram melhores resultados no teste de nodulação foram submetidos à teste de eficiência (Tabela 11), destacando-se pela maior média em todos os parâmetros estudados. Sendo estes obtidos de nódulos da mesma planta cultivada em Argissolo Vermelho-Amarelo em sua maioria.

4.4.2. Teste de nodulação em mucuna cinza

Uma das razões do uso da mucuna cinza foi pelo seu histórico de contribuição seja em forma de N seja pela adição de matéria orgânica no solo, além de outros fatores físicos, químicos e biológicos que favorecem ao solo (SILVA et al, 2007).

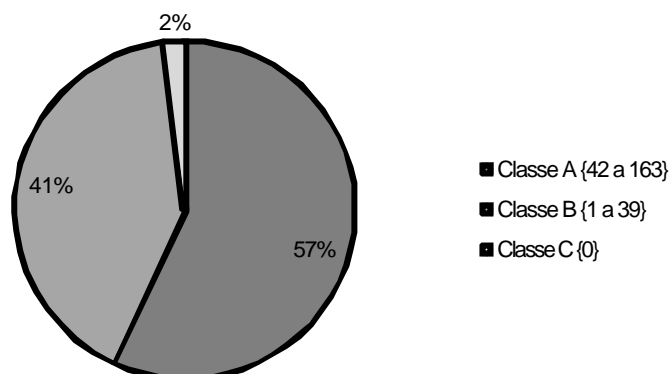


Figura 13. Número de isolados de mucuna cinza, distribuídos em classes em função de diferença estatística em teste de Scott-knott a nível de significância de 0,05.

Não houve diferença estatística nos parâmetros MSN e MSPA quando testados em casa de vegetação sob temperatura controlada em teste de nodulação. A única variável que apresentou diferença nos 80 isolados foi o NN, como explicado anteriormente não foi determinante na escolha dos isolados.

Nesta espécie de adubo verde somente 2% dos isolados não nodularam fazendo parte da classe C. O porte da mucuna cinza foi superior às demais espécies no teste de nodulação e, neste caso com maior produção de matéria seca.

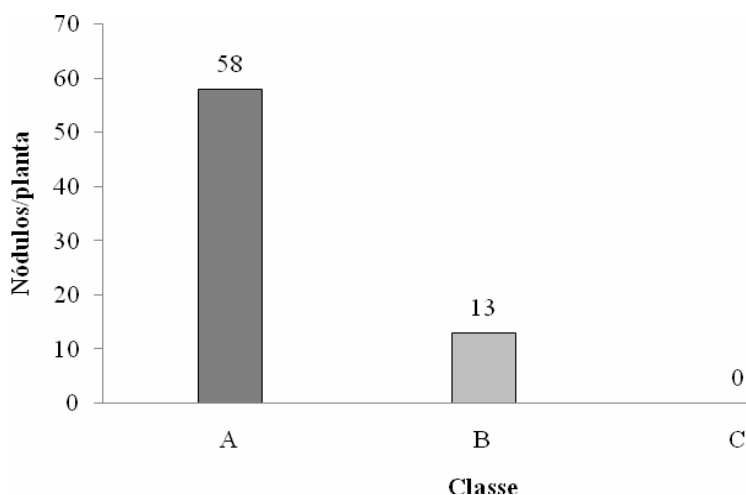


Figura 14. Número de nódulos em 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna cinza.

A divisão em três classes apresentou a classe C com valor médio de zero (0) nódulos, B com 13 e a classe A com média de 58 nódulos por planta. A pequena quantidade de nódulos não afeta necessariamente a sua produção desde que a massa nodular não seja diretamente proporcional ao número de nódulos.

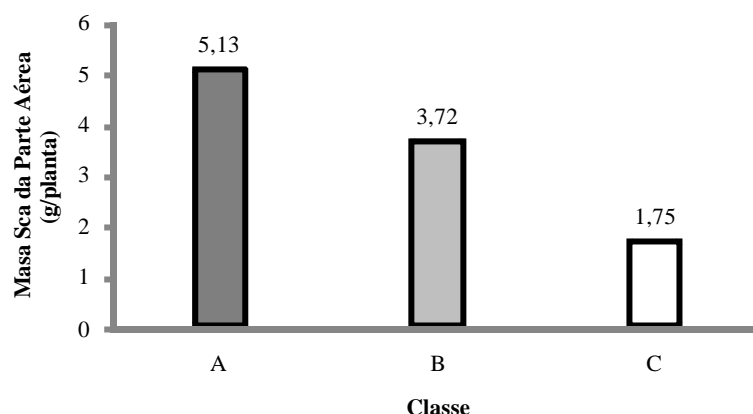


Figura 15. Matéria seca da parte aérea de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna cinza em casa de vegetação.

A produção de matéria seca em casa de vegetação divididas em classes atingiu médias de 5,13g por planta resultados semelhantes à produção de matéria seca por feijão caupi em experimentos de Zilli (2001), que atingiu pouco mais de 6g. planta⁻¹.vaso⁻¹. A classe b também atingiu boa produção de MSPA com média de 3,72.g.planta⁻¹.vaso⁻¹. Essa espécie de mucuna, em experimentos em vasos com solo, no início dos trabalhos, obteve a produção superior a 100g de MSPA. Portanto verifica-se a contribuição dos rizóbios na produção de leguminosas que é fundamental, além dos benefícios ao meio ambiente.

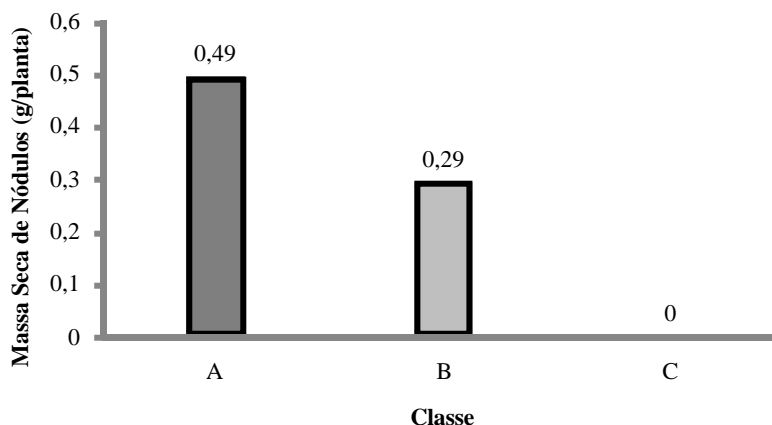


Figura 16. Matéria seca de nódulos de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna cinza em casa de vegetação.

A Figura 16 mostra as classes na produção de massa nodular e, percebe-se que a classe A apresenta média de 0,49 g.planta⁻¹.vaso⁻¹, sendo superior às classes B com média de 0,29g e C zero grama.

As médias de matéria seca da parte aérea dos cinco isolados pré-selecionados de mucuna cinza foram superiores à média das classes, sendo que esta pode subestimar os reais valores. A maior média foi 8,01g de mucuna inoculada com o isolado M15(6) (Tabela 12) valor este 2,88g maior que a média da classe a desta espécie. E superior também ao valor encontrado por Zilli (2001).

Tabela 13. Média das variáveis avaliadas (número de nódulos, matéria seca de nódulos e matéria seca da parte aérea) em teste de nodulação dos cinco isolados pré-selecionados para teste de eficiência.

Isolado	Número de nódulos	Matéria seca de nódulos (g)	Matéria seca da parte aérea (g)
M41(3)	49	0,725	7,98
M3(6)	73	0,746	7,45
M25(3)	128	0,889	7,168
M15(6)	40	0,736	8,01
M47(1)	61,5	0,9175	7,44

Tabela 14. Características culturais e de solo das bactérias que apresentaram as melhores médias de MSN e MSPA em teste de nodulação em mucuna cinza.

Isolado	Solo	Classe de solo	tempo de crescimento	pH
M41(3)	5	Argissolo Vermelho-Amarelo	rápido	ácido
M3(6)	4	Argissolo Amarelo	lento	alcalino
M25(3)	5	Argissolo Vermelho-Amarelo	lento	alcalino
M15(6)	8	Argissolo Amarelo	rápido	ácido
M47(1)	4	Argissolo Amarelo	rápido	alcalino

Com a predominância dos isolados nos solos da classe Argissolos percebe-se a influência que o solo exerce no desenvolvimento das plantas e sobrevivência das bactérias do solo assim também da sua ação no ambiente.

4.4.3. Teste de nodulação em mucuna preta

No teste de nodulação de mucuna preta não houve diferença nos parâmetros MSN e MSPA quando testados em casa de vegetação. Nesta espécie o parâmetro que apresentou diferença foi o NN a exemplo das espécies anã e cinza

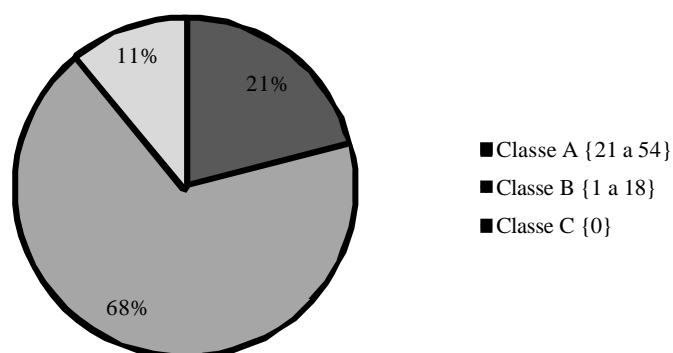


Figura 17. Número de isolados de mucuna preta distribuídos em classes em função de diferença estatística em teste de Scott-Knott em nível de significância de 0,05.

Do total de isolados testados casa de vegetação com o objetivo de verificar sua nodulação, a grande maioria com 68% do total, obtiveram nodulação intermediária e 11% não apresentaram nodulação.

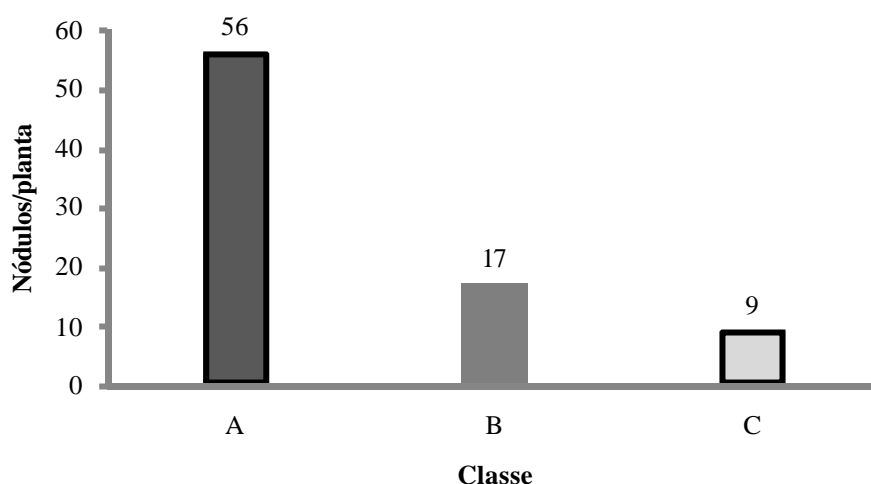


Figura 18. Número de nódulos em 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna preta em casa de vegetação.

A exemplo das espécies anteriores o número de nódulos, foi a única variável que diferiu estatisticamente. Portanto as variáveis MSPA e MSN foram também separadas em função dessa diferença.

A classe A (Figura 18) apresentou 56 nódulos em sua média, número bem superior aos demais, mas não se pode considerar uma nodulação satisfatória, pode ser pelo fato de todas as bactérias isoladas desta espécie ser de crescimento rápido, e terem perdido sua eficiência ao decorrer do isolamento.

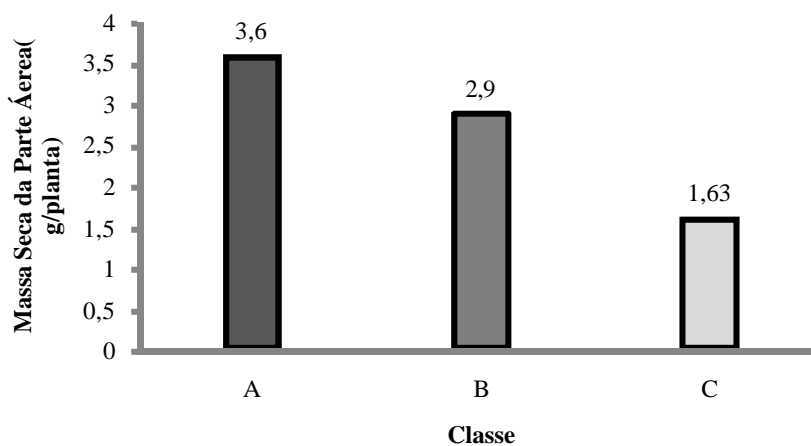


Figura 19. Matéria seca da parte aérea de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna preta em casa de vegetação.

A média da classe A ficou em 3,6g, superior ao resultado encontrado em campo com caupi por Melloni et al, (2006) que variou entre 1,9 a 3,25g.planta⁻¹. A mesma autora encontrou ainda variações na produção de MSPA quando cultivadas em diferentes solos, em que confirma os resultados encontrados neste trabalho.

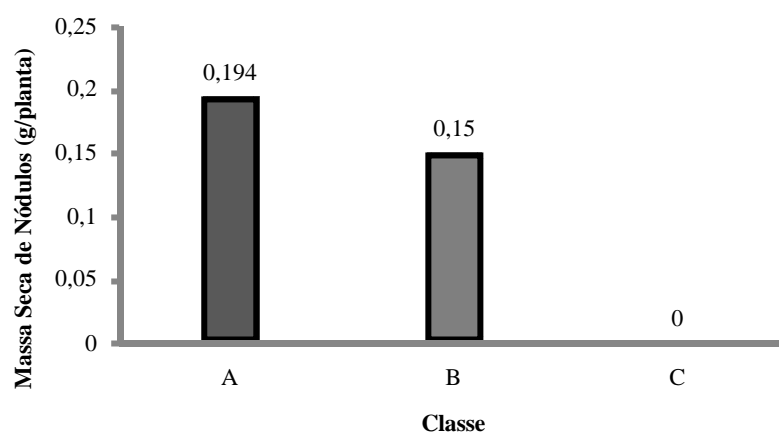


Figura 20. Matéria seca de nódulos de 80 isolados submetidos ao teste de nodulação em mucuna anã em casa de vegetação.

Na mucuna preta a matéria seca de nódulos foi baixa, até mesmo na classe A em que a média atingiu $0,194 \text{ g.planta}^{-1}.\text{vaso}^{-1}$. Diante dos resultados do teste nesta espécie os isolados foram considerados pouco eficientes.

Tabela 15. Média das variáveis avaliadas (número de nódulos, matéria seca de nódulos e matéria seca da parte aérea) em teste de nodulação de cinco isolados de mucuna preta pré-selecionados para teste de eficiência.

Isolado	Número de nódulos	Matéria seca de nódulos (g)	Matéria seca da parte aérea (g)
M20(6)b1	38	0,47	3,5
M16(1)	38	0,49	3,05
M8(4)b	43	0,43	3,77
M19(4)	54	0,45	3,77
M8(1)a1	46	0,28	4,01

As médias de matéria seca da parte aérea dos cinco isolados pré selecionados de mucuna cinza foram superiores às médias encontradas nas classes, sendo que esta pode subestimar os reais valores.. A maior média foi 8,01g de mucuna inoculada com o isolado M15(6) (Tabela 12) sendo 2,88g maior que a média da classe A desta espécie. E superior também ao valor encontrado por Zilli (2001).

Tabela 16. Características culturais e de solo das bactérias que apresentaram as melhores médias de massa seca de nódulos (MSN) e massa seca da massa seca da parte aérea (MSPA) em teste de nodulação em mucuna preta.

Isolado	Solo	Classe de solo	Tempo de crescimento	pH
M20(6)b1	8	Argissolo Amarelo	rápido	ácido
M16(1)	7	Argissolo Amarelo	rápido	ácido
M8(4)b	4	Argissolo Amarelo	rápido	ácido
M19(4)	5	Argissolo Vermelho-Amarelo	rápido	ácido
M8(1)a1	4	Argissolo Amarelo	rápido	ácido

Os cinco isolados pré-selecionados são oriundos de Argissolo com predominância de Argissolo Amarelo (figura 13), solos relativamente mais férteis e que possuem ambiente propício para atividade microbiana. Essas bactérias foram de crescimento rápido e acidificadoras do meio de cultura, não condizentes aos encontrados por Martins, (1997) em a grande maioria apresentava crescimento lento.

4.5 . Teste de eficiência em casa de vegetação

Baseado nas melhores médias dos parâmetros de massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de nódulos no teste de nodulação, os isolados pré-selecionados para utilização em teste de eficiência para mucuna anã foram: m38(2), m30(3), m6(2-1), m6(4-2), m6(5). Os isolados de mucuna anã, em geral, apresentaram as melhores médias nas variáveis analisadas, juntamente com adubação nitrogenada, sendo, às vezes, superior à estirpe recomendada.

Observa-se (Tabela 12), que os parâmetros analisados não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos na época 1 (coleta aos 40 dias após o plantio).

Comparando matéria fresca da parte aérea (MFPA) nos tratamentos da época 2 com coleta aos 60 dias após o plantio, observou-se que a planta de mucuna inoculada com o isolado pré-selecionado M30(3) obteve média foi superior, porém não diferiu estatisticamente dos tratamentos M6(2-1), da testemunha nitrogenada e da estirpe recomendada que ficaram com médias estatísticas iguais a esta. Comparando os tratamentos em duas épocas, os isolados M30(3) e M6(2-1) e a BR 2811 mostraram-se superiores na segunda coleta em comparação com a primeira, nos parâmetros: matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de nódulos (MSN).

Na época 2, as plantas inoculadas com os isolados M38(2) e M6(2-1) apresentaram maior produção de MSPA, com semelhança estatística aos tratamentos nitrogênio, BR 2811. Esses resultados sugerem que esses isolados tenham potencial para produção de MSPA.

Em relação a MSN os tratamentos apresentaram diferença significativa na época 2, sendo que três isolados apresentaram as maiores médias estatísticas juntamente com a BR 2811. Em MSN a testemunha total e a nitrogenada apresentaram os menores valores, o que já era esperado para estes tratamentos. Embora o aparecimento dos nódulos seja sensível ao excesso de N, pequenas doses podem estimular tanto o crescimento da planta como aumentar a massa de nódulos produzidos.

A MSR é um parâmetro importante, que objetiva a utilização da mucuna como adubo verde e a raiz para incorporação como matéria orgânica. Não houve diferença estatística entre os tratamentos dentro de cada época, mas ocorreu entre as épocas em cinco tratamentos.

A eficiência de uma determinada bactéria na planta hospedeira é medida em um conjunto de variáveis, mas se expressa mais claramente no N total, que mostrou ser melhor no isolado apesar de muitas vezes não apresentar diferença estatística em relação aos demais. O crescente acúmulo de N da época 1 para a época 2, mostrou que esta variável acompanhou o crescente aumento média de produção de MFPA, MSPA, MSN, MSR da mucuna anã indicando assim uma melhor época para o uso da planta como adubo verde proporcionando uma maior aproveitamento do material, neste caso aos 60 dias após o plantio. Acredita-se que o N acumulado na parte aérea da mucuna seja proveniente da fixação biológica.

A matéria seca total das plantas de mucuna anã inoculadas com os isolados M30(3) e M6(2-1) apresentaram médias iguais estatisticamente aos tratamentos nitrogenado e à estirpe recomendada, porém M30(3) foi superior em 26% comparando-se com a estirpe recomendada e superior em 38% em relação ao tratamento nitrogenado. Diante dos resultados obtidos nos parâmetros de mucuna anã, pôde-se observar que os isolados M30(3) e M6(2-1) obtiveram melhores médias, podendo indicar uma maior eficiência destes em relação aos demais, podendo ser testados no campo para posterior seleção como inoculante para mucuna anã.

Tabela 17. Variáveis analisadas em teste de eficiência em casa de vegetação com cinco isolados de mucuna anã pré-selecionados e três testemunhas em duas épocas.

Tratamento	Matéria fresca da parte aérea (g.planta ⁻¹)		Matéria seca da parte aérea (g.planta ⁻¹)		Matéria seca de nódulos (g.planta ⁻¹)		Matéria seca de raíz (g.planta ⁻¹)		Matéria seca total (g.planta ⁻¹)		Nitrogênio total parte aérea (mg.planta ⁻¹)	
	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2
M38(2)	9,29A*a*	11,69 Ba	2,00 Aa	3,08 Ba	0,201Aa	0,381Aa	0,50Aa	0,84 Aa	2,71 Ab	4,30 Ba	56,0 Aa	63,75 Ba
M30(3)	9,51 Ab	23,15Aa	2,11 Ab	5,33Aa	0,206 Ab	0,54 Aa	0,35 Ab	1,094 Aa	2,67 Ab	6,98 Aa	56,5 Ab	112,25 Aa
M6(2-1)	7,88 Ab	20,36 Aa	1,69 Ab	4,78 Aa	0,140 Ab	0,517 Aa	0,485 Ab	1,192 Aa	2,32 Ab	6,49 Aa	35,0 Bb	116,0 Aa
M6(4-2)	7,54 Aa	10,67 Ba	1,63 Aa	2,82 Ba	0,249 Aa	0,270 Ba	0,57 Aa	0,886 Aa	2,46 Ab	3,98Ba	44,5 Aa	61,25 Ba
M6(5)	9,15 Aa	11,00 Ba	1,95 Aa	2,51 Ba	0,254 Aa	0,19 Ba	0,45 Ab	0,97 Aa	2,67 Ab	3,67 Ba	15,75 Bb	47,0 Ba
BR 2811	6,21 Ab	16,61Aa	1,37 Ab	3,95Aa	0,142 Ab	0,453 Aa	0,515 Ab	1,109 Aa	2,03 Ab	5,51 Aa	26,25 Bb	103,25 Aa
Testemunha nitrogenada	11,53 Aa	18,19 Aa	2,49 Aa	4,24 Aa	0,006 Aa	0,003 Ca	0,625 Aa	0,793 Aa	3,12 Ab	5,03 Aa	2,0 Cb	134,0 Aa
Testeunha total	3,71 Aa	4,84 Ba	1,03 Aa	2,14 Ba	0,000 Aa	0,0025 Ca	0,402 Ab	0,992 Aa	1,43 Ab	3,14 Ba	16,5 Ba	1,25 Cb
CV	25,65		25,61		40,53		27,76		44,79		78,35	

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-knott ao nível de significância de 0,05
A primeira coleta foi aos 40 e a segunda aos 55 dias após o plantio.

** Matéria seca total=Matéria Seca da Parte Aérea+Massa Seca de Nódulos+Massa Seca da Raíz.

Tabela 18. Variáveis analisadas em teste de eficiência em casa de vegetação com cinco isolados de mucuna cinza pré-selecionados e três testemunhas em duas épocas.

Tratamento	Matéria fresca da parte aérea (g.planta ⁻¹)		Matéria seca da parte aérea (g.planta ⁻¹)		Massa seca de nódulos (g.planta ⁻¹)		Matéria seca de raíz (g.planta ⁻¹)		**Matéria seca total (g.planta ⁻¹)		Nitrogênio total (mg.planta ⁻¹)	
	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2
M41(3)	19,66 A*b*	28,47 Aa	3,96 Ab	6,62 Aa	0,394 Ab	0,695 Aa	0,902 Ba	1,523Aa	5,26 Ab	8,47 Aa	104,0 Ab	178,75 Aa
M3(6)	19,14 Aa	25,87 Aa	3,78 Ab	6,08 Aa	0,431 Aa	0,584 Aa	1,280Aa	1,225 Aa	5,50 Ab	7,89 Aa	102,0 Ab	158,75 Aa
M25(3)	22,20 Aa	25,17 Aa	4,79 Aa	6,13 Aa	0,365 Ab	0,629Aa	0,662 Bb	1,126 Aa	5,82 Ab	7,88 Aa	81,25 Aa	154,50 Aa
M15(6)	15,32 Ab	25,21 Aa	3,48 Ab	5,93 Aa	0,425 Ab	0,777 Aa	0,825 Ba	1,176 Aa	4,73 Ab	7,89 Aa	79,50 Ab	135,0 Ba
M47(1)	21,17 Aa	18,73 Ba	4,86 Aa	4,38 Ba	0,439 Aa	0,545 Aa	1,380 Aa	0,990 Aa	6,68 Ab	5,92 Ba	135,75 Aa	96,75 Ba
BR 2811	16,41 Aa	22,40 Aa	3,64 Aa	5,41 Aa	0,30 Ab	0,633 Aa	0,795 Ba	1,198 Aa	4,74 Ab	7,24 Aa	82,50 Ab	146,25 Aa
Testemunha nitrogenada	22,93 Aa	30,11 Aa	5,20 Ab	7,25 Aa	0,001Ba	0,015 Ba	0,830 Bb	1,507 Aa	6,06 Ab	8,78 Aa	140,75 Ab	200,0 Aa
Testemunha total	7,24 Ba	13,42 Ba	2,88 Aa	3,88 Ba	0,010 Ba	0,007 Ba	0,608Ba	0,892 Aa	3,50 Ab	4,78 Ba	1,25 Ba	2,5 Ca
CV	25,65		25,61		40,54		27,76		23,49		31,11	

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-knott ao nível de significância de 0,05

A primeira coleta foi feita aos 45 dias após o plantio e a segunda aos 55 dias após o plantio.

** Matéria seca total=Matéria Seca da Parte Aérea+Massa Seca de Nódulos+Massa Seca da Raíz.

No teste de nodulação da mucuna cinza, os resultados (Tabela 13) de MFPA mostraram que, na época 1 a testemunha total obteve média inferior aos demais tratamentos, já na época 2 a planta inoculada com o isolado M47(1) e a testemunha sem inoculação e sem aplicação de N obtiveram as menores médias. Em relação a MSPA apenas a época 2 apresentou diferença significativa e, a exemplo da MFPA o isolado M47(1) e a testemunha total foram apresentaram médias inferiores aos demais tratamentos, isso é devido á proporcionalidade na perda de água.

Como esperado MSN apresentou diferença dos isolados e da estirpe recomendada em relação às testemunhas nitrogenada e total, pois nestas plantas estão isentas de simbiose devido a ausência do rizóbio.

Quanto à matéria seca da raiz os isolados os isolados M3(3) e M47(1) obtiveram médias superiores às demais na primeira coleta, já na segunda não houve diferença entre os tratamentos. Quanto ao Ntotal houve diferença entre os isolados e a testemunha total na época 1. Enquanto que, na época 2 os isolados M41(3), M3(6) e M25(3) obtiveram semelhança estatística à BR 2811e a testemunha nitrogenada.

Em mucuna cinza a matéria seca total das plantas inoculadas com os isolados apresentaram médias iguais estatisticamente aos tratamentos nitrogenado e à estirpe recomendada. No entanto M41(3) obteve média 17% superior à estirpe recomendada enquanto que os isolados M3(6), M25(3) e M15(6) apresentaram média superior em 9% em relação à estirpe recomendada.

Assim como as espécies anteriores a mucuna preta foi submetida ao teste de eficiência com os isolados pré-selecionados no teste de nodulação. Nesta espécie as médias foram relativamente baixas em todas as variáveis analisadas. Em relação a MSPA foi observada diferença significativa somente da testemunha nitrogenada em relação aos demais tratamentos. Quanto a MSN, os três isolados obtiveram média zero na época 1, indicando que a MSPA e Ntotal não foram provenientes da fixação biológica de nitrogênio. Em que o maior valor foi atribuído à estirpe recomendada com média de 0,187g de matéria seca na segunda coleta.

Tabela 19. Variáveis analisadas em teste de eficiência em casa de vegetação com cinco isolados de mucuna preta pré-selecionados e três testemunhas em duas épocas.

Tratamento	Matéria fresca da parte aérea (g.planta ⁻¹)		Matéria seca da parte aérea (g.planta ⁻¹)		Massa seca de nódulos (g.planta ⁻¹)		Matéria seca de raíz (g.planta ⁻¹)		**Matéria seca total (g.planta ⁻¹)		Nitrogênio total (mg.planta ⁻¹)	
	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2	Época 1	Época 2
M20(6)b1	6,33 A*a*	7,85Aa	1,59Ba	2,01 Aa	0,117 Aa	0,12 Aa	0,748Aa	0,443Aa	2,45 Aa	2,57 Aa	23,66 Ba	13,67 Ba
M16(1)	6,12 Aa	7,35 Aa	1,63 Ba	1,97 Aa	0,036Aa	0,13 Aa	0,759Aa	0,605Aa	2,43 Aa	2,70 Aa	17,40 Ba	17,20 Ba
M8(4)b	5,50 Aa	5,56 Aa	1,59 Ba	1,52 Aa	0,00Aa	0,015Ba	0,726Aa	0,681Aa	2,32 Aa	2,21 Aa	8,32 Ba	22,11 Ba
M19(4)	5,27 Aa	6,44 Aa	1,36 Ba	1,65 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba	0,738Aa	0,508Aa	2,10 Aa	2,16 Aa	19,68 Ba	14,11 Ba
M8(1)a1	4,30 Aa	8,13 Aa	1,19 Ba	2,11Aa	0,00 Aa	0,00 Ba	0,943Aa	0,969Aa	2,14 Aa	3,08 Aa	19,06 Ba	18,65 Ba
BR 2811	4,39 Aa	9,92 Aa	1,07 Ba	2,28Aa	0,073 Aa	0,187 Aa	0,657Aa	0,835Aa	1,79 Aa	3,31 Aa	11,74 Ba	16,65 Ba
Testemunha nitrogenada	13,86 Aa	7,65Ab	3,00 Aa	1,95Aa	0,00 Aa	0,00 Ba	0,501Aa	0,729Aa	3,5 Aa	2,68 Aa	67,47Aa	82,39 Aa
Testemunha total	3,26 Aa	3,50 Aa	0,71 Ba	0,86 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba	0,594Aa	0,429Aa	1,31 Aa	1,29 Aa	1,19 Ba	0,37 Ba
CV	51,82		54,32		260,92		45,38		48,10		96,31	

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-knott ao nível de significância de 0,05

A primeira coleta foi feita aos 45 dias após o plantio e a segunda aos 55 dias após o plantio.

** Matéria seca total=Matéria Seca da Parte Aérea+Massa Seca de Nódulos+Massa Seca da Raíz.

Não houve diferença significativa nas médias de MSR, dentro de cada época e entre as épocas, o que indicou pouco desenvolvimento radicular.

Embora o aparecimento dos nódulos seja sensível ao excesso de N, pequenas doses podem estimular tanto o crescimento da planta como aumentar a massa de nódulos produzidos. Segundo DOBEREINER (1966), há uma correlação positiva entre a massa nodular e a quantidade de N acumulado (N_{total}) em leguminosas. Essa correlação positiva, foi encontrada também por Wadisirisuk & Weaver (1985) e Fernandes & Fernandes (2000), assim como Fernandes et al (2003) notaram correlações positivas quanto à massa seca de nódulos (MSN), quando dados de caupi e guandu foram correlacionados aos do feijão-deporco.

Quanto à variável matéria seca da parte aérea os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si, porém as plantas com inoculadas com M8(1)a1 obtiveram médias superiores à testemunha nitrogenada em 15%.

Os isolados com médias iguais ou superiores à estirpe recomendada podem ser indicados como alternativa de inoculante para a região (ZILII, 2001) sendo adaptados e competitivos.

4.6. Caracterização Genotípica

4.6.1. Caracterização genotípica por ARDRA em mucuna anã

Foram separados representantes dos grupos de bactérias isoladas de mucuna e caracterizadas morfológicamente, e escolhidos também os isolados pré-selecionados para o teste de eficiência em casa de vegetação.

O isolado M6(3) com características de crescimento rápido e pH alcalino, apresentou similaridade de aproximadamente 53% com os padrões de *Rhizobium*, formando assim um primeiro grupo. Um segundo grupo foi formado somente por estirpes padrão, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* que se ramificaram entre 50 e 55% de similaridade, acompanhando a tendência.

MUCUNA ANÃ

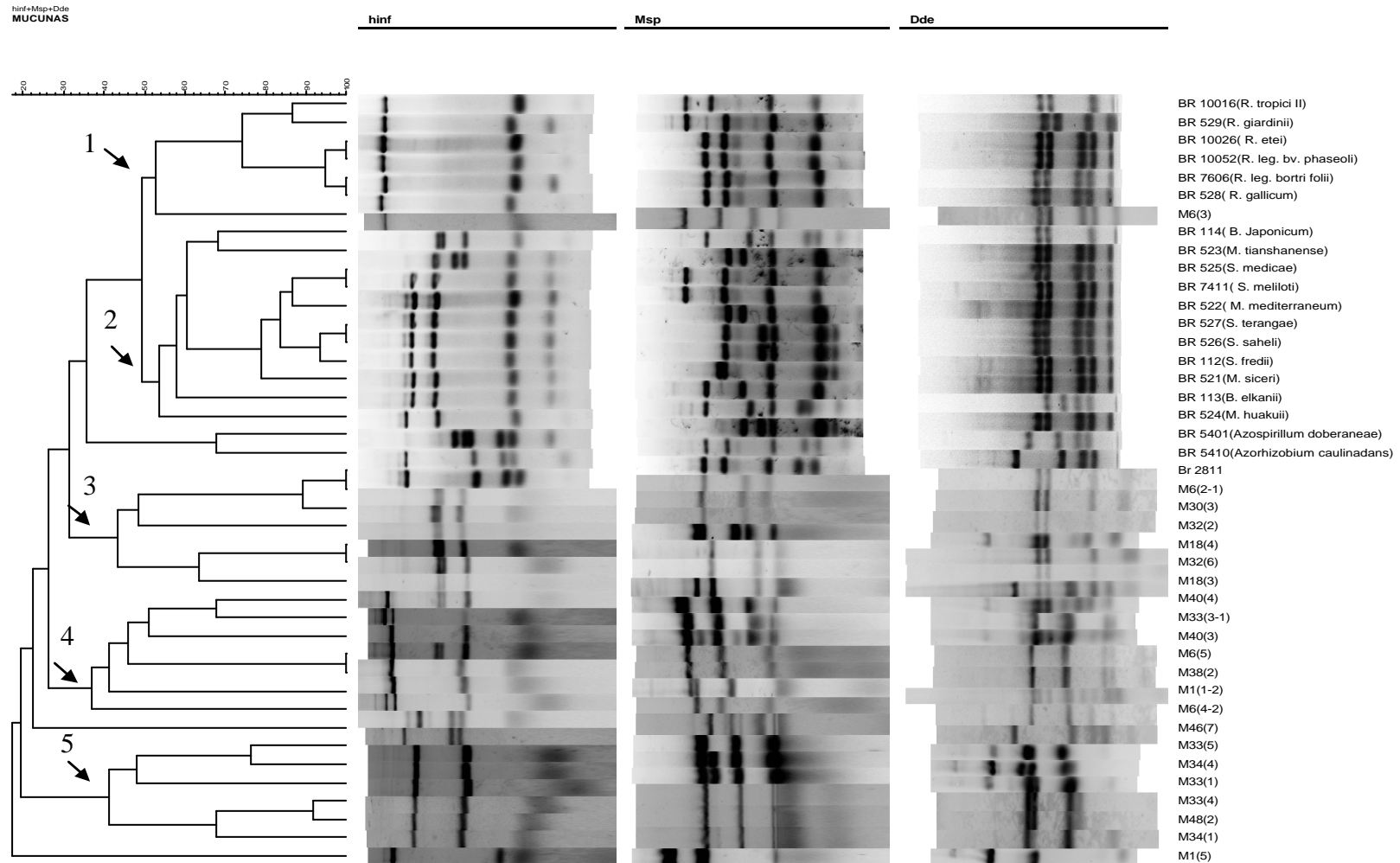


Figura 21. Dendrograma de similaridade genética de bactérias isoladas de mucuna anã e clivadas com as enzimas de restrição *Msp I*, *Hinf I* e *Dde I*.

Um terceiro grupo foi formado aos 50% de similaridade, em que o isolado M6(2-1) oriundo de Argissolo Vermelho-Amarelo e, pré-selecionado para o teste de eficiência em casa de vegetação, apresentou similaridade genética de 100% com a estirpe BR 2811 (*Bradyrhizobium*) recomendada para uso como inoculante em mucuna. Foi observado, que o isolado M30(3) com características de crescimento lento (seis dias) e pH alcalino e que foi pré-selecionado para teste de eficiência, obteve aproximadamente 90% de similaridade genética com a BR 2811 e com o isolado M6(2-1). Ainda no terceiro agrupamento, os isolados M18(4) e M32(6) foram similares em 100%. A característica mais importante para a formação deste grupo foi o pH alcalino em todos os isolados em questão sendo um fator geneticamente influenciável.

No quarto grupamento o M6(5) foi similar em 100% com o isolado M38(2), estas bactérias foram isoladas de nódulos de mucuna, de diferentes solos, que podem estar propiciando condições para o crescimento e estabelecimento de bactérias similares em diferentes solos. No último grupamento a maior similaridade encontrada foi dos isolados 33(4) e 48(2) com cerca de 90%, ambos foram isolados de nódulos de mucuna anã de Argissolo Amarelo. O que pode estar indicando predomínio de solos neste agrupamento.

4.6.2. Caracterização genotípica por ARDRA em mucuna Cinza

Na espécie de mucuna cinza foram separados representantes dos grupos de bactérias isoladas de mucuna e caracterizadas morfológicamente, foram escolhidos para esta análise também os isolados pré-selecionados para o teste de eficiência em casa de vegetação.

O primeiro grupamento (Figura 22) tem sua formação em torno de 38% de similaridade sendo formado apenas por isolados obtidos de nódulos de mucuna cinza, sem a presença de estirpes padrão. Neste grupo encontram-se três isolados pré-selecionados para o teste de eficiência, sendo estes M41(3), M15 (6) e M47 (1), os dois primeiros com crescimento rápido e pH ácido e o último com crescimento rápido e pH alcalino.

No segundo grupo (Figura 22) observou-se alta similaridade (>70%) entre os isolados analisados, o M13(4) e M13(2) foram isolados da mesma planta e apresentaram 90% de similaridade genética. Enquanto que, o M23(4) e M17(3) de Argissolo e Planossolo, respectivamente são totalmente similares entre si e, 90% com o M15(3) também Argissolo Amarelo. Neste grupo 100% dos isolados tem crescimento rápido e pH ácido.

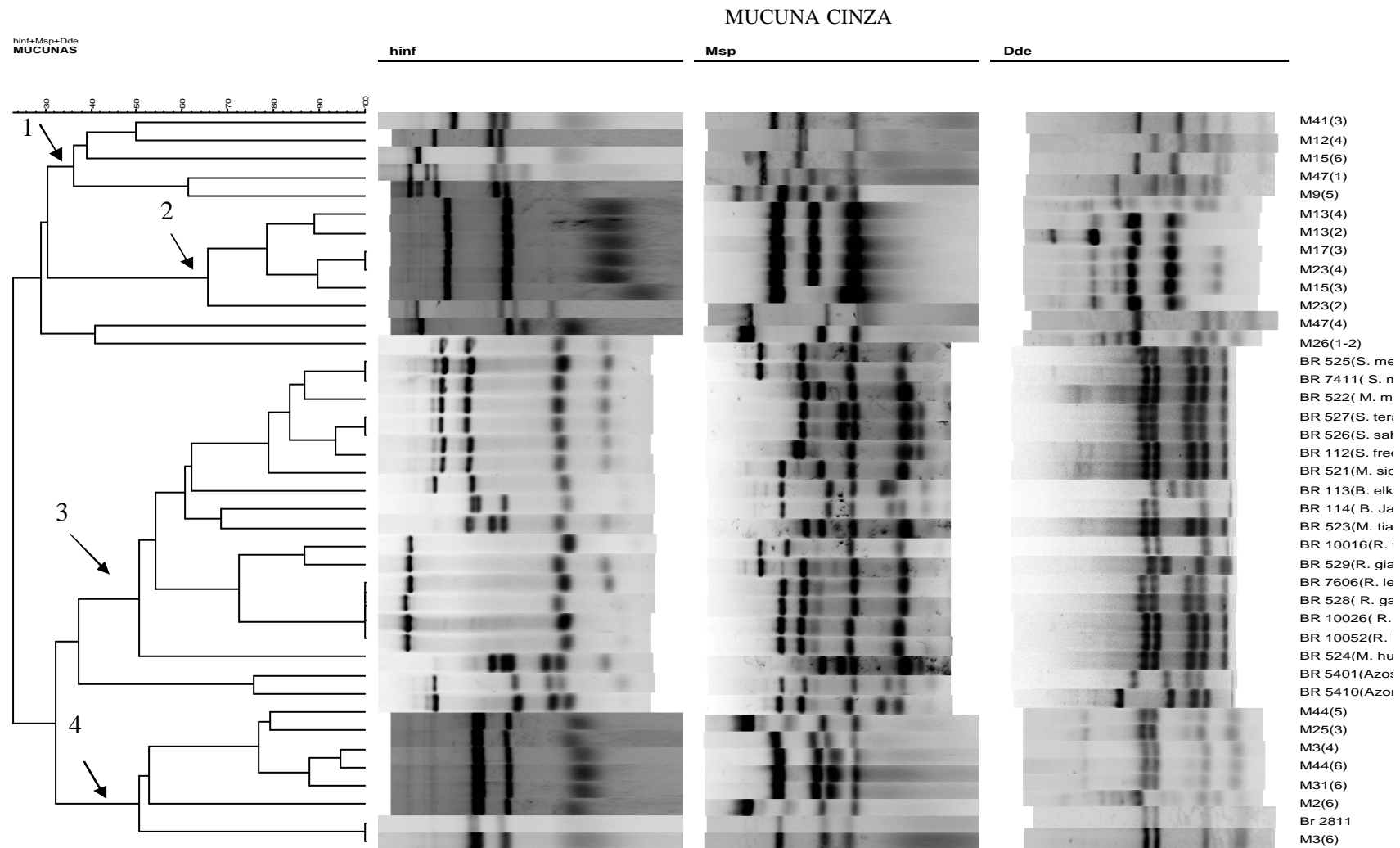


Figura 22. Dendrograma de similaridade genética de bactérias isoladas de mucuna cinza e clicadas com as enzimas de restrição *Msp I*, *Hinf I* e *Dde I*.

No terceiro grupamento todos os componentes pertencem às estirpes padrão que foram usadas para comparação no dendrograma (Figura 22) Foi usado *Azospirillum* e este apresentou <40% de similaridade com as demais estirpes padrão.

O quarto grupo foi formado por bactérias alcalinas e de crescimento lento e ocorreu similaridade de 100% entre o isolado M3(6) e a BR 2811 (*Bradyrhizobium*) recomendada como inoculante para mucuna, ambos tem crescimento lento (6 dias) e pH alcalino.

Pode-se sugerir que na formação de grupos distintos da maioria das bactérias em relação às estirpes padrão, ocorra o aparecimento de novos grupos, podendo até mesmo não ser rizóbios e sim outra bactéria nodulífera.

4.6.3. Caracterização genotípica por ARDRA em mucuna preta

Na caracterização genética de mucuna preta (Figura 23), os grupos 1 e 2 foram compostos somente por estirpes padrão. No primeiro grupo as espécies de *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium* se agrupam. No grupo 2, o *Rhizobium tropici* II e o *R. giardinii* apresentaram-se similares em 100%, assim também o *Rhizobium etli* e *R. leg. bv. phaseoli*.

No grupamento 3 observou-se similaridade em cerca de 90%, entre os isolados M11(2)a e M16(1), o primeiro foi oriundo da classe de solo vermelho amarelo e o segundo Argissolo Amarelo. A similaridade entre o M19(3) e 19(4), pode ser devido ao fato de serem originários da mesma planta. No quarto grupamento o M28(7) e M39(4) obtiveram > de 90% de similaridade entre si, porém não foram do mesmo solo.

A mucuna preta foi a espécie que apresentou menores variações nas características morfológicas dos isolados, onde todos os isolados foram de crescimento rápido e apresentaram pH ácido.

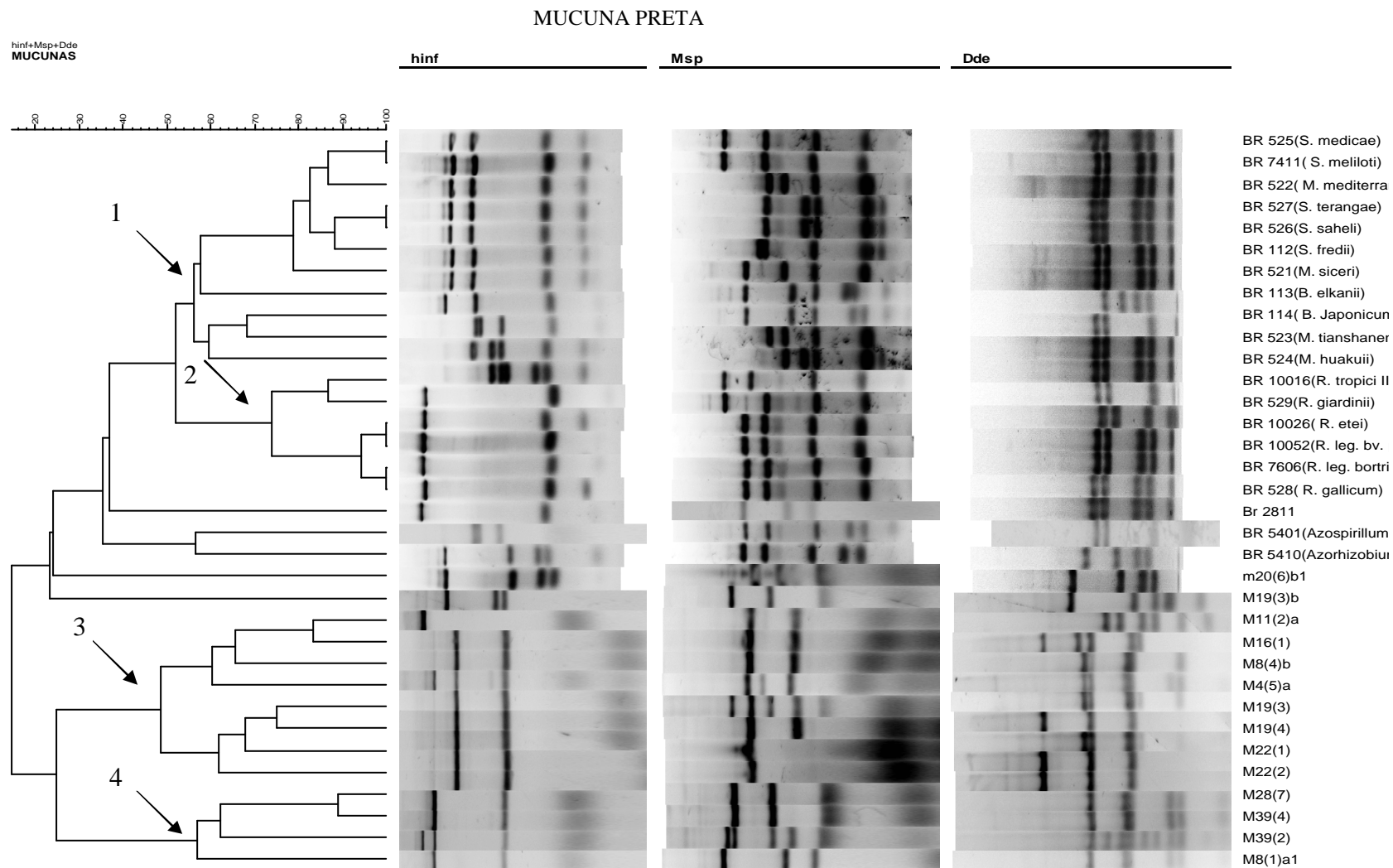


Figura 23. Dendrograma de similaridade genética de bactérias isoladas de mucuna preta e clicadas com as enzimas de restrição *Msp I*, *Hinf I* e *DdeI*.

4.7. Avaliação do agrupamento dos isolados das três espécies de mucuna através do perfil de restrição

A avaliação do agrupamento de todos os isolados de mucuna com os padrões utilizados neste estudo permitiu verificar a formação de seis grupos. O primeiro foi um grupo formado apenas pelas três mucunas, sem a presença de rizóbios padrão e teve similaridade de aproximadamente 30% (Figura 24). O segundo grupo foi formado também exclusivamente pelos isolados das três espécies de mucuna, e teve similaridade de aproximadamente 40%. O terceiro grupo foi formado por estirpes padrão e contém também dois isolados de mucuna anã (Figura 24), este grupo teve similaridade de aproximadamente 40%. O quarto grupo foi formado por isolados de mucuna cinza e anã, além da estirpe BR 2811 de *Bradyrhizobium elkanii* (Figura 24) recomendada para a produção de inoculantes para as mucunas. O quinto grupo também foi formado exclusivamente por isolados das mucunas cinza e anã e teve aproximadamente 50% de similaridade. O sexto grupo teve aproximadamente 60% de similaridade e foi formado por oito isolados de mucuna preta, além um único isolado de mucuna anã (Figura 24).

A avaliação da similaridade genética dos isolados de mucuna através da técnica de restrição do 16S rDNA, revelou elevada variabilidade genética entre os isolados obtidos neste estudo. Nos agrupamentos tanto dos isolados agrupados por plantas de origem, como no agrupamento dos isolados de todas as espécies de mucuna estudadas, o posicionamento do grupo com as estirpes padrão revelou elevada distância entre os isolados obtidos neste estudo e as bactérias padrão. Estes resultados sugerem que os isolados de mucuna preta, cinza e anã, podem representar novos grupos de rizóbio ainda não descritos.

Além da variabilidade genética dos isolados o sexto grupo, composto por rizóbios de mucuna preta, sugere a existência de certa especificidade entre os representantes deste grupo e a sua hospedeira, mediante a similaridade genética elevada entre estes isolados. Elevada variabilidade também foi encontrada ao se avaliar a diversidade genética de rizóbios de adubos verdes originários dos Tabuleiros Costeiros do Nordeste Brasileiro (FERNANDES et al., 2003), onde os isolados avaliados também não agruparam com a maioria dos padrões utilizados em um estudo utilizando a técnica do ARDRA.

A variabilidade genética de rizóbios oriundos de feijão-caupi cultivado na região do Vale do São Francisco também já foi avaliada através da técnica do ARDRA, e grande variabilidade genética foi encontrada onde a maioria dos isolados não agrupou com diversos padrões de rizóbios estudados (PASSOS, et al., 2008).

Estudando a diversidade de rizóbios de feijão caupi, oriundo de solos com diferentes coberturas vegetais, ZILLI et al. (2004) revelaram grande diversidade genotípica dos isolados, onde grande parte das bactérias estudadas não agrupou com as estirpes de rizóbio padrão utilizadas. Avaliando a diversidade genética de rizóbios de adubos verdes em diferentes regiões da China, Liu et al (2007) encontraram uma diversidade genotípica muito grande, e a presença de espécies ainda não descritas, foi reforçada por resultados de sequenciamento.

Adubos verdes como a crotalária, por exemplo, podem estabelecer associações com bactérias formadoras de nódulos não pertencentes aos grupos dos rizóbios tradicionais, como por exemplo, *Methylobacterium nodulans* (JOURAND et al., 2004; RENIER et al., 2008). Esses resultados, aliados ao pouco conhecimento da ecologia e taxonomias dos rizóbios de adubos verdes sugerem que outras espécies como as mucunas, por exemplo, possam se associar com rizóbios ainda não descritos, além de bactérias pertencentes a outras sub-ordens além das alfaproteobactérias.

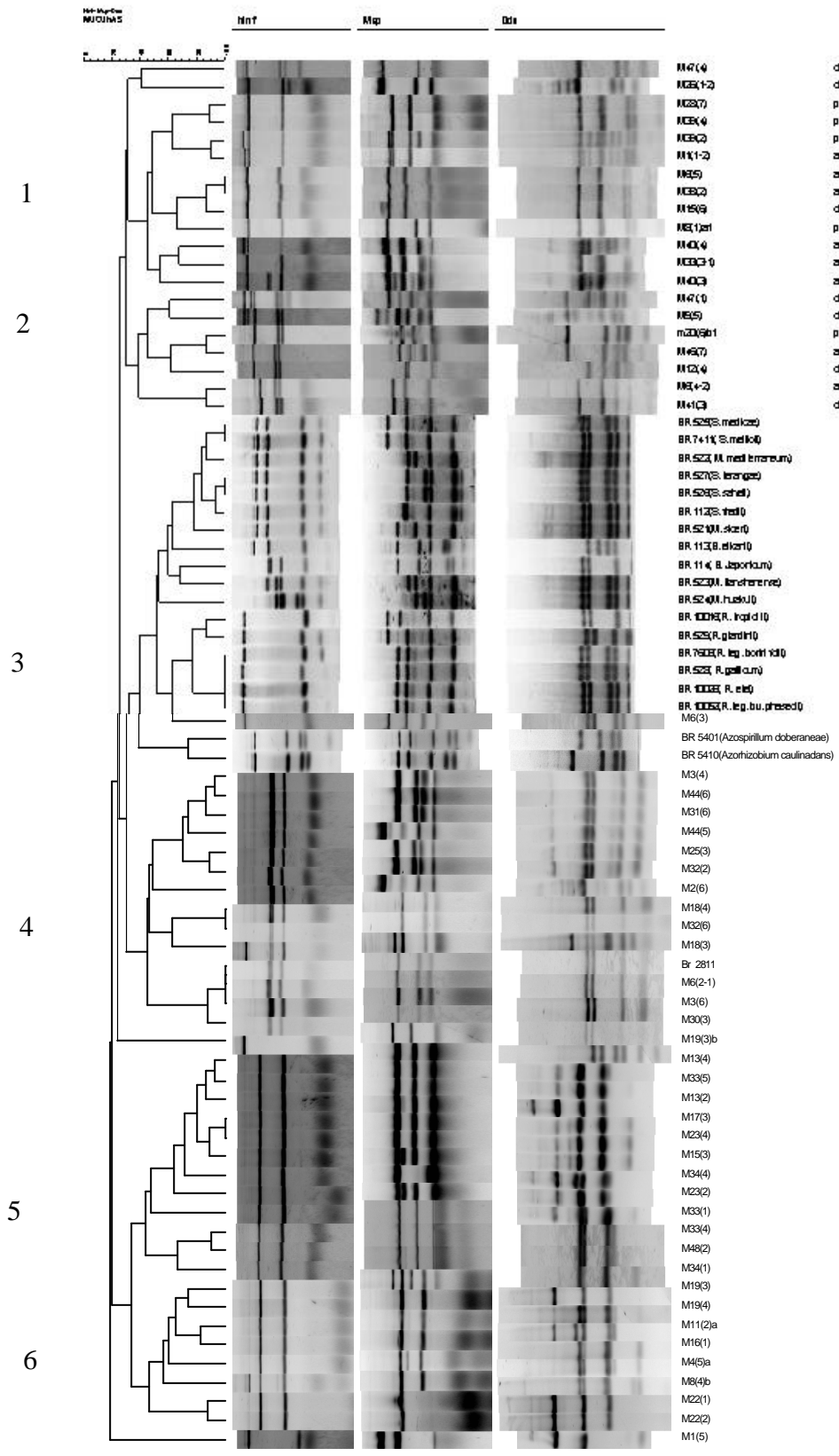


Figura 24. Dendrograma de similaridade genética de bactérias isoladas de mucuna preta, cinza e anã, clivadas com as enzimas de restrição *Msp I*, *Hinf I* e *Dde*.

5. CONCLUSÕES

- O tempo de crescimento e a alteração de pH foram as variáveis que discriminaram morfologicamente os isolados de mucuna.
- Dos 240 isolados obtidos, 86% foram capazes de nodular as espécies de hospedeiros de origem.
- Os isolados de rizóbios de mucuna apresentaram resultados superiores ou iguais ao controle com a estirpe recomendada e ao controle nitrogenado (100 mg de N.vaso-1.semana-1); com destaque para M30(3), M(2-1), M3(6) e M20 (6b1).
- Foi observada ampla diversidade de rizóbios de mucuna, com características fenotípicas diferentes dos padrões de espécies já descritas.
- Foi observada ampla diversidade de rizóbios de mucuna, com perfil de ARDRA diferentes dos padrões de espécies já descritas.
- O perfil de ARDRA permitiu discriminar a especificidade de rizóbios de mucuna preta.
- Os resultados obtidos mostram o potencial dos isolados em mucuna para serem utilizados em futuros programas de recomendação de estirpes eficientes para adubo verde.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, F. F.; VALDES, M. Establecimiento y producción de *Leucaena leucocephala* inoculada com Rhizobium em um suelo ácido. **Pasturas Tropicales**, v. 15, n. 2, p. 29-31, 1993.
- ALCÂNTARA, F. A. de; FURTINI NETO, A. E.; PAULA, M. B. de; MESQUITA, A. de; MUNIZ, J. A. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um Latossolo Vermelho-Escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 277-288, fev. 2000.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *R. giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 996-1006, 1997.
- ANDRIOLI, I; BEUTLER, A. N., CENTURION, J. F.; ANDRIOLI, F. F; COUTINHO, E. L. M. Produção de milho em plantio direto com adubação nitrogenada e cobertura do solo na pré-safra. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1691-1698, 2008.
- ARAÚJO, A. S. F. DE; CARVALHO, E. M. DE S. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. Contribuindo para o desenvolvimento do meio rural do Piauí. **Comunicado Técnico**, n. 11, p. 1-4, abril 2006
- BABIC, K. H.; SCHAUSS, K.; HAI, B.; SIKORA, S.; REDŽEPOVIC, S., RADL, V.; SCHLOTTER, M. Influence of different *Sinorhizobium meliloti* inocula on abundance of genes involved in nitrogen transformations in the rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.) **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2903 – 3185, 2008.
- BIEDERBECK, V. O.; CAMPBELL, C. A.; RASIAH, V.; ZENTNER, R. P.; WEN, G. Soil quality attributes as influenced by annual legumes used as green manure. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 8/9, p. 1177-1185, 1998.
- BODDEY, R. M.; SÁ, J. C. de M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 787-799, 1997.
- BRADIC, M.; SIKORA, S.; REDŽEPOVIC, S.; ŠTAFKA, Z.. Genetic identification and symbiotic efficiency of an indigenous *Sinorhizobium meliloti* field population. **Food Technology and Biotechnology**, v.41, p.69–75, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 5, de 06 de agosto de 2004. Aprova as definições e normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como a relação dos microrganismos autorizados para produção de inoculantes no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 10 ago. 2004. Seção 1, p.17.
- BRATTI, A. E.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, C. M.; ZILLI, J. E.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D. L. DE; NEVES, M. C. P. **Levantamento de rizóbios em adubos verdes cultivados em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)**, Embrapa Agrobiologia, Documentos, n. 204, 15p., 2005.
- BROCKWELL, J. Can inoculants strains ever compete successfully with established soil populations? In: GIBSON, A. H.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Current perspectives in nitrogen**. Amsterdam: North Holland/ Elsevier, p. 277-315, 1981.

- BULL, A.T; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 219-252, 1992.
- CALEGARI, A. Coberturas verdes em sistemas intensivos de produção. In: WORKSHOP Nitrogênio na Sustentabilidade de Sistemas Intensivos de Produção Agropecuária, 2000, Dourados. **Anais**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Agrobiologia, p.141-153, 2000.
- CARDINALE, M.; LANZA, A.; BONNÌ, M. L.; MARSALA, S.; PUGLIA, A. M.; QUATRINI, P. Diversity of rhizobia nodulating wild shrubs of Sicily and some neighbouring islands. **Archives of Microbiology**. v. 190, n. 4, p. 461-470, 2008.
- CASTRO, C. M. DE; ALVES, B. J. R. A.; D. L. DE; RIBEIRO, R. de L. D. Adubação verde como fonte de nitrogênio para berinjela. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 779-785, 2004.
- CHAGAS, E.; ARAÚJO, A. P.; TEIXEIRA, M. G.; GUERRA, J. G. M. Decomposição e liberação de nitrogênio, fósforo e potássio de resíduos da cultura do feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p. 723-729, 2007.
- CHATEL, D.L.; GREENWOOD, R.M.; PARKER, C.A. Saprophytic competence as an important character in selection of *Rhizobium* for inoculation. In: 9th Int. **Congress in Soil Science Society**. Adelaide, v. 2. p. 65-73, 1968.
- CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J. II, Y.; WANG, E.T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 870-873, 1997.
- CHEN, W.E.; WANG, E.; WANG, S.; CHEN, X.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slow growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 153-159, 1995.
- CHEN, W. X.; LI, G. S.; QI, Y.L. WANG, E. T.; YUAN, H. L.; LI, J.L. *Rhizobium huakii* sp nov. isolated from the nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 275-280, 1991.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H.; Li, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 392-397, 1988.
- CHENG, G.J.; LI, Y.G.; ZHOU, J.C.. Cloning and identification of opa22, a new gene involved in nodule formation by *Mesorhizobium huakuii*. **FEMS Microbiology Letter**, v.257, p.152-157, 2006.
- COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; LOVATO, A.; MAIA, A.H.N.; MANFIO, G.P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, v.13, p.159-167, 1999.
- COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MOREIRA, F. M. S. Systematics of legume nodule nitrogen fixing bacteria: agronomic and ecological applications. In: PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Applied Microbial Systematics**. Dordrecht: Kluwer, p. 107-134, 2000.
- CREWS, T.E.; PEOPLES, M.B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 102, p. 279 – 297, 2004.

- DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiency nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v, 48, p. 1270–1290, 1998a.
- DE LAJUDIE, WILLEMS, A., NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; LINDSTRÖM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 369-382, 1998b.
- DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D; MASTROJUAN, G.; NEYRA, M., COLLINS, M.D., DREYFUS, B. KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 715-733, 1994.
- DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. de; FRANCO, A. A. Adução verde: parâmetros para avaliação de sua eficiência. In: CASTRO FILHO, C. de; MUZILLI, O. (Ed.). **Manejo integrado de solos em microbacias hidrográficas**. Londrina: IAPAR, p. 225-242, 1996.
- DERPSCH, R.; ROTH, C.H.; SIDIRAS, N.; KOPKE, U. **Controle da erosão no Paraná, Brasil**: Sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo. Eschborn: GTZ, 268p., 1991.
- DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. & MIZOBUTS, H. Avaliação de gramíneas forrageiras para o controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, (Nematoda). **Acta Scientiarum Agronomy**. v.25, n. 2, p. 473-477, 2003.
- DIAS, J.E. **Monitoramento do uso da terra e dos níveis de nutrientes do solo no Sistema Integrado de produção Agroecológica utilizando geoprocessamento**. 111p., Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, Seropédica, RJ (Tese de Doutorado), 2007
- DOBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, v.210, p.850-852, 1966.
- DREYFUS, B.L.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 89-98, 1988.
- EIA-DOE, International Energy Outlook. Energy Information Administration (EIA)-US Department of Energy (DOE), Washington DC, USA, 2007. Site: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/index.html>, 2007
- EMBRAPA AGROBIOLOGIA. Inoculantes para Leguminosas, **Publicações on-line**, Seropédica-RJ, acesso em <25 de julho de 2008>. SITE: www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/publicacoes.html.
- EMBRAPA AGROBIOLOGIA. Fazendinha Agroecológica - SIPA, **Publicações on-line**, Seropédica-RJ, acesso em <01 de Agosto de 2008>. SITE: www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/publicacoes.html.
- ESPINDOLA, J. A. A, Comunicação Pessoal, 2007.
- ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. DE; TEIXEIRA, M. G.; URQUIAGA, S.. Decomposição e liberação de nutrientes acumulados em leguminosas herbáceas perenes consorciadas com bananeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p. 321-328, 2006.

- ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; DE- POLLI, H.; ALMEIDA, D. L. de; ABBOD, A. C. de S. Adubação verde com leguminosas. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 49 p., 2005.
- ESPÍNDOLA, J. A. A.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. **de. Adubação verde: Estratégia para uma agricultura sustentável**. Seropédica: Embrapa-Agrobiologia, 20p. . Documentos, 42, 1997.
- FERNANDES JÚNIOR, P.I.; OLIVEIRA, P.J., RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Caracterização morfológica de rizóbios isolados de nódulos de guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. Brasília. Embrapa Cenargen. II Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos. **Anais**, p. 540., 2008.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 835-842, 2003.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 321-327, 2000.
- FERNANDEZ, G. C.; CREIGHTON, J. M. Interaction between rhizobia inoculation and fertilizer nitrogen in five cowpea cultivars. **HortScience**, v. 21, p. 1345–1348, 1986.
- FILSER, J. The effect of green manure on the distribution of collembola in a permanent row crop. **Biology and Fertility of Soils**, v.19, n.4, p.303-308, 1995.
- FRED, E. B.; WAKSMAN, S. Yeast extract-mannitol agar for laboratory. **Manual of general microbiology**. New York: McGraw Hill, 145 p., 1928
- FREIBERG, C.; FELLAY, R.;BAIROCH, A.; BROUGHTON, W.J.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X.. Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. **Nature**, v.387, p.394–401, 1997.
- FREIRE, J.R.J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P., eds. **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, p.121-140, 1992.
- FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morfological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.224-229, 1990.
- GANDEE, C.M.; HARRISON, S.P.; DAVIES, W.P. Genetic characterization of naturally occurring Rhizobium meliloti populations and their potential to form effective symbioses with alfalfa. **Letter Applied Microbiology**, v. 28, p, 169–174, 1999.
- GAO, J. L.; TURNER, S. L; KAN, F.L.;WAN, E.T.;TAN, Z. Y.; QIU, Y.H.; TEREFWORK, Z.; YOUNG, J.P.W.; LINDSTROM, K.; CHEN, W.X. *Mesorhizobium septentrionale* sp. Nov.; *Mesorhizobium temperatum* sp. Nov. isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 5, p. 2003-2012, 2004.
- GARCÍA-de los SANTOS, A.; BROM, S.; ROMERO, D. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, p. 119-125, 1996.
- GARRITY, G.M. & HOLT, J.G. The road map to the *Manual*. In: BOONE, D.R. & CATENHOLZ, R.W., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York, Springer-Verlag, v.1, p.119-166, 2001.

- GILLER, K.E. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 2001. 448p.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science** v. 315, p.808–810, 2007.
- GOLDEMBERG, J., Johansson, T.B., 2004. World Energy Assessment Overview. Update. United Nations Development Programme, New York, USA. <http://www.undp.org/energy/weaover2004.htm>, 2004.
- GRAHAM, P.H.; SADOWSKI, M.J.; KEYSER, H.H.; BARNET, Y.M.; BRADLEY, R.S.; COOPER, J.E.; de LEY, D.J.; JARVIS, B.D.W.; ROSLYCKY, E.B. STRIJDOM, B.W.; YOUNG, J.P.W. Proposed minimal standars for the description of new genera and species of root and stem-nodulating bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 582-587, 1991.
- GRANGE.L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenou common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**. v.36: 1389–1398. 2004.
- GUERRA, J.G.M.; NDIAYE, A.; ASSIS, R. L. DE; ESPINDOLA, J. A. A. Uso de plantas de cobertura na valorização de processos ecológicos em sistemas orgânicos de produção na região serrana fluminense. **Revista Agrícolas**, v. 4, n. 1, 2007.
- GUPTA, V. C. & LIPSET, J. Molybdenum in soils, plants and animals. **Adv. Agronomy.**, v.34: p.73-115, 1981.
- HARA F.A.S. & OLIVEIRA L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.7, p.667-672, 2005.
- HARTMANN, A.;GIRAUD, J.J.; CATROUX, G. Genotypic diversity of Sinorhizobium (formerly Rhizobium) meliloti strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 25, p.107–116, 1998.
- HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant Soil**, v. 311, p. 1–18, 2008.
- HERRIDGE, D.F.; ROUGHLEY, R.J. Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of Rhizobium. **Journal of Applied Bacteriology**, v.38, p.19-27, 1975.
- HESTER, A. A Fresh Approach to US Energy Security and Alternative Fuels: the Western Hemisphere and the Ethanol Option. **The Centre for International Governance Innovation**, Waterloo, Ontario, Canada. <http://www.cigionline.org/>, 2006.
- HIRSCH, P.R. Population dynamics of indigenou and genetically modified rhizobia in the field. **New Phytologist**, v. 133, p. 159-171, 1996.
- HIRSCH, P. R.; JONES, M. J.; MCGRATH, S. P.; GILLER, K. E. Heavy metals from past application of sewage decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* population. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p. 1485-1490, 1993.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUERIE, L.M.O.; PROBENZA, 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– 528, 2000.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.

- JARVIS, B.D.W.; van BERKUM, P. CHEN, W.X.; NOUR, S.M. FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 895-898, 1997.
- JARVIS, B.D.W. DOWNER, J.L.; YOUNG, J.P.W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Shinorhizobium* & *Bradyrhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 93-96, 1992.
- JARVIS, B.D.W.; PANKUHURST, C.; PATEL, J.J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 378-380, 1982.
- JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M.I.D.; OLIVEIRA, M. S.. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n. 8, p.769-776, 2005.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae. CONN. 1983. In: KRIEG, N.R. ed., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, Williams and Wilkins, p. 234-256, 1984.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum*, Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminosus plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 136-139, 1982.
- JOURAND, P.; GIRAUD, E, BENA, G.; SY, A.; WILLENS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; de LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and evolutionary Bacteriology**. v. 54, 2269-2273, 2004.
- KAWAI, F.; ZHANG, D.; SUGIMOTO, M. Isolation and characterization of acid and Al-tolerant microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.189, p.143-147, 2000.
- KERR, R.A., The next oil crisis looms large and perhaps close. **Science**, p. 1128-1131, 1998.
- KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Ceres, 492p., 1985.
- KOH, L. P.; GHAZOUL, J. Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities. **Biological Conservation**, v. 141, p. 2450-2460, 2008.
- KOVALESKI, J.L.; SOLA, A. V.H. **Eficiência energética nas indústrias: cenários & oportunidades**, 2004. Disponível em:< <http://www.pg.cefetpr.br/ppgep/Ebook/ARTIGOS/81.pdf> > Acesso em 20 Set, 2008.
- KUYKENDALL, L.D., SAXENA, B., DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordam 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology**, v.38, p.501-505,1992.
- LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.
- LACERDA, N. B DE; SILVA, J. R.C. Efeitos da erosão e de técnica de manejo sobre a produção do algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v.10, n.4, p.820-827, 2006.
- LANZE, G. A.; ANDRADE, D. de S.; AMARAL, H. F.; HIROZAWA, F. S.; ESTRATA, K. R. F. S.; SENA, J.O. A. Potencial de inóculo de rizóbio nodulante de feijão em solos sob

cultivo de videira orgânica e convencional. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n. 2, p. 838-841, 2007.

LIAO, C.F.H.. Devarda's allow methods for total nitrogen determination. **Soil Science Society of American Journal**, v. 45, p. 852-855, 1981.

LINDSTRÖM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 365-367, 1989.

LIU, X. Y.; WANG, E.T.; LI, Y.; CHEN, W.X. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. **Archives of Microbiology**. v. 188, p.1-14. 2007.

LOHNIS, F.; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **Journal Agricultural Research**, v.20, p.543-556, 1921.

LOMBARDI, M.L.C.O. **Diversidade de rizóbios nativos de solos do Estado de São Paulo**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 164p. (Tese Doutorado), 1995.

MARTINAZZO, A. F. **Potencial de fixação de N₂ em (*Vigna unguiculata* Walp.) em diferentes condições ambientais**. Itaguaí: UFRRJ, 154p. (Tese de Mestrado), 1989.

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.

MARTINS, L. M. V. Comportamento de estirpes de rizóbio introduzidas como inoculantes para caupi (*Vigna unguiculata*) em solos do semi-árido brasileiro. Seropédica: UFRRJ. 66p. (Tese, Doutorado em agronomia, Ciência do Solo), 2003.

MARTINS, L. M. V.; RANGEL, F. W.; XAVIER, G. R.; RIBEIRO, J. R. A.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, p. 333-339, 2003.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M. C. P., RUMJANEK, N. G. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio. **Comunicado Técnico**, n.19, p.1-14, 1997.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 5, n. 6, p. 1005-1010, 1996.

MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.G.; NEVES, M.C.P. Diversity of Cowpea Nodulating Rhizobia Isolated From the Semi-arid Northeastern Region of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 67 (Supl. 3), p.467-471, 1995.

MASCARENHAS, H.A.A.; LAVADINI, L.A.C.; FREIRE, E. S.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; CRUZ, L.P.; NERV, C.; ANDRADE, F.F. Efeito da adubação verde do feijoeiro "da seca" com *Crotalaria juncea* L., empregando-se toda a vegetação ou retirando-se do campo as partes despojadas de suas folhas. **Bragantia**, v. 26, p. 219-234, 1967.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O.; Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.

- MENDONÇA, E. H. M.; SCHIAVINATO, M A. Growth of *Crotalaria juncea* L. supplied with mineral nitrogen. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, n. 2, p. 181-185, 2005.
- MERCANTE, F. **Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro e troca de sinais moleculares na simbiose com plantas hospedeira**. Seropédica: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 195p. (Tese de doutorado), 1997.
- MOJTAHEDI, H.; SANTO, G. S.; INGHAM, R. E. Suppression of *Meloidogyne chitwoodi* with sudangrass cultivars as green manure. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 2, p. 303-311, 1993.
- MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSARD, L.. **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**, Lavras, p.768, 2008.
- MULONGOY, K.& AKOBUNDU, I.O. Agronomic and economic benefits of nitrogen contributed by legumes in live-mulch and alley cropping systems. In: Nitrogen Fixation: Achievements and objectives. **Chapman and Hall**, New York, p 625-632, 1990.
- MUNNS, D.N.; KEYSER, H.H. Response of *Rhizobium* strains to acid aluminium stress. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 13, p. 115-118, 1981.
- NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J.L. de. (ED). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. p. 15-60, 1998.
- NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 889-895, 1997.
- NICK, G.; de LAJUDIE, P.; EARDLY, B. D.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; ZHANG, X.; GILLIS, M.; LINDSTRÖM, K. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1359-1368, 1999.
- NORRIS, D.O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, v.22, n.2, p.143-166, 1965.
- NORRIS, D.O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East Africa Agriculture and Forest Journal**, v. 29, p. 214-235, 1964.
- NOUR, S.M.; CLEYT-MAREL, J.C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M.P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 640-648, 1995.
- NOUR, S.M.; CLEYT-MAREL, J.C.; BECK, D. EFFOSSE, A.; FERNANDEZ, M.P. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 345-354, 1994.
- ODUM, E. P. Ecologia (tradução). **Editora Guanabara**, RJ. 434p., 1988.
- OLIVEIRA, F. L; GUERRA, JGM; JUNQUEIRA, RM; SILVA, EE; OLIVEIRA, FF; ESPINDOLA, JAA; ALMEIDA, DL; RIBEIRO, RLD; URQUIAGA, S. Crescimento e produtividade do inhame cultivado entre faixas de guandu em sistema orgânico. **Horticultura Brasileira**, v.24, p.53-58, 2006.

- OLIVEIRA, L. A.; GRAHAM, P. H. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* using a nod⁺ fix⁻ natural mutant. **Archives of Microbiology**, v. 54, p. 305-310, 1990.
- PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p. 23-28, 1990.
- PANKHURST, C.E.; LYNCH, J.M. The role of the soil biota in sustainable agriculture. In: PANKHURST, C.E.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R.; GRACE, P.R., eds. **Soil Biota: Management in sustainable farming systems**. p. 3-9, 1994.
- PASSOS, S.R.; DOMINGUES, C.S.; LEITE, J.; MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G. diversidade genotípica de rizóbios isolados de feijão-caupi no submédio do Vale do São Francisco. MS 56. XI Encontro Brasileiro de Microbiologia Ambiental. **Anais...** Fortaleza, 2008.
- PAVAN, C.; MOREIRA FILHO, C.A. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio na Agronomia. **Biodiversidade e Agronomia**. 1998 Disponível em <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio04/4hp_11.asp>. Acesso em: 05/09/2008.
- PEREIRA, A. J. **Produção de biomassa aérea e sementes de *Crotalaria juncea* a partir de diferentes densidades populacionais e épocas do ano**. 2004, 130 p. UFRRJ, Seropédica-RJ. (Dissertação Mestrado em Fitotecnia), 2004.
- PEREIRA, J.C.; GAVA, C.A.T.; NEVES, M.C.P. Avaliação da resistência natural de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli a antibióticos e ao antagonismo promovido por actinomicetos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3ª REUNIÃO DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM E BRADYRHIZOBIUM, 6, Londrina, 1994. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1994, p.120.
- PERIN, A.; SANTOS, R. H. S.; URQUIAGA, S.; GUERRA, J. G. M.; CECON, P. R. Efeito residual da adubação verde no rendimento de brócolo (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) cultivado em sucessão ao milho. **Ciência Rural**, v. 34, p.1739-1745, 2004.
- PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W.J.. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.180-201, 2000.
- PINTO-COELHO, R. M..**Fundamentos em Ecologia**, PortoAlegre, Artmed, 252p., 2000.
- PUEPPKE, S.G.; BROUGHTON, W.J. Rhizobium sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.293-318, 1999.
- QUAN, Z.; BAE, H.; BAEK, CHEN, W.; IM, W.; LEE, S. *Rhizobium daejeonense* sp. Nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 55, p. 2543-2549, 2005.
- RAO, M.R., MATHUVA, M.N. Legumes for improving maize yields and income in semi-arid Kenya. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 78, n. 2, p. 123-137, 2000.
- REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L. DE M. DE.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: Nutrição mineral de Plantas. **Sociedade Brasileira de Ciência do solo**, Viçosa, p.153-252, 2006.
- RENIER, A.; JOURAND, P.; RAPIOR, S.; POINSOT, V.; SY, A.; DREYFUS, B.; MOULIN, L. Symbiotic properties of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T: A classic process for an atypical symbiont. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 40, p. 1404-1412. 2008.

- RIBASKI, J., MONTOYA, L. J., RODIGHERI, H.R. Sistemas Agroflorestais: aspectos ambientais e socioeconômicos. In: Agricultura Alternativa, **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 212, p. 61-67, 2001
- RODRIGUES, E. F. G.; DE-POLLI, H.; EIRA, P. A. Inoculação, calagem e adubação para mucuna-preta e feijão-de-porco num solo Podzólico Vermelho-Amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 807-814, 1994.
- ROME, S.; FERNANDEZ, M.P.; BRUNEL, B.; NORMAND, P.; CLEYTEL-MAREL, J.C. *Shinorhizobium medicae* sp. nov. isolated from annual *Medicago* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, p. 972-980, 1996.
- ROSENBLUETH, M. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. n.19, p.827-837, 2006.
- RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.V.; MORGADO, L. B. NEVES, M. C. P. Feijão-Caupi tem uma nova Estirpe de Rizóbio, BR3267, Recomendada como Inoculante. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento**, n.15, p.16, 2006.
- RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, Cap. 8, p. 281-335, 2005.
- SANGINGA, N.; MULONGOY. K.; SWIFT, M.J. Contribution of soil organisms to the sustainability and productive systems in the tropics. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, v. 41, p. 135-152, 1992.
- SCHOLLA, M.H.; MOOREFIELD, J.A.; ELKAN, G.H. Deoxyribonucleic acid homology between fast-growing soybean-nodulating bacteria and other rhizobia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 283-286, 1984.
- 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, p. 374-377, 1993.
- SÉGUY, L.; BOUZINAC, S.; TRENTINI, A.; CORTES, N. de A. Gestão da fertilidade de culturas mecanizadas nos trópicos úmidos: o caso das frentes pioneiras nos cerrados e florestas úmidas no centro norte do Mato Grosso. In: PEIXOTO, R.T. dos G.; AHRENS, D.C.; SAMAHA, M.J. (Ed.). **Plantio direto: o caminho para uma agricultura sustentável**. Ponta Grossa: IAPAR, p.124-157, 1997.
- SHARMA, S.; ANEJA, M.K.; MAYER, J.; MUNCH, J.C.; SCHLOTTER, M. (2005a) Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes. **Applied Environment Microbiology**. v. 71, p.2001-2007, 2005.
- SHARMA; S.; DEV, S. P.; RAMESHWAR; S. S. Effect of green manuring of sunnhemp (*Crotalaria juncea* L.) on rice yield, nitrogen turnover and soil properties. **Crop Research**. v. 19, p. 418- 423, 2000.
- SIDIRAS, N.; DERPSCH, R.; HEINZMANN, F.X. Influência da adubação verde de inverno e seu efeito residual sobre o rendimento nas culturas de verão, em Latossolo Roxo Distrófico. **Plantio Direto**, v.2, n.9, p.4-5, 1984.
- SIKORA, S.; REDŽEPOVIC, S.; PEJIC, I.; KOZUMPLIK, V. Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* field population revealed by RAPD fingerprinting. **Journal Applied Microbiology**, v.82, p.527-531, 1997.

- SILVA, G.; LIMA, A.; NOSOLINE, S.; RUMJANEK, N.; XAVIER, G. Seleção de inoculante rizobiano para feijão-de-porco. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p.1232-1235, 2007.
- SINGLETON, P. W.; TAVARES, J. S. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* population. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 1013-1018, 1986.
- SMYTH, T.J.; CRAVO, M.S.; MELGAR, R.J. Nitrogen supplied to corn by legumes in a Central Amazon Oxisol. **Tropical Agriculture**, v.68, n.4, p.366-372, 1991.
- SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.
- SOUZA, R. A. de; HUNGRIA M.; FRANCHINI, J. C.; CHUEIRE, L. M. de O.; BARCELLOS, F. G.; CAMPO, R. J. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.1, p.71-82, 2008.
- SQUARTINI, A.; STRUFII, P.; DÖRING, H.; SELNSKA-POBELL, S.; TOLA, E.; GIACOMINI, A.; VENDRAMIN, E.; VELÁSQUEZ, E.; MATEOS, P. F.; MATÍNEZ-MOLINA, E.; DAZZO, F. B.; CASELLA, S.; NUTI, M. P. *Rhizobium sullae* SP. Nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*') the root-nodule microsymbiot of *Hedysarum coronarium* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1267-1276, 2002.
- STAMPFORD, N. P.; CHAMBER, P.M.; CAMACHO, M.M. Symbiotic effectiveness of several tropical *Bradyrhizobium* strains on cowpea under a long-term exposure to nitrate: relationships between nitrogen and nitrate reduction activities. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, p. 378-382, 1995.
- STAMPFORD, N. P.; ALBUQUERQUE, M. H.; SANTOS, D. R. Aproveitamento do nitrogênio pelo sorgo em sucessão a leguminosas incorporadas em diferentes épocas de corte. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, n. 2, p. 221-227, 1994.
- STARKANOVA, G.; VORISEK, K.; MIKANOVA, O.; RONDOVA, D. P-solubilization activity of *rhizobium* species strains. **Rostlinna Vyroba**, v. 45, p. 403-406, 1999.
- STEWART, B.A.; LAL, R.; EL-SWAIFY, S.A. Sustaining the resource base of expanding world agriculture. In: LAL, R.; PIERCE, F.J. (eds.). **Soil management for sustainability**. Ankeny: Soil and Water Conservation Society, p.125-14, 1991.
- STOWERS, M. D.; ELKAN, G. H. Growth and nutritional characteristics of cowpea rhizobia. **Plant and Soil**, v. 80, p. 191-200, 1984.
- TAN, Z. Y.; KAN, G.X.; WANG, E.T.; REINHOLD-HUREK, B.; CHEN, W.X.; *Rhizobium yanglingense* sp. Nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, v. 51, p. 901-914, 2001.
- THIES, J.E.; BOHLOOL, B.; SINGLETON, P.W. Subgroups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaeae*, *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p. 1540-1545, 1991a.
- THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations of establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 19-28, 1991b.

- TOLEDO, I.; LLORET, L.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Sinorhizobium americanum* SP. Nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating *Acácia* spp. In México. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 54-64, 2003.
- TORO, N. Nodulation competitiveness in Rhizobium-legume symbiosis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, p. 157-162, 1996.
- URQUIAGA, S.; ZAPATA, F. Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe. **Genesis**, 100 p., 2000.
- VALLE, L. A. C.; DIAS, W. P.; FERRAZ, S. Reação de algumas espécies vegetais, principalmente leguminosas ao nematóide de cisto da soja *Heterodera GlycinesIchinohe*. **Nematologia Brasileira**, v.20, n. 2, p.30-40, 1996.
- VAN BERKUM, P.; LEIBOLD, J. M.; EARDLY, B. D. Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynoe indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. Nov). **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p. 207-215, 2006.
- VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. The Aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aechinomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 1132-1136, 2002.
- VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPEBEL, T.A.; EARDLY, B.D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of the three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 13-22, 1998.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. **Melhoramento de espécies cultivadas**. In: BORÉM, A. (Ed.), Viçosa. UFV., p. 273-342, 1999.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, Blackwell Scientific, 164p, 1970.
- VINUESA, P.; LÉON-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., a acid tolerant endosymbiont that nodulates genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. Genistearum, *Bradyrhizobium genoppecies* and *Bradyrhizobium genoppecies* b. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p.569-575, 2005.
- WADISIRISUK, P.; WEAVER, R.W. Importance of bacteroid number in nodules and effective nodule mass to dinitrogen fixation by cowpeas. **Plant and Soil**, v.87, p.223-231, 1985.
- WANG, E.T.; TAN, Z.Y.; WILLEMS, A.; FRNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; REINHOLD-HUREK, B. MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Sinorhizobium morelense* sp. Nov. *Leucena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1687-1693, 2002.
- WANG, E.T.; VAN BERKUM, P.; SUI, X. H.; BEYENE, D.; CHEN, W. X.; MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 51-65, 1999.
- WANG, E.T.; VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; SUI, X.-H.; DORADO, O.; CHEN, W.X.; MAERTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huatlense* sp. nov. a symbiont of *Sesbania hebecae* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 687-699, 1998.

- WANI, S.P.; RUPELA, O.P.; LEE, K.K. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen in grain legumes. **Plant and Soil**, v. 174, p. 29-49, 1995.
- ZHANG, W. T., JIANG KE YANG, TIAN YING YUAN AND JUN CHU ZHOU. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, v.1, n.44, p.201-210, 2007.
- WEI, G.H.; WANG, E.T.; ZHU, M.E.; HAN, S. Z.; CHEN, W.X. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera Astragalus, Lespedeza grown in Loess Plateau region of China and description of *Rhizobium loessense* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1575-1583, 2003.
- WEI, G.H.; WANG, E.T.; TAN, M.E.; ZHU, M.E.; CHEN, W.X. *Rhizobium indigoferae* sp. Nov. and *Sinorhizobium Kummerowiae* sp. Nov respectively isolated from indigofera spp. And Kuerowia stipulacea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p.2231-2239, 2002.
- WOLFF, A. B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J. A.; VARGAS, H.; WERNER, D. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. **Biology and Fertility of Soils**, v. 12, p. 170-176, 1991.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, p. 386-392, 1998.
- XU, L.M.; GE, C., CUI, Z., LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 706-711, 1995.
- YAO, Z. Y.; KAN, F. L.; WANG, E. T.; W. X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species within the genus Lespedeza and description of *Bradyrhizobium yuanmigenae* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.52, p. 2219-2230, 2002
- ZILLI, J. E.; SMIDERLE, O.J.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. População microbiana em solo com soja e tratado com diferentes herbicidas m área de Cerrado no estado de Roraima. **Acta Amazônica**, v. 37, p. 201-212, 2007.
- ZILLI, J.É.; VALISHESKI, R.R.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, p. 281-287, 2004.
- ZILLI, J. E. **Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para inoculação de caupi [*vigna unguiculata* (l) walp] em áreas de Cerrado**. Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, Seropédica, RJ (Dissertação de Mestrado), 94p., 2001.

ANEXO I

Caracterização Morfológica de Isolados de Rizóbio obtidos de nódulos de mucuna anã do SIPA.

Isolado	Tempo de Crescimento	pH	Tamanho	Forma	Elevação	Borda	Transparência	Aparência colônia	Cor	Ap. muco	Elasticidade	Limpa Placa
A_cauli_	Inteiro	alcalino	3	Circular	convexa	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	1	não
B_elkani	Lento	alcalino	4	Circular	convexa	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	1	não
R_tropici	Rápido	Ácido	4	Circular	convexa	Inteiro	Transparente	HO	amarelado	HO	1	não
S_fredii	Rápido	Ácido	4	Circular	convexa	Inteiro	Transparente	HE	amarelado	HO	1	não
M_ciceri	Inteiro	Ácido	7	Circular	convexa	Inteiro	Transparente	HO	amarelado	HO	2	não
M1(1.2)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	convexa	Inteiro	Tranlúcido	HE	branca-amarelada	HE	1	sim
M1	Rápido	Básico	1mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	branca	HO	1	não
M1(3)	Rápido	Ácido	10 mm	Circular	convexa	Inteiro	Transparente	HO	Branca	HO	3	não
M1(4)	Rápido	Ácido	7mm	Circular	lente	Inteiro	Transparente	HO	Branca	HO	2	não
M1(5)	Rápido	Básico	1mm	Irregular	plana	Recortada	Transparente	HO	fosforescente	HO	1	sim
M14a	Rápido	Ácido	3mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	Branca	HO	2	sim
M14	Rápido	Ácido	5mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	Branca	HE	1	não
M14(3)	Rápido	Ácido	6mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	Branca	HE	1	não
M14(4)a	Rápido	Ácido	6mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca-amarel	HO	1	não
M14(5)	Rápido	Ácido	2mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	branca	HO	1	sim
M18	Rápido	Ácido.	2mm	Circular.	plana	ondulada	opaco	HE	*bran/amarel	HO	2	sim
M18	Rápido	Ácido.	<1mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M18(3)	Lento (6d)	Básico.	3mm	Circular.	lente	Inteiro	Transparente	HO	branco	HO	1	sim
M18(4)	Lento (6d)	Básico.	5mm	Irregular.	lente	Recortada	Transparente	HO	branco	HO	1	sim
M18(5)	Rápido	Ácido.	3mm	Circular.	conv.	Inteiro	Transpa.	HO	Branco	HO	2	sim
M21	Rápido	Ácido	5mm	Circular	lente	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	1	não
M21	Rápido	Ácido	6mm	Circular	lente	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	1	não
M21(3)	Rápido	Ácido	9mm	Circular	convexa	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	1	não
M21(4)	Rápido	Ácido	5mm	Circular	lente	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	1	não
M21(5)	Rápido	Ácido	10 mm	Circular	convexa	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	2	não

M30	Rápido	Ácido	5mm	Circular	lente	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	2	não
M30	Rápido	Ácido	2mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
M30(3)	Lento (6d)	Básico	10mm	Irregular	convexa	Recortada	Tranlúcido	HE	branca	HE	1	não
M30(5)	Rápido	Ácido	2mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	branca	HO	1	sim
M32	Lento (6d)	Básicoo.	7mm	Circular.	conv.	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M32(3)	Lento (6d)	Básico.	2mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HE	*bran/amarel	HE	1	sim
M32(4)	Rápido	Ácido.	<1mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	amarelado	HO	1	sim
M32(5)	Lento (6d)	Básicoo.	8mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M32	Lento (6d)	Básicoo.	3mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M33	Rápido	Ácido	6mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	branca	HE	1	não
M33	Rápido	Ácido	5mm	Circular	lente	Inteiro	Transparente	HE	branca	HE	1	não
M33(3.1)	Rápido	Ácido	3mm	Circular	plana	Recortada	opaca	HE	Centro amar	HO	1	sim
M33(4)	Rápido	Ácido	3mm	Circular	plana	Inteiro	Tranlúcido	HE	branca	HE	1	sim
M33(5)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	Centro amar	HE	1	sim
M34	Rápido	Ácido	3mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HE	Centro amar	HO	1	sim
M34	Rápido	Ácido	6mm	Circular	lente	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	1	sim
M34(3)	Rápido	Ácido	5mm	Irregular	plana	Inteiro	opaca	HE	branca	HE	1	sim
M34(4)	Rápido	Ácido	6mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	branca	HE	1	sim
M34(5)	Rápido	Ácido	2mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
M36	Rápido	Ácido	5mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	centro amar	HE	1	não
M36	Rápido	Ácido	9mm	Circular	convexa	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca	HO	1	não
M36(3)	Rápido	Ácido	5mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	centro amar	HE	1	não
M36(5)	Rápido	Ácido	5mm	Circular	convexa	Inteiro	Transparente	HE	centro amar	HE	2	não
M36	Rápido	Ácido	3mm	Circular	plana	Recortada	Transparente	HO	Transparente	HO	1	sim
M38	Rápido	Ácido	3mm	Irregular	plana	Recortada	opaca	HO	amarelo	HE	1	não
M38(3)	Lento (6d)	Básico	1mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	branca	HO	1	não
M38(4)	Rápido	Ácido	1mm	Circular	plana	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca	HO	1	sim
M38(5)	Lento (6d)	Básico	8mm	Irregular	convexa	Recortada	Tranlúcido	HO	branca	HE	1	não
M38(7)	Rápido	Ácido	6mm	Circular	convexa	Inteiro	opaca	HO	branca	HO	1	sim
M40	Lento (6d)	Básico	4mm	Circular	convexa	Inteiro	Tranlúcido	HE	branca	HE	2	não

M40	Rápido	Ácido	1mm	Circular	plana	Inteiro	Tranlúcido	HO	amarelo	HO	1	sim
M40(3)	Rápido	Básico	4mm	Circular	plana	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	1	sim
M40(4)	Rápido	Ácido	6mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	branca	HO	1	sim
M40	Lento (6d)	Básico	4mm	Circular	convexa	Inteiro	Tranlúcido	HE	branca	HE	1	não
M45	Rápido	Ácido	5mm	Circular	lente	Inteiro	Transparente	HE	branca	HE	1	não
M45	Rápido	Ácido	4mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	branca	HE	2	sim
M45(3)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	lente	Inteiro	opaca	HE	Centro amar	HE	1	não
M45(4)	Rápido	Ácido	10 mm	Irregular	convexa	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	1	não
M45(5)	Rápido	Ácido	3mm	Circular	lente	Inteiro	opaca	HO	branca	HO	2	não
M46	Rápido	Ácido	2mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca	HO	1	sim
M46	Rápido	Ácido	3mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca	HO	1	não
M46(3.2)	Rápido	Ácido	2mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	branca	HO	1	sim
M46(4)	Lento (6d)	Básico	6mm	Irregular	plana	Inteiro	Tranlúcido	HE	branca	HE	1	sim
M46(7)	Rápido	Ácido	4mm	Irregular	plana	Inteiro	opaca	HE	amarelo	HO	1	sim
M48	Rápido	Ácido	3mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HE	Centro amar	HO	1	sim
M48	Rápido	Ácido	2mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	branca	HO	1	sim
M48(3)	Rápido	Ácido	1mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	branca-amar	HO	1	sim
M48(4)	Rápido	Ácido	5mm	Irregular	plana	Inteiro	opaca	HE	centro amar	HE	1	sim
M48(5)	Rápido	Ácido	5mm	Circular	lente	Inteiro	opaca	HE	branca	HE	1	não
M5	Rápido	Ácido	11mm	Circular	convexa	Inteiro	Transparente	HO	branca	HO	1	não
M5	Rápido	Ácido	2mm	Circular	lente	Inteiro	opaca	HO	branca	HO	1	não
M5(3.2)	Rápido	Ácido	7mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca	HO	1	não
M5(5)	Rápido	Ácido	2mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca	HO	2	não
M5	Rápido	Ácido	7mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca	HO	1	não
M6	Rápido	Ácido	4mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca	HO	1	não
M6(2.1)	Rápido	Básico	7mm	Irregular	plana	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca	HO	1	sim
M6(3)	Rápido	Ácido	3mm	Circular	lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	branca	HO	2	não
M6(4.2)	Rápido	Ácido	2mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	branca	HO	1	sim
M6(5)	Rápido	Ácido	<1mm	Circular	plana	Inteiro	opaca	HO	amarelo	HO	1	não

HO: Homogêneo; HE: Heterogêneo

ANEXO II

Caracterização Morfológica de Isolados de Rizóbio obtidos de nódulos de mucuna cinza do SIPA.

Isolado	Tempo de crescimento	pH	Tamanho	Forma	Elevação	Borda	Transparência	Aparência colônia	Cor	Ap. muco	Elasticidade.	Limpa placa
A1M3(1.1)	Rápido	Ácido.	2mm	Circular.	plana	ondulada	opaco	HE	Centro. amar	HO	1	sim
aM26(3)	Rápido	Ácido	2mm	Circular.	plana	Inteiro	Transparente	HO	branco	HO	1	sim
M12	Rápido	Ácido	4mm	Circular.	conv.	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	não
M12(3.2)	Rápido	Ácido	4mm	Circular.	plana	Recortada	opaco	HO	Centro. amar	HO	1	sim
M12(4)	Rápido	Ácido	<1mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	2	sim
M12(5)	Rápido	Ácido	6mm	Circular.	conv.	Inteiro	Transparente.	HO	branco	HO	1	sim
M12	lento	Básico	5mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M13	Rápido	Ácido	4mm	Irregular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	não
M13	Rápido	Ácido	6mm	Circular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HE	branco	HE	1	não
M13(3)	Rápido	Ácido	5mm	Circular.	lente	Inteiro	opaco	HE	branco	HE	1	não
M13(4)	Rápido	Ácido	3mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HE	branco	HE	1	não
M13(5)	Rápido	Ácido.	4mm	Circular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HE	branco	HE	1	não
M15(3)	Rápido	Ácido.	<1mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	amar	HO	1	não
M15(4)	Rápido	Ácido.	5mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	branco	HO	1	não
M15(5)	Rápido	Ácido.	<1mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	branco	HO	1	não
M15	Rápido	Ácido.	1mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HO	Centro amar	HO	1	sim
M15(7)	Lento	Básico.	3mm	Irregular.	lente	Inteiro	Transparente.	HO	branco	HO	1	sim
M17	Rápido	Ácido.	5mm	Circular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HE	branco	HE	1	não
M17	Rápido	Ácido.	4mm	Circular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HE	branco	HO	1	não
M17(3)	Rápido	Ácido.	5mm	Circular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HE	branco	HE	1	não
M17(4)	Rápido	Ácido.	5mm	Circular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HE	branco	HO	1	não
M17	lento	Básico.	4mm	Circular.	lente	Inteiro	Transparente.	HO	branco	HO	1	não
M2(1.1)	Rápido	Ácido.	1mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	2	sim
M2(2.1)	Rápido	Ácido.	4mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HE	branco	HE	2	sim
M2(3)	Rápido	Ácido.	1mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	branco	HO	1	sim

M2(4)	Rápido	Ácido.	2mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	branco	HO	1	sim
M2	Rápido	Básico	5mm	Irregular.	plana	Recortada	opaco	HE	Centro amarel	HE	1	sim
M23	Rápido	Ácido.	4mm	Circular.	plana	Inteiro	Transparente.	HO	branco	HO	1	sim
M23	Rápido	Ácido.	6mm	Irregular.	conv.	Inteiro	Transparente.	HO	branco	HO	1	sim
M23(3)	Rápido	Ácido.	4mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HE	branco	HE	1	sim
M23(4)	Rápido	Ácido.	5mm	Circular.	conv.	Inteiro	Transparente.	HO	branco	HO	1	sim
M23(5)	Rápido	Ácido.	6mm	Circular.	conv.	Inteiro	Transparente.	HO	Centro amar	HO	1	não
M24	lento	Básico.	9mm	Irregular.	lente	Inteiro	Transparente	HO	branco	HO	1	sim
M24	lento	Básico.	4mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M24(3)	lento	Básico.	6mm	Circular.	lente	Inteiro	Transparente	HO	branco	HO	1	sim
M24(4)	lento	Básico.	6mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	não
M24(7)	lento	Básico.	6mm	Circular.	lente	Inteiro	Transparente	HO	branco	HO	1	sim
M25	lento	Básico.	4mm	Irregular.	lente	Inteiro	Transparente	HO	branco	HO	1	sim
M25(3)	lento	Básico	4mm	Irregular.	lente	Inteiro	Transparente	HO	branco	HO	1	não
M25(4)	lento	Básico.	8mm	Circular.	conv.	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	2	sim
M25(5)	lento	Básico.	9mm	Circular.	conv.	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M25(7)	lento	Básico.	4mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M26(1.2)	Rápido	Ácido.	2mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	Centro amar	HO	1	sim
M26	Rápido	Ácido.	2mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	2	sim
M26(4.2)	Rápido	Ácido.	5mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HE	Centro-marel	HO	1	sim
M26	Rápido	Ácido.	4mm	Circular.	lente	Inteiro	opaco	HO	branco	HO	1	sim
M3(1.2)	Rápido	Ácido.	5mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HE	branco	HE	1	sim
M3(3)	Rápido	Ácido.	2mm	Irregular.	plana	ondulada	opaco	HO	fosforescente	HO	1	sim
M3(4)	lento	Básico	7mm	Circular.	conv.	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M3	lento	Básico	6mm	Circular.	conv.	Inteiro	Transparente	HO	branco	HO	1	sim
M31	Rápido	Ácido.	<1mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HO	amarelado	HO	1	sim
M31(13)	lento	Básico	9mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	não
M31	Rápido	Ácido.	2mm	Circular.	lente	Inteiro	opaco	HO	branco	HO	1	sim
M31	lento	Básico	3mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M31(7)	lento	Básico	4mm	Circular.	conv.	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim

M41	Rápido	Ácido	2mm	Circular.	plana	ondulada	opaco	HO	Centro amar	HO	1	sim
M41	Rápido	Ácido.	<1mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	amar	HO	1	sim
M41(3)	Rápido	Ácido.	<1mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	amar	HO	1	sim
M41(4)	Rápido	Ácido.	<1mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	Centro amar	HO	1	sim
M41(5)	Rápido	Ácido.	3mm	Circular.	plana	ondulada	opaco	HO	Centro amar	HO	1	sim
M44	Rápido	Ácido.	2mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	2	sim
M44	Rápido	Ácido.	3mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	2	sim
M44(5)	lento	Básico.	4mm	Irregular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M44	lento	Básico.	6mm	Circular.	conv.	Inteiro	Transparente	HO	branco	HO	1	sim
M44(7)	lento	Básico.	4mm	Circular.	lente	Inteiro	Transparente	HO	branco	HO	1	sim
M47	Rápido	Básico.	1,5mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim
M47	Rápido	Ácido.	3mm	Circular.	plana	Recortada	opaco	HO	amarelado	HO	1	sim
M47(3)	Rápido	Ácido.	4mm	Circular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	2	sim
M47(4)	Rápido	Ácido.	2mm	Circular.	plana	Recortada	opaco	HO	amarelado	HO	1	sim
M47(5)	Rápido	Ácido.	<1mm	Circular.	plana	Inteiro	Transparente	HO	amarelado	HO	1	sim
M7	Rápido	Ácido.	5mm	Circular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	2	sim
M7	Rápido	Ácido.	4mm	Irregular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HE	2	sim
M7(3)	Rápido	Ácido.	4mm	Circular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	2	sim
M7(4)	Rápido	Ácido.	5mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HE	Centro amar	HE	1	sim
M7(5)	Rápido	Ácido.	4mm	Circular.	lente	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HE	2	sim
M9	Rápido	Ácido.	2mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	branco	HO	1	sim
M9(2.1)	Rápido	Ácido.	2mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	Centro amar	HO	1	sim
M9(3)	Rápido	Ácido.	1mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HO	amarelado	HO	1	sim
M9(4.1)	Rápido	Ácido.	1mm	Circular.	plana	Inteiro	opaco	HO	Centro amar	HO	1	sim
M9(5)	Rápido	Ácido.	2mm	Circular.	plana	Inteiro	Tranlúcido.	HO	branco	HO	1	sim

HO: Homogêneo; HE: Heterogêneo

ANEXO III

Caracterização Morfológica de Isolados de Rizóbio obtidos de nódulos de mucuna preta do SIPA.

Isolado	Tempo de Crescimento	pH	Tamanho	Forma	Elevação	Borda	Transparência	Aparência	Cor	Ap. muco	Elasti- cidade	Limpa Placa
M10a	Rápido	Ácido	2mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M10b	Rápido	Ácido.	3mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M10(3)	Rápido	Ácido	< 1mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M10(4)	Rápido	Ácido	< 1mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M10(5)	Rápido	Ácido	< 1mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M11	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HE	1	Sim
M11a	Rápido	Ácido	5mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Br. Transparente	HO	1	Sim
M11b	Rápido	Ácido	6mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Br. Transparente	HO	1	Sim
M11(4)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HE	2	Sim
M11a	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Conv	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M16	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Lente	Inteiro	Opaca	HE	Branco	HE	1	Não
M16	Rápido	Ácido	3mm	Irregular	Plana	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	2	Sim
M16(3)	Rápido	Ácido	5mm	Circular	Lente	Inteiro	Opaca	HE	Branco	HE	1	Sim
M16(4)	Rápido	Ácido	5mm	Circular	Lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	Branco	HO	1	Não
M16(5)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	Branco	HO	1	Não
M19	Rápido	Ácido	5mm	Irregular	Conv	Ond	Tranlúcido	HE	Branco	HO	3	Não
M19(3)	Rápido	Ácido	5mm	Irregular	Conv	Ond	Tranlúcido	HE	Branco	HO	3	Não
M19(3)b	Rápido	Ácido	5mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	2	Sim
M19(4)	Rápido	Ácido	8mm	Irregular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HE	Branco	HE	1	Não
M19	Rápido	Ácido	< 1mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M20	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M20	Rápido	Ácido	6mm	Circular	Lente	Inteiro	Tranlúcido	HE	Branco	HE	1	Não
M20(3)b	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HE	Branco	HO	1	Sim
M20(4)	Rápido	Ácido	1mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Não
M20b1	Rápido	Ácido	1mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M22	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HE	1	Não

M22	Rápido	Ácido	11mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Não
M22(3)	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Plana	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Sim
M22(4)	Rápido	Ácido	8mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HE	Branco	HE	1	Não
M22(5)b	Rápido	Ácido	2mm	Circular	Lente	Inteiro	Opaca	HE	Branco	HO	1	Sim
M27	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M27	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M27(3)	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M27(4)	Rápido	Ácido	2mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M27	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M28(3)	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Conv	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M28(4)	Rápido	Ácido	1mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M28(5)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HE	2	Sim
M28	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Lente	Inteiro	Opaca	HE	Branco	HO	1	Sim
M28(7)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HE	Branco	HO	1	Sim
M29(3)	Rápido	Ácido	2,5mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M29(4)	Rápido	Ácido	2mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M29(5)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HE	1	Sim
M29	Rápido	Ácido	2mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M29(7)	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M35	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M35	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Lente	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M35(4)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M35(5)	Rápido	Ácido	< 1mm	Circular	Plana	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Sim
M35	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Lente	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M37	Rápido	Ácido	2mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M37(3)	Rápido	Ácido	9mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	3	Não
M37(5)	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M37	Rápido	Ácido	9mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	2	Não
M37(7)	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M39	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M39	Rápido	Ácido	3mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M39(3)	Rápido	Ácido	2mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim

M39(4)	Rápido	Ácido	1,5mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M39(7)	Rápido	Ácido	2,5mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim
M4a	Rápido	Ácido	6mm	Circular	Lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Sim
M4	Rápido	Ácido	2mm	Circular	Plana	Inteiro	Tranlúcido	HE	Br. Transparente	HE	1	Sim
M4(3)a	Rápido	Ácido	6mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Sim
M4(4)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	2	Sim
M4(5)a	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Sim
M42	Rápido	Ácido	7mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Sim
M42	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Lente	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Sim
M42(3)	Rápido	Ácido	7mm	Circular	Conv	Inteiro	Opaca	HO	Branco	HO	2	Sim
M42(4)	Rápido	Ácido	< 1mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M42(5)	Rápido	Ácido	6mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HO	Branco	HO	2	Sim
M43	Rápido	Ácido.	< 1mm	Circular	Plana	Inteiro.	Opaca	HO	Amarelo	HO	1	Sim
M43(3)	Rápido	Ácido.	4mm	Circular	Conv	Inteiro.	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Sim
M43(4)	Rápido	Ácido.	6mm	Irregular	Plana	Recortada	Tranlúcido	HE	Branco	HE	1	Sim
M43(5)b	Rápido	Ácido.	9mm	Irregular	Conv	Inteiro.	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Sim
M43	Rápido	Ácido.	2mm	Circular	Conv	Inteiro.	Tranlúcido	HO	Branco	HO	1	Sim
M8a1	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Lente	Inteiro	Opaca	HE	Branco	HO	1	Sim
M8	Rápido	Ácido	5mm	Circular	Conv	Inteiro	Tranlúcido	HE	Branco	HO	2	Sim
M8(3)a1	Rápido	Ácido	2mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HE	Branco	HO	1	Sim
M8(4)b	Rápido	Ácido	2mm	Circular	Plana	Inteiro	Opaca	HE	Branco	HO	1	Sim
M8(5)	Rápido	Ácido	4mm	Circular	Plana	Recortada	Opaca	HO	Branco	HO	1	Sim

HO: Homogêneo; HE: Heterogêneo