

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
ANA BEATRIZ CARVALHO TERRA

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS EM ÁREAS DE PASTAGENS DE *Brachiaria*
decumbens: EFICÁCIA E SINERGISMO DA COINOCULAÇÃO COM *Azospirillum*
brasilense EM LEGUMINOSAS**

ALFENAS – MG
2018

ANA BEATRIZ CARVALHO TERRA

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS EM ÁREAS DE PASTAGENS DE *Brachiaria*
decumbens: EFICÁCIA E SINERGISMO DA COINOCULAÇÃO COM *Azospirillum*
brasilense EM LEGUMINOSAS**

Dissertação apresentada à
Universidade José do Rosário Vellano –
UNIFENAS como parte das exigências para
obtenção de título de Mestre em Ciência
Animal

Orientador: Prof. Dra. Ligiane A. Florentino

ALFENAS – MG
2018

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
Biblioteca Central da UNIFENAS

Terra, Ana Beatriz Carvalho

Diversidade de rizóbios em áreas de pastagens de
brachiaria decumbes: eficácia e sinergismo da coinoculação
com azospirillum brasilense em leguminosas / Ana Beatriz
Carvalho Terra. — Alfenas, 2018.

51f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ligiane A. Florentino

Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em
Ciência Animal – Universidade José do Rosário Vellano,
Alfenas, 2018.

1. Eficiência simbiótica. 2. Fixação biológica de nitrogênio.
3. Leguminosas forrageiras. I. Universidade José do
Rosário Vellano. II. Título

CDU 633.2 (043.3)

Samira Vidal da Silva Ramos
Bibliotecária CRB6 3474



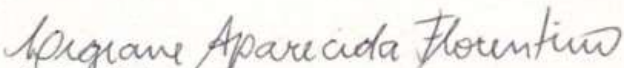
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

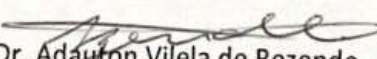
Título: "Diversidade de rizóbios em pastagens de *Brachiaria decumbens*: Eficácia e sinergismo da coinoculação com *Azospirillum brasilense* em leguminosas"

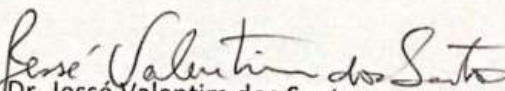
Autor: Ana Beatriz Carvalho Terra

Orientador: Profa. Dra. Ligiane Aparecida Florentino

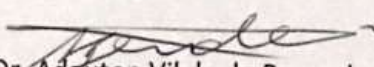
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL** pela Comissão Examinadora.


Profa. Dra. Ligiane Aparecida Florentino
orientadora


Prof. Dr. Adauton Vilela de Rezende


Prof. Dr. Jessé Valentim dos Santos

Alfenas, 10 de agosto de 2018.


Prof. Dr. Adauton Vilela de Rezende
Coordenador do Programa
Mestrado em Ciência Animal

Aos meus pais, que sempre serão meus guias

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por serem meu porto seguro e pelo incentivo e investimento na minha educação.

Aos meus avós, por serem inspiração de como nunca desistir de sonhar e voar mais longe e sempre!

Aos meus irmãos, por cada passo que dão ao meu lado e por muitas vezes acreditarem mais em mim do que eu mesma.

Aos amigos da vida, João Pedro, Isabela, Mariah e Rayana, por estarem sempre ao meu lado e por não deixarem que a distância física nos separasse espiritualmente.

Aos amigos que o mestrado me trouxe, por cada palavra e mensagem de apoio mútuo, tornando a caminhada mais leve.

À minha orientadora, Prof. Dra. Ligiane A. Florentino, por ter acreditado em mim desde o início, não me deixando desistir quando parecia que nada ia dar certo.

A todos os professores que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional ao longo desses quase dois anos de mestrado. Ensinar não é uma tarefa fácil, mas vocês conseguem realizá-la com louvor.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa durante todo o período de realização do mestrado.

À UNIFENAS, por todo o suporte para que o trabalho fosse concluído, mostrando que o incentivo à educação e à pesquisa é primordial para mudarmos nosso país.

Aos meus amigos de corrida, que foram responsáveis pela minha saúde física e, principalmente, mental.

E, por fim, mas não menos importante, agradeço à vida e ao universo, por sempre me enviarem seres de luz que suavizam as dores diárias e me fazem acreditar ainda mais que é possível fazer a diferença nesse mundo!

RESUMO

Juntamente com o aumento da população mundial, vem a sua crescente demanda por alimentos, exigindo que o setor agropecuário desenvolva técnicas de manejo que não só favoreçam a produtividade, mas também que reduzam os custos e os impactos ambientais oriundos da produção. Grande parte da área de pastagem do Brasil encontra-se em algum estado de degradação, tornando-se incapaz de suprir a produtividade exigida pelos animais. Nesse sentido, o uso de leguminosas forrageiras tem ganhado destaque como alternativa para possibilitar uma dieta rica em proteínas aos animais e também para reduzir custos com fertilizantes químicos nitrogenados, os quais possuem potencial de poluir cursos d'água e contribuir para o efeito estufa. As leguminosas são capazes de estabelecer interações com microrganismos do solo, denominados diazotróficos, os quais podem ser de vida livre, associativos ou simbióticos, e possuem a capacidade de reduzir a amônia (NH_3) e o nitrogênio atmosférico (N_2) e fornecer esse nutriente às plantas por um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN). Esses microrganismos ainda são capazes de promover o crescimento vegetal por meio de vários processos, como a produção de hormônios de crescimento. O sinergismo entre bactérias simbióticas e associativas tem sido estudado por meio de técnicas de coinoculação, em leguminosas, visando a aumentar a produção das culturas. Os objetivos desse trabalho foram, portanto, avaliar a diversidade de rizóbios encontrados em pastagem com *Brachiaria decumbens* utilizando como plantas iscas amendoim forrageiro, feijão caupi, crotalária e tremoço; e autenticar e avaliar a eficácia da FBN dos isolados bacterianos e os efeitos da coinoculação com *Azospirillum brasilense* (AbV-5) em leguminosas. A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo e no Setor Experimental da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS). Foram utilizadas amostras de solo de quatro áreas distintas dos municípios de Alfenas e Três Pontas (MG). A diversidade de bactérias diazotróficas foi avaliada por meio da caracterização morfológica das colônias bacterianas isoladas de nódulos de plantas iscas, sendo estimada pelo índice de Shannon, sendo possível observar que o amendoim forrageiro foi a leguminosa que apresentou maiores valores de diversidade para todas as áreas avaliadas. Para avaliação de autenticação, eficiência simbiótica e efeitos da coinoculação, foram utilizados dados de matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN) e eficiência simbiótica relativa (EFR). Nessas análises, destacaram-se, para o tremoço, o isolado UNIFENAS 06-03, e para a crotalária, o isolado UNIFENAS 05-21, os quais apresentaram maiores valores de MSPA, MSR e EFR.

Palavras chave: Eficiência simbiótica, fixação biológica de nitrogênio, leguminosas forrageiras

ABSTRACT

Along with the increase in the world's population is its growing demand for food, requiring that the agricultural sector develop management techniques that not only favor productivity but also reduce costs and environmental impacts from production. Much of Brazil's pasture area is in a state of degradation, being unable to supply the productivity required by the animals. Therefore, the use of forage legumes has gained prominence as an alternative to allow a diet rich in proteins to animals, and to reduce costs with nitrogen fertilizers, which are mostly imported and have the potential to pollute water courses and contribute to the greenhouse effect. The legumes can establish interactions with soil microorganisms, called diazotrophic, which can be free living, associative, or symbiotic, that have the capacity to reduce atmospheric nitrogen (N_2) to ammonia (NH_3) and to provide this nutrient to the plants by a process called biological nitrogen fixation (BNF). These microorganisms are also capable of promoting plant growth through various processes, such as the production of growth hormones. The synergism between symbiotic and associative bacteria has been studied, through coinoculation techniques, to increase crop production. The objectives of this study were to evaluate the diversity of diazotrophic bacteria found in pasture soil cultivated under *Brachiaria decumbens*, to authenticate and evaluate the efficiency of BNF in bacterial isolates in lupine and crotalaria, and to analyze the effects of the coinoculation with the strain *Azospirillum brasilense* (AbV-5) in these two legume species. The research was conducted in the Laboratory of Soil Microbiology and Biochemistry and in the Experimental Sector of the José do Rosário Vellano University (UNIFENAS). Soil samples from four distinct areas were collected in the cities of Alfenas and Três Pontas (MG). The diversity of diazotrophic bacteria was evaluated by means of the morphological characterization of bacterial colonies isolated from nodules of bait plants, being estimated by the Shannon index, where it was possible to observe that forage peanut was the legume that showed the highest diversity values for all areas evaluated. The dry matter of the shoot (DMS), dry matter of the root (DMR), number of nodules (NN), nodule dry matter (DMN) and symbiotic efficiency (EFR) were used for evaluation of symbiotic efficiency and effects of coinoculation. In those analysis the isolate UNIFENAS 06-03 and UNIFENAS 05-21 showed better results for lupine and crotalaria, respectively, which presented higher values of MSPA, MSR and EFR.

Key words: Biological nitrogen fixation; Forage legumes; Symbiotic efficiency.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Características morfológicas dos isolados do <i>L. albus</i> , <i>C. spectabilis</i> , <i>V. unguiculata</i> e <i>A. pintoi</i> quanto ao tempo para formação de colônias e alteração do pH do meio.....	37
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classe, família e gênero de rizóbios descritos e capazes de nodular com leguminosas.....	18
Tabela 2 - Cepas autorizadas (SEMIA) para produção de inoculantes para leguminosas forrageiras no Brasil de acordo com a Instrução Normativa DAS nº 13 de 24 de março de 2011.....	18
Tabela 3 - Resultados da análise química das amostras de solo.....	32
Tabela 4 - Valores de diversidade de rizóbios calculados pelo índice de Shannon (H') para cada tipo de solo avaliado, utilizando diferentes plantas iscas.....	38
Tabela 5 - Valores de número de nódulos por vaso (NN), matéria seca da parte aérea (MSPA) (mg.vaso-1), matéria seca da raiz (MSR) (mg.vaso-1) e eficiência relativa (EFR) para <i>Crotalaria spectabilis</i>	40
Tabela 6 - Valores de número de nódulos por vaso (NN), matéria seca da parte aérea (MSPA) (mg.vaso-1), matéria seca da raiz (MSR) (mg.vaso-1) e eficiência relativa (EFR) para <i>Lupinus albus</i>	41
Tabela 7 - Valores observados para o experimento em vaso na ausência e presença de coinoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> , para a <i>Crotalaria spectabilis</i>	45
Tabela 8 - Valores observados para o experimento em vaso na ausência e presença de coinoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> , para <i>Lupinus albus</i>	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em leguminosas forrageiras.....	15
2.2	Diversidade de rizóbios em leguminosas.....	16
2.3	Coinoculação de rizóbios com Azospirillum.....	19
2.4	Tremoço (<i>Lupinus albus</i>)	20
2.5	Crotalária (<i>Crotalaria spectabilis</i>)	21
	REFERÊNCIAS .	23
	ARTIGO.....	29

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e sua crescente demanda por alimentos exerceram fortes pressões sobre o desenvolvimento do setor agropecuário. Aliada à necessidade de aumentar a produtividade, encontra-se uma maior preocupação em relação à produção e desenvolvimento sustentável, exigindo a adoção de sistemas integrados para manejo de nutrientes no solo.

O sistema de pastagem no Brasil é caracterizado pelo modelo extensivo, sendo assim, é comum que, ao longo dos anos essas áreas sejam degradadas e tenham perdas excessivas em sua produtividade. Segundo Macedo *et al.* (2014), estima-se que mais de 50% da área de pastagem no Brasil encontra-se em algum estado de degradação, impossibilitando sua recuperação natural incapacitando a sustentação da produtividade exigida pelos animais (CARVALHO *et al.*, 2017).

Existem diversos métodos para a recuperação de pastagens degradadas, como o uso de fertilizantes químicos que contêm nutrientes essenciais para a melhoria da qualidade do solo e o incremento do crescimento vegetal, que são caracterizados como técnicas diretas de recuperação (CARVALHO *et al.*, 2017), mas que podem se tornar inviáveis do ponto de vista econômico e ambiental. Dessa maneira, o uso de leguminosas forrageiras apresenta-se como alternativa para sistemas agrícolas e pecuários, sendo também difundido pelos seus benefícios na recuperação de áreas degradadas (NOGUEIRA *et al.*, 2012), entre eles, a produção de serapilheira com baixa relação C/N, ocasionando uma maior ciclagem de nutrientes.

Com o intuito de minimizar os impactos ambientais causados pelos fertilizantes químicos, grupos de microrganismos estão sendo estudados devido à sua capacidade de promover o crescimento das plantas e aumentar a disponibilidade de nitrogênio no solo por meio da fixação biológica de nitrogênio. Ledgard (2001) destaca que a sustentabilidade de sistemas de baixa utilização de insumos, a longo prazo, está ameaçada se não houver a introdução de leguminosas.

Estudos relacionados à diversidade de rizóbios em leguminosas forrageiras ainda são incipientes, apesar de apresentarem aplicações agrícolas importantes tanto em termos de manejo cultural, quanto da obtenção de estirpes mais adaptadas aos diferentes tipos de solos (STRALIOTTO, 2006).

O caso de maior sucesso da FBN no Brasil é a simbiose de *Bradyrhizobium japonicum* com a soja, a qual dispensa totalmente a adubação nitrogenada, uma vez que, em condições normais de cultivo, a FBN é capaz de suprir as necessidades de N da cultura (HUNGRIA *et*

al., 2000). No entanto, com outras leguminosas importantes ainda não foi possível suprir totalmente a demanda por nitrogênio, ainda que haja a redução de doses aplicadas de fertilizantes químicos (NOVAIS *et al.*, 2007).

Dessa forma, uma técnica alternativa, denominada coinoculação, com bactérias simbióticas e associativas tem sido estudada em leguminosas, a fim de produzir um efeito sinérgico, superando resultados produtivos obtidos quando esses organismos são utilizados de forma isolada (BÁRBARO *et al.*, 2008).

O Tremoço (*Lupinus albus*) e a Crotalária (*Crotalaria spectabilis*) são leguminosas capazes de estabelecer simbiose com as bactérias fixadoras de nitrogênio, sendo estudadas como alternativa de adubação verde, com o intuito de contribuir para a melhoria das características químicas, físicas e biológicas do solo, elevando sua capacidade produtiva (REDIN *et al.*, 2016).

Devido à grande importância das leguminosas para a economia do país, torna-se fundamental o estudo das bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento de plantas e o seu papel para o aumento da produção de grãos e forrageiras. Os objetivos desse trabalho foram, portanto, avaliar a diversidade de rizóbios encontrados em pastagem com *Brachiaria decumbens*, utilizando, como plantas iscas, o amendoim forrageiro, feijão caupi, crotalária e tremoço; autenticar e avaliar a eficácia da FBN dos isolados bacterianos e os efeitos da coinoculação com *Azospirillum brasilense* (AbV-5) em leguminosas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em leguminosas forrageiras

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a conversão do N₂ atmosférico em formas assimiláveis pelos organismos vivos, sendo considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta, depois da fotossíntese (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A FBN é realizada por meio de um complexo enzimático denominado nitrogenase, presente apenas em alguns microrganismos, conhecidos como diazotróficos, que podem ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais ou estabelecer simbiose com leguminosas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Na interação simbiótica com leguminosas, a bactéria é denominada de rizóbio, apresentando capacidade de interagir com o sistema radicular da planta hospedeira por meio do desenvolvimento de nódulos radiculares.

As bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o crescimento vegetal não só pelo fornecimento de nitrogênio, mas também por outros mecanismos como produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, antagonismo a fitopatógeno, entre outros (MOREIRA *et al.*, 2010). Alguns fatores ambientais podem afetar a FBN, tais como: acidez do solo, salinidade, deficiência/excesso de minerais e quantidade de N inorgânico no solo (BARCELLOS *et al.*, 2008).

As leguminosas forrageiras, devido à sua capacidade de associação com bactérias fixadoras de N e sua contribuição para a produção animal, são de extrema importância para aumentar a produtividade e constituem uma alternativa sustentável para sistemas agrícolas e pecuários (BARCELLOS *et al.*, 2008). Dentre as culturas com maior estoque de informações, destacam-se os estilosantes (*Stylosanthes* spp.), o amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*), o feijão guandu (*Cajanus cajan*) e a leucena (*Leucaena* spp.), por serem os mais cultivados e/ou mais promissores (BARCELLOS *et al.*, 2008).

A inserção de leguminosas no sistema de monocultivo de gramíneas pode ser considerada como um dos caminhos para reduzir o problema global de disponibilidade limitada de nitrogênio, não apenas diminuindo o processo de degradação de pastagens, mas também aumentando o sequestro de carbono da atmosfera (TARRÉ *et al.*, 2001).

A eficiência da fixação biológica de nitrogênio está relacionada à estirpe da bactéria e à leguminosa (FERNANDES; RODRIGUES, 2012). A simbiose das leguminosas com bactérias do solo já é bem caracterizada e pode ser maximizada através da inoculação com estirpes mais eficientes (ALVES *et al.*, 2000). O uso de inoculantes específicos auxilia na

redução de custos da produção, tornando menor o consumo de fertilizantes químicos (FERNANDES; RODRIGUES, 2012).

Um estudo realizado por Perin *et al.* (2004) indicou que a crotalária apresentou maior produção de fitomassa quando comparada à vegetação espontânea, além de ter apresentado um acúmulo de 4,5 kg/ha/dia de nitrogênio. Desse total de N acumulado, 57% foram derivados da fixação biológica de nitrogênio. Segundo esses autores, a FBN no plantio da crotalária é responsável pela incorporação de 89 a 173 kg/ha de nitrogênio.

Alves *et al.* (2000) avaliaram a rotação soja/trigo/soja/tremoço/milho/aveia, e os resultados de balanço de nitrogênio indicaram que a contribuição do N derivado da FBN para o tremoço poderia compensar as perdas de N provocadas pelas demais culturas. Nesse estudo ainda foi apresentado que a cultura do tremoço chegou a acumular uma média de 230 kg/ha de nitrogênio, dos quais metade foi transferida pelo sistema, após decomposição.

2.2 Diversidade de rizóbios em leguminosas

A biodiversidade do solo é responsável pela estabilidade e resiliência do ecossistema, estando relacionada a processos de formação do solo, ciclagem e armazenamento de nutrientes (SANTOS *et al.*, 2007). Estudos de biodiversidade são importantes para a realização de avaliações precisas e recomendações, tornando-se necessário o conhecimento das espécies presentes, sua amplitude geográfica, propriedades biológicas e possível vulnerabilidade a mudanças ambientais (WILSON, 1997).

A caracterização fenotípica rizobial contribui para o conhecimento da sua diversidade e utilização posterior em sistemas agrícolas (FREITAS CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010), favorecendo o manejo e a conservação das pastagens (FLORENTINO *et al.*, 2014). A caracterização microbiana vem sendo realizada por meio de técnicas moleculares. Atualmente, busca-se uma taxonomia polifásica e as características culturais fazem parte dos caracteres utilizados para essa classificação (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010).

Na avaliação da biodiversidade do rizóbio, as técnicas de DNA recombinante são ferramentas importantes, especialmente as técnicas baseadas em PCR, relativamente de baixo custo e de fácil manuseio (FELICE; ALSHINAWI, 1996). Segundo Moreira *et al.* (2010), os avanços na biologia molecular proporcionaram uma melhor distinção entre gêneros, sendo eles: *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradhyrizobium*, *Azorhizobium*, *Cupriavidus* e *Burkholderia*. O estudo da diversidade das bactérias com base em características culturais envolve a avaliação de diversos parâmetros, como o tempo de

formação de colônias individuais em meio de cultura, o diâmetro das colônias, a forma, a cor, a produção de ácido e álcali e a de muco, entre outros (SANTOS *et al.*, 2007).

Os gêneros mais estudados são: *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Sinorhizobium/Ensifer* (CHEN *et al.*, 1988; LAJUDIE *et al.*, 1994), *Azorhizobium* (DREYFUS *et al.*, 1988; MOREIRA *et al.*, 2006), *Mesorhizobium* (JARVIS *et al.*, 1997) e *Allorhizobium* (LAJUDIE *et al.*, 1998). Esses gêneros, de acordo com Garrity *et al.*, (2001), encontram-se distribuídos em quatro famílias distintas. A família Rhizobiaceae engloba três gêneros: *Rhizobium*, *Allorhizobium* e *Sinorhizobium/Ensifer*. Os demais gêneros estão incluídos em três famílias distintas: *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Hyphomicrobiaceae*, que, respectivamente, englobam os gêneros *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*. O gênero *Burkholderia*, do grupo β -Proteobacteria, é considerado por Compant *et al.* (2008) como o grupo de bactérias com maior diversidade e adaptabilidade ambiental entre os que realizam simbiose com plantas. O gênero *Cupriavidus* também é reconhecido por apresentar um elevado potencial biotecnológico (FLORENTINO *et al.*, 2012), destacando-se duas espécies com capacidade comprovada de estabelecer simbiose com leguminosas: *C. taiwanensis* (CHEN *et al.*, 2001) e *C. necator* (SILVA *et al.*, 2012).

Os gêneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium/Ensifer* e *Azorhizobium* podem ser, de modo geral, considerados como rizóbios de crescimento rápido; o gênero *Mesorhizobium* como de crescimento intermediário; e os gêneros *Bradyrhizobium* como de crescimento lento a muito lento (STRALIOTTO, 2006).

O gênero *Azorhizobium* possui duas espécies descritas: *A. caulinodans* (DREYFUS *et al.*, 1988) e *A. doebereineriae* (MOREIRA *et al.*, 2006), podendo ser distinguido dos demais gêneros que nodulam leguminosas em meio de cultura 79 com o indicador de pH azul de bromotimol (YMA) (FRED; WAKSMAN, 1928; VINCENT, 1970), devido ao crescimento rápido, alcalinização do meio e produção escassa de goma. Já a espécie *A. doebereineriae* pode ser distinguida de *A. caulinodans* por não formar nódulos caulinares em *S. rostrata*, além de não induzir nódulos eficientes nas suas raízes (FLORENTINO *et al.*, 2009). A Tabela 1, adaptada de Shamseldin *et al.* (2017), mostra classe, família e gênero de rizóbios descritos e atualizados, capazes de nodular com leguminosas.

Tabela 1: Classe, família e gênero de rizóbios descritos e capazes de nodular com leguminosas.

CLASSE	FAMÍLIA	GÊNERO
α -proteobacteria	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> <i>Sinorhizobium/Ensifer</i> <i>Allorhizobium</i> <i>Shinella</i> <i>Pararhizobium</i>
α -proteobacteria	Phylobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i> <i>Phyllobacterium</i> <i>Aminobacter</i>
α -proteobacteria	Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia</i> <i>Azorhizobium</i>
α -proteobacteria	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i> <i>Blastobacter</i> <i>Photorhizobium</i>
α -proteobacteria	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i> <i>Microvirga</i>
α -proteobacteria	Brucellaceae	<i>Ochrobacterium</i>
β -proteobacteria	Burkholderiales	<i>Burkholderia</i> <i>Cupriavidus</i>

Fonte: Adaptado de Shamseldin et al. (2017).

A Tabela 2 indica as cepas autorizadas (SEMIA) para a produção de inoculantes no Brasil para leguminosas forrageiras.

Tabela 2 - Cepas autorizadas (SEMIA) para produção de inoculantes para leguminosas forrageiras no Brasil de acordo com a Instrução Normativa DAS nº 13 de 24 de março de 2011.

CULTURA LEGUMINOSA	NOME COMUM	SEMIA	GÊNERO/ESPÉCIE
<i>Medicago sativa</i>	Alfafa	116	<i>Sinorhizobium melioli</i>
		134	<i>Sinorhizobium melioli</i>
		135	<i>Sinorhizobium melioli</i>
<i>Cajanus cajan</i>	Feijão-Guandu	6156	<i>Bradyrhizobium sp.</i>
		6461	<i>Bradyrhizobium sp.</i>
		6462	<i>Bradyrhizobium sp.</i>
<i>Vigna unguiculata</i>	Feijão caupi	6463	<i>Bradyrhizobium sp.</i>
		6464	<i>Bradyrhizobium sp.</i>
		6156	<i>Bradyrhizobium sp.</i>
<i>Crotalaria spectabilis</i>	Crotalária	6158	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
		928	<i>Bradyrhizobium sp.</i>
		938	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Lupinus sp.</i>	Tremoço	6439	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
		6440	<i>Bradyrhizobium sp.</i>

Fonte: Adaptado Brasil (2011)

Os princípios básicos para a seleção de estirpes com propósito de inoculação em leguminosas têm sido objeto de diversos estudos (ZAMAN-ALLAH *et al.*, 2007). A maioria das espécies de diazotróficos é de vida livre, ocorrendo em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera das plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). No entanto, para leguminosas forrageiras, esses estudos ainda são incipientes, de forma que ainda não foi possível suprir totalmente a demanda por nitrogênio dessas culturas (NOVAIS *et al.*, 2007).

2.3 Coinoculação de rizóbios com *Azospirillum*

As bactérias do gênero *Azospirillum*, fixadoras de N₂, promovem o crescimento da planta por diversos mecanismos, como a fixação de nitrogênio e a produção de hormônios de plantas, aumentando a permeabilidade da raiz e melhorando a absorção de minerais em geral, além de aumentar a resistência a condições adversas como seca, salinidade e compostos tóxicos (BASHAN; BASHAN, 2005).

A técnica de coinoculação consiste na utilização de combinações de microrganismos, produzindo um efeito sinérgico que supera a produtividade obtida quando são utilizados de forma isolada (BÁRBARO *et al.*, 2008). Para o cultivo da soja no Brasil, esse método vem sendo aplicado nos inoculantes com a combinação de diferentes estirpes do gênero *Bradyrhizobium* (BIZARRO, 2008).

O desenvolvimento de cultivares mais produtivas, associado às mudanças climáticas, está exigindo práticas agronômicas mais produtivas e sustentáveis (HUNGRIA *et al.*, 2015). Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) são extremamente benéficas para a agricultura, sendo as do gênero *Azospirillum* as mais utilizadas, porém pouco se sabe da sua interação com rizóbios quando ambos são aplicados às sementes de leguminosas (HUNGRIA *et al.*, 2015).

Dada a importância da cultura da soja para a economia brasileira e a preocupação com futuras limitações da FBN, bem como os benefícios da inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum*, a coinoculação pode melhorar o desempenho das culturas, em uma abordagem que respeita as demandas atuais de sustentabilidade agrícola, econômica, social e ambiental (HUNGRIA *et al.*, 2015).

Produtos à base de *Azospirillum brasilense* têm sido utilizados para coinoculação de soja, juntamente com *Bradyrhizobium*, tanto na Argentina como na África do Sul (REIS, 2007). De modo geral, ocorre a potencialização da nodulação e um maior crescimento

radicular, em resposta à interação positiva entre as bactérias simbióticas (FERLINI, 2006). O mesmo autor cita que, nos casos onde se tem utilizado *A. brasilense*, o efeito benéfico da associação se deve, em maior parte, à capacidade que a bactéria tem de produzir fitohormônios de crescimento vegetal.

Diversos estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de avaliar os efeitos da coinoculação, principalmente no cultivo da soja. Bárbaro *et al.* (2009) não verificaram incremento na produção da soja por meio da coinoculação, porém Hungria *et al.* (2015) observaram que a coinoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* aumentou a produção da soja, sem que houvesse a necessidade de utilização de fertilizantes químicos nitrogenados. O mesmo foi observado por Baccini *et al.* (2016), sendo que a inoculação via tratamento de sementes e a utilização da associação de *Bradyrhizobium japonicum* com *Azospirillum brasilense* proporcionou incrementos nos caracteres fisiológicos, promovendo acréscimos no rendimento de grãos da soja.

Dardanelli *et al.* (2008), estudando coinoculação em feijão com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium tropici* sob estresse salino em hidroponia, observaram o efeito positivo da coinoculação ao nível do desenvolvimento radicular, fixação de nitrogênio, produção de mais sinais flavonoides e alívio dos efeitos negativos causados por NaCl. Além disso, os resultados sugerem que *Azospirillum* permite uma exsudação mais longa e persistente dos flavonoides das raízes de feijão.

A inoculação mista de *Azospirillum* com *Rhizobium* incrementa a estimulação e a função dos nódulos, número total e peso dos nódulos, diferenciação das células epidérmicas nos pelos radiculares, produtividade de grãos e área da superfície radicular (BASHAN; BASHAN, 2005).

2.4 Tremoço (*Lupinus albus*)

O gênero *Lupinus* pertence à subfamília Papilionoideae da família Leguminosae, apresentando entre 300 e 500 espécies distribuídas no continente americano e em algumas regiões da África e do Mediterrâneo (CONTERATO, 2004). O tremoço é caracterizado por ser uma oleaginosa muito utilizada na alimentação de ruminantes devido ao seu elevado teor proteico (CREMONEZ *et al.*, 2013).

A espécie possui um sistema radicular pivotante e profundo, tonando-se ideal para estratégias de recuperação de solos (ROVEDDER, 2007). Cremonez *et al.* (2013) descrevem

o tremço como sendo eficiente para proteção contra processos erosivos, sendo recomendado em sistemas de manejo conservacionistas.

Uma das primeiras descrições feitas de uma bactéria isolada a partir de nódulos de uma espécie de *Lupinus* foi realizada por Eckhardt *et al.* (1930), trabalho em que foi relatada a presença de bactérias de crescimento lento. Para o cultivo de tremço no Brasil, existem duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. recomendadas pela Instrução Normativa SDA nº 13, de 24 de março de 2011 (BRASIL, 2011), SEMIA 928 e 938, as quais podem ser obtidas na coleção de cultura da EMBRAPA (BRASIL, 2011).

Um estudo realizado por Gènard *et al.* (2016) mostrou que o tremço possui uma elevada capacidade de transferência de nitrogênio para outras culturas, sendo a fixação biológica de nitrogênio responsável pela inclusão de altos níveis do mesmo no sistema de cultivo.

O tremço consegue aumentar a absorção de fósforo (P) em solos com deficiência desse nutriente por meio da formação de “*cluster roots*” (WANG *et al.*, 2018). Sendo assim, o *Lupinus albus*, além de formar associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, melhora a absorção de P em solos pobres (LAMBERS *et al.*, 2013), disponibilizando esses nutrientes para a planta e melhorando a sua taxa fotossintética (WANG *et al.*, 2018).

2.5 Crotalária (*Crotalaria spectabilis*)

Leguminosas tropicais como a *Crotalaria spectabilis* têm ampla utilização na agricultura como adubo verde, cobertura morta, fixação de nitrogênio, controle de nematóides e reciclagem de nutrientes (SILVEIRA e RAVA, 2004).

Essa espécie pode ser usada em consórcio com cultivos perenes ou anuais, elevando a fertilidade do solo, destacando-se na região de Cerrado por seu ciclo relativamente curto, que possibilita semeadura anterior à da cultura principal (Borges Teodoro *et al.*, 2011).

C. spectabilis é uma leguminosa que pode ser encontrada em plantações como milho, soja e sorgo. Além do uso como adubos verdes, a espécie possui potencial para o controle de nematoides (Nogueira *et al.*, 2015). Debiasi *et al.* (2016), observaram que o uso de *Crotalaria spectabilis* na entressafra contribuiu para o aumento na produtividade da soja, uma vez que foi responsável pela redução da população e dos danos causados por *Pratylenchus brachyurus*.

A presença de monocrotalina torna a semente dessa espécie tóxica para os animais, ocasionando, principalmente, graves danos ao fígado. Em estudo realizado por Souza *et al.*

(1997) foi indicado que, independente da proporção utilizada, as rações contendo sementes de *Crotalaria* foram tóxicas para os suínos.

Para o cultivo de *Crotalaria spectabilis* no Brasil, existem duas estirpes recomendadas pela Instrução Normativa DAS nº 13, de 24 de março de 2011 (BRASIL, 2011), SEMIA 6156 (*Bradyrhizobium* sp.) e 6158 (*Bradyrhizobium elkanii*), as quais podem ser obtidas na coleção de cultura da EMBRAPA. No entanto ainda são poucos os estudos relacionados à diversidade de rizóbios capazes de nodular essa espécie.

REFERÊNCIAS

- ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; LARA-CABEZAS, W.A.R.; TORRES, E.; HUNGRIA, M.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Benefit of legume fixed N in crop rotations under zero tillage. In: PEDROSA, F. *et al.* (eds). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Springer, 2000. p. 533-534.
- BÁRBARO, I. M.; BRANCALIANO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. **Técnica alternativa: co-inoculação de soja com Azospirillum e Bradyrhizobium visando incremento de produtividade**. Artigo em Hypertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm. Acesso em: 17 abr. 2019.
- BÁRBARO, I. M.; MACHADO, P. C.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. D. Produtividade da soja em resposta à inoculação padrão e co-inoculação. **Colloquium Agrariae**, v.5, n.1, p. 1-7, jan./jun. 2009.
- BARCELLOS, A. D. O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; JUNIOR, M.; BUENO, G. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 51-67, jul. 2008.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Plant growth-promoting soil. In: **Encyclopedia of soils in the environment**. Oxford: Elsevier, 2005. v. 1, p. 103-115.
- BIZARRO, M. J. **Simbiose e variabilidade de estirpes de Bradyrhizobium associadas à cultura da soja em diferentes manejos do solo**. 2008. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- BRACCINI, A. L.; MARIUCCI, G. E. G.; SUZUKAWA, A. K.; DA SILVA LIMA, L. H.; PICCININ, G. G. Co-inoculação e modos de aplicação de Bradyrhizobium japonicum e Azospirillum brasilense e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 1, p. 27-35, jan./mar. 2016.
- BRASIL. **Instrução Normativa SDA nº 13**, de 24 de março de 2011.
- CARVALHO, W. T. V.; MINIGHIN, D. C.; GONÇALVES, L. C.; VILLANOVA, D. F. Q.; MAURICIO, R. M.; PEREIRA, R. V. G. Pastagens degradadas e técnicas de recuperação: revisão. **Pubvet**, Maringá, v. 11, p. 947-1073, out. 2017.
- CHAGAS JUNIOR, A. F. ; DE OLIVEIRA, L. A.; NASCIMENTO DE OLIVEIRA, A. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 161-169, mar. 2010.
- CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, sep. 2001.

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 and Evolutionary Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 392-397, oct. 1988.

COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C.; AIT BARKA, E. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. 607-626, jul. 2008.

CONTERATO, I. F. **Estudos citogenéticos em espécies Americanas de *Lupinus L.***: número cromossômico e comportamento meiótico. 2004. 122f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CREMONEZ, P. A.; FEROLDI, M.; FEIDEN, A.; DE ROSSI, E.; NADALETI, W. C.; ANTONELLI, J. Tremoço: Manejo e aplicações. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 2, n. 5, p. 98-108, 2013.

DARDANELLI, M. S.; CORDOBA, F. J. F.; ESPUNY, M. R.; CARVAJAL, M. A. R.; DÍAZ, M. E. S.; SERRANO, A. M. G.; MEGÍAS, M. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2713-2721, nov. 2008.

DEBIASI, H.; FRANCHINI, J. C.; DIAS, W. P.; JUNIOR, E. U. R.; JUNIOR, A. A. B. (2016). Práticas culturais na entressafra da soja para o controle de *Pratylenchus brachyurus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 10, p. 1720-1728, out. 2016.

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

ECKHARDT, M. M.; BALDWIN, I. L.; FRED, E. B. Studies of the root-nodule organism of *Lupinus*. **Journal of bacteriology**, v. 21, n. 4, p. 273, apr. 1931.

FELICE, A. E.; ALSHINAWI, C. Polymerase chain reaction in molecular biotechnology; appropriate technology for developing countries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 467-471, sep. 1996.

FERLINI, H. Á. Co-inoculación en soja (*Glycyne max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. 2006. Disponível em: <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/co-inoculacion-en-soja-t26446.htm>. Acesso em: 17 abr. 2019.

FERNANDES, J. R. C.; RODRIGUES, P. Importância da inoculação com bactérias *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* na produção de leguminosas e o uso do azoto. **Agrotec**, Portugal, n. 3, p. 34-37, jun. 2012.

- FLORENTINO, A. L.; MOREIRA, F. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microissimbiote de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 2, mar./apr. 2009.
- FLORENTINO, L. A.; JARAMILLO, P. M. D.; SILVA, K. B., SILVA, J. S. D.; OLIVEIRA, S. M. D.; MOREIRA, F. M. D. S. Physiological and symbiotic diversity of *Cupriavidus necator* strains isolated from nodules of Leguminosae species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 69, n. 4, p. 247-258, 2012.
- FLORENTINO, L. A.; REZENDE, A. V.; MESQUITA, A. C.; LIMA, A. R.; MARQUES, D. J.; MIRANDA, J. M. Diversidade e potencial de utilização dos rizóbios isolados de nódulos de *Gliricidia sepium*. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 37, n. 3, p. 320-338, set. 2014.
- FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology-with special reference to the microorganisms of the soil**. New York, London: Mcgraw-Hill Book Company, 1928.
- GARRITY, G. M.; WINTERS, M. AND SEARLES D.B. A Taxonomic outline of the procaryotes In: VOS, P *et al.* (eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2th ed. Londres: Springer, c2009.v.3.
- GÉNARD, T.; ETIENNE, P.; LAÎNÉ, P.; YVIN, J. C.; DIQUÉLOU, S. Nitrogen transfer from *Lupinus albus* L., *Trifolium incarnatum* L. and *Vicia sativa* L. contribute differently to rapeseed (*Brassica napus* L.) nitrogen nutrition. **Heliyon**, v. 2, n. 9, p. 1-15, sep. 2016.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S. ; CHUEIRE, O.; L. M., PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J., MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11-12, p. 1515-1528, oct.2000.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791-801, jan. 2013.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 06, p. 811-817, jan. 2015.
- 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 and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 895-898, jul. 1997.
- JORDAN, D. C. Family III rhizobiaceae. CONN. 1938. In: KRIEG, N. R. (ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2th ed. Londres: Springer, c2010. v. 4.

LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; DREYFUS, B. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington v. 48, n. 2, p. 369-382, apr.1998.

LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; 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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 715-733, oct. 1994.

LAMBERS, H.; CLEMENTS, J. C.; NELSON, M. N. How a phosphorus acquisition strategy based on carboxylate exudation powers the success and agronomic potential of lupines (*Lupinus*, Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 100, n. 2, p. 263-288, feb. 2013.

LEDGARD, S. F. Nitrogen cycling in low input legume-based agriculture, with emphasis on legume/grass pastures. **Plant and Soil**, v. 228, n. 1, p. 43-59, jan. 2001.

MACEDO, M. C. M.; ZIMMER, A. H.; KICHEL, A. N.; DE ALMEIDA, R. G.; DE ARAÚJO, A. R. Degradação de pastagens, alternativas de recuperação e renovação, e formas de mitigação. In: ENCONTRO DE ADUBAÇÃO DE PASTAGENS DA SCOT CONSULTORIA-TEC-FÉRTIL, 1., 2013, Ribeirão Preto, SP. **Anais [...]**. Bebedouro: Scot Consultoria, 2013. p. 158-181, 2014.

MOREIRA, F. M. D. S.; CRUZ, L.; DE FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; OLIVEIRA PEDROSA, F.; YOUNG, J. P. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 3, p. 197-206, apr. 2006.

MOREIRA, F. M. D. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74, nov. 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. p. 449-542.

NOGUEIRA, C.; CORREIA, N. M.; GOMES, L.; FERREIRA, P. Seletividade de *Crotalaria spectabilis* em consorcio com o milho safrinha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOSSANIDADE, 3., 2015, Aguas de Lindóia. **Anais [...]**. São Paulo, SP: UNESP, 2015. NOGUEIRA, N. O.; OLIVEIRA, O. D.; MARTINS, C. D. S.; BERNARDES, C. D. O. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 2012-2031, 2012.

NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1017 p.

PERIN, A.; SANTOS, R. H. S.; URQUIAGA, S.; GUERRA, J. G. M.; CECON, P. R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos

verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 35-40, jan. 2004.

REDIN, M.; GIACOMINI, S. J.; FERREIRA, P. A. A.; ECKHARDT, D. P. Plantas de cobertura de solo e agricultura sustentável: espécies, matéria seca e ciclagem de carbono e nitrogênio. In: TIECHER, T. (org.) **Práticas alternativas de manejo visando a conservação do solo e da água**. Porto Alegre: UFRGS, 2016.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007.

ROVEDDER, A. P. **Potencial do *Pupinus albescens* Hook. & Arn. para recuperação de solos arenizados do bioma pampa**. 2007. Tese. (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SANTOS, C. U. R. S. D.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 4, out./dez. 2007.

SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M. J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. **Symbiosis**, v. 71, n. 2, p. 91-109, nov. 2017.

SILVA, D. M. N. D.; OLIVEIRA, F. L. D.; TEODORO, R. B.; FÁVERO, C.; QUARESMA, M. A. L. Aspectos agronômicos de leguminosas para adubação verde no Cerrado do Alto Vale do Jequitinhonha. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Viçosa, v.35, n.2, p. 635-640, abr. 2011.

SILVA, K.; FLORENTINO, L. A.; DA SILVA, K. B.; DE BRANDT, E.; VANDAMME, P.; DE SOUZA MOREIRA, F. M. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and applied microbiology**, v. 35, n. 3, p. 175-182, may 2012.

SILVEIRA, P. M.; RAVA, C. A. **Utilização de crotalária no controle de nematóides da raiz do feijoeiro**. Brasília: Embrapa Arroz e Feijão, 2004.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Biologia e bioquímica do solo Lavras. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 626p.

SOUZA, A. C. D.; HATAYDE, M. R.; BECHARA, G. H. Aspectos patológicos da intoxicação de suínos por sementes de *Crotalaria spectabilis* (Fabaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p. 12-18, jan. 1997.

STRALIOTTO, R.; DE AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005.

TARRÉ, R.; MACEDO, R.; CANTARUTTI, R. B.; DE REZENDE, C. P.; PEREIRA, J. M.; FERREIRA, E.; BODDEY, R. M. The effect of the presence of a forage legume on nitrogen

and carbon levels in soils under *Brachiaria* pastures in the Atlantic forest region of the South of Bahia, Brazil. **Plant and Soil**, v. 234, n. 1, p. 15-26, jul. 2001.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).

WANG, X.; DING, W.; LAMBERS, H. Nodulation promotes cluster-root formation in *Lupinus albus* under low phosphorus conditions. **Plant and Soil**, p. 1-10, abr. 2018.

WILSON, E. O. A situação atual da diversidade biológica. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 3-24.

ZAMAN-ALLAH, M.; SIFI, B.; L'TAIEF, B.; EL AOUNI, M. H.; DREVON, J. J. Rhizobial inoculation and P fertilization response in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under glasshouse and field conditions. **Experimental Agriculture**, v. 43, n. 1, p. 67-77, jan. 2007.

ARTIGO

**DIVERSITY OF RHIZOBIA IN PASTURE AREAS AND SYNERGISM OF
CO-INOCULATION WITH *AZOSPIRILLUM BRASILENSE***

DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS EM ÁREAS DE PASTAGENS E SINERGISMO DA
COINOCULAÇÃO COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

Ana Beatriz Carvalho Terra¹

Ligiane Aparecida Florentino¹

Adauton Vilela de Rezende¹

¹ *Universidade José do Rosário Vellano*

ABSTRACT - As farming techniques evolve, there is also a need to develop new management practices that increase production by reducing costs and environmental impacts. The objective of this work was to evaluate the diversity of rhizobia found on pasture with *Brachiaria decumbens* using as bait plants the forage peanut (*Arachis pintoii*), cowpea (*Vigna unguiculata*), crotalaria (*Crotalaria spectabilis*) and lupine (*Lupinus albus*), authenticate and evaluate the biological nitrogen fixation efficiency (BNF) of bacterial isolates and the effects of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) on legumes. Shannon index (H') was used to evaluate diversity. Parameters of dry matter of the shoot (DMS), dry matter of the root (DMR), number of nodules (NN), nodule dry matter (DMN) and relative symbiotic efficiency (RSE) were used for the analysis of efficiency. A total of 197 isolates were obtained, 29 isolates of *C. spectabilis*, 30 isolates of *L. albus*, 96 isolates of *A. pintoii* and 42 isolates of *V. unguiculata*. *A. pintoii* was the legume that captured the highest diversity of isolated, given by the highest value of H'. Isolates 05-21 and 06-03 provided higher values of

DMS, DMR and RSE when inoculated in *C. spectabilis* and *L. albus*, respectively. These same isolates were prominent when co-inoculated with the Ab-V5 strain.

INDEX TERMS: Forage legumes; Nitrogen fixation; Symbiotic efficiency.

RESUMO – À medida que as técnicas agropecuárias evoluem, há também uma necessidade de desenvolver novas práticas de manejo que aumentem a produtividade, reduzindo custos e impactos ambientais. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a diversidade de rizóbios encontrados em pastagem com *Brachiaria decumbens* utilizando como plantas iscas o amendoim forrageiro (*Arachis pintoï*), feijão caupi (*Vigna unguiculata*), crotalária (*Crotalaria spectabilis*) e tremoço (*Lupinus albus*), autenticar e avaliar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) dos isolados bacterianos e os efeitos da coinoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) em leguminosas. A diversidade de rizóbios foi estimada pelo índice de Shannon (H'), nos testes de autenticação, eficiência simbiótica e dos efeitos da coinoculação, foram avaliados os parâmetros de matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN) e eficiência simbiótica relativa (EFR). Foram obtidos 197 isolados, sendo 29 isolados da *C. spectabilis*, 30 isolados de *L. albus*, 96 isolados de *A. pintoï* e 42 isolados de *V. unguiculata*. Em relação à diversidade, o *A. pintoï* foi a leguminosa que capturou maior diversidade de isolados, dado pelo maior valor de H' . Os isolados 05-21 e 06-03, proporcionaram maiores valores de MSPA, MSR e EFR, quando inoculados em *C. spectabilis* e *L. albus*, respectivamente. Esses mesmos isolados se destacaram quando coinoculadas com a estirpe Ab-V5.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Eficiência simbiótica, fixação biológica de nitrogênio, leguminosas forrageiras

INTRODUCTION

Characterized by an extensive model, it is estimated that 50% of the pasture area in Brazil is in some state of degradation Macedo et al. (2014), becoming incapable of sustaining animal productivity. There's a need to develop management techniques that lead to a reduction of costs and environmental impacts in order to increase production.

The recovery of these areas requires restoration of soil fertility, plant growth and forage production, according to Hungria et al. (2016), microbial inoculants can assist in these processes. The legumes can establish symbiotic interactions with nitrogen-fixing bacteria (N_2), also known as rhizobia, which are able to partially or totally supply the nitrogen demanded by plants, contributing to the sustainable management of the soil Moreira and Siqueira (2006).

Studies on the diversity of rhizobia in forage legumes are still incipient, requiring the selection of bacterial strains efficient to fix N_2 and adapted to the different edaphoclimatic conditions Stralioetto (2006), although presenting important agricultural applications. N_2 -fixing bacteria can also be associated to different plant species, associative diazotrophic bacteria, providing nitrogen and performing other functions, such as the production of phytohormones, as indole 3-acetic acid (IAA) Moreira et al. (2010).

Co-inoculation techniques have been studied to evaluate the synergism between symbiotic and associative bacteria. According to Hungria et al. (2015), the associative bacteria of the genus *Azospirillum* are the most used as plant growth promoters. Inoculation with *Azospirillum* may represent a key component for degraded pasture recovery programs, providing a greater accumulation of N in biomass, and assisting in carbon sequestration Hungria et al. (2016).

The objective of this work was to evaluate the diversity of rhizobia found on pasture with *Brachiaria decumbens* using as bait plants the forage peanut (*Arachis pintoi*), cowpea (*Vigna unguiculata*), crotalaria (*Crotalaria spectabilis*) and lupine (*Lupinus albus*), authenticate and evaluate the biological nitrogen fixation efficiency (BNF) of bacterial isolates and the effects of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) on legumes.

MATERIAL AND METHODS

Description of the area

Soil samples from pasture areas cultivated under *Brachiaria decumbens* were collected from two cities in the south of Minas Gerais, Alfenas and Três Pontas. They were collected at a depth of 0-20 cm, following the methodology of Florentino et al. (2009). The chemical analyzes of the samples were carried out in the Soil Fertility Laboratory of the José do Rosário Vellano University (UNIFENAS), following to the EMBRAPA methodology (1997) and the characteristics of the soils sampled are described in table 1.

Table 1: Results of the chemical analysis from the soil samples.

Samples	ALFENAS		TRÊS PONTAS	
	Alfenas 1	Alfenas 2	Três Pontas 1	Três Pontas 2
pH (H ₂ O)	5,6	6,2	5,3	4,6
P (mg dm ⁻³)	1,3	2,1	1,1	0,3
K (mg dm ⁻³)	70	93	118	48
Ca ²⁺ (cmolc dm ⁻³)	3,1	2,7	1,6	0,8
Mg ²⁺ (cmolc dm ⁻³)	1,3	1,2	0,9	0,7
Al ³⁺ (cmolc dm ⁻³)	0	0	0,5	1,6
H+Al (cmolc dm ⁻³)	2,8	3,1	7,2	4,7
SB (cmolc dm ⁻³)	4,6	4,1	2,8	1,62

t (cmolc dm ⁻³)	4,6	4,1	3,3	3,2
T (cmolc dm ⁻³)	7,4	7,2	10,1	6,32
V (%)	62,2	57	27,7	25,63
m (%)	0	0	15,2	50
MO (dag kg ⁻¹)	32	44	35	25

The following experiments were conducted: capture of rhizobia by different bait plants (*A. pintoi*, *C. spectabilis*, *V. unguiculata* and *L. albus*); morphological characterization and authentication of bacterial isolates, the efficiency of isolates in fixing N₂ and evaluation of the effects of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), provided by EMPRAPA soybean.

Isolation and morphological characterization of bacterial isolates

In order to capture the native rhizobia, 50 g of sterilized soil from each composite sample were suspended in 50 mL of saline (0.55% NaCl) and shaken for 30 min at 50 rpm and 1 mL of the suspension was inoculated in each plant, grown in 600 mL capacity recycled dark glass bottles containing 500 mL of Jensen's nutrient solution (1942) at ¼ strength. The glass flasks were prepared according to Florentino and Moreira (2009) and during the conduction of the test there was no solution replacement.

Before planting, the seeds of the bait plants were surface disinfested by immersion in 100% ethyl alcohol for 30 seconds and then in 2% sodium hypochlorite for 2 minutes, followed by successive washes in sterilized distilled water. Then they were placed in sterile plates containing moistened cotton and filter paper until the beginning of the germination, where the teguments were removed and inserted in the glass jars, being cultivated for 30 days.

After this period, all nodules were selected for the isolation of rhizobia. Disinfestation and isolation of the nodules were performed following the methodology of Vincent (1970),

using 95% ethyl alcohol for 30 seconds, then placed in H₂O₂ for 3 minutes and washed six times with sterile distilled water, for maceration in culture medium 79 Fred and Waksman (1928).

The colonies were purified and characterized morphologically in this same medium, based on Martins et al. (1997), (3 days - fast growth, 4-7 days - intermediate growth, more than 7 days - slow growth), alteration of the pH of the culture medium (acidic, neutral or alkaline), size (0.5-2.5 mm - small, 2.5-4.0 mm - medium, greater than 4 mm - large), shape (circular or irregular), elevation, surface, border and colony color, amount of exopolysaccharides (low, medium or high), optic (opaque or translucent), consistency of the exopolysaccharides (aqueous or gummy) and absorption of the indicator (bromothymol blue).

For the analysis of the diversity of the isolates of each legume species, the Shannon Index was calculated based on the morphological characteristics Jesus et al. (2005), according to the formula:

$$H' = \sum \frac{n_i}{N} * \ln \frac{n_i}{N}$$

Where: H' = Shannon index; n_i = number of different bacterial morphotypes i; N = total number of bacterial isolates; ln = logarithm on the natural basis.

Symbiotic efficiency and authentication of bacteria isolates

Two experiments draw on *C. spectabilis* e *L. albus* were used in order to authenticate and analyse the symbiotic efficiency of nodule isolates of these two legumes. Plants were cultivated in 600 mL capacity recycled dark glass bottles containing 500 mL of Jensen nutriente solution (1942) at ¼ force in both experiments. The glass bottles were prepared according to Florentino and Moreira (2009) and along the trial there have been no solution replacement.

Before planting, *C. spectabilis* e *L. albus* seeds were disinfected according to the previous experiment. The treatments consist of 12 *C. spectabilis* isolate nodules and *L. albus* 16 bacterial nodules inoculation. Both trials were led for 40 days in completely randomized design (DIC), in four repetitions.

Each glass bottle received one germinated seed at the moment of planting and each seed were inoculated in 1 mL of the seed strains 79 liquid-based cultivated containing approximately 10^9 cells. Two control treatment were used in both experiments, one without mineral and the other containing mineral nitrogen, were it was added $35 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NH}_4 \text{ NO}_3$.

After 40 days cultivation of both legumes, the following parameters were evaluated: dry matter of the shoot (DMS (g)) and dry matter of the root (DMR (g)), nodule dry matter (DMN), number of nodules (NN) and relative symbiotic efficiency (RSE). RSE were calculated using the adapted formula of Bergensen et al. (1971)

$$RSE\% = \frac{DMS \text{ inoculated}}{DMS \text{ control}} * 100$$

The results of the trials were submitted to variance analysis, with Sisvar statistical analysis, version 5.3. Treatment averages were compared by the Scott-Knott test at 5% probability.

Coinoculation of bacterial isolates with *Azospirillum brasilense*

To evaluate the synergism, efficient, intermediate and inefficient strains were chosen from the experiment of authentication and symbiotic efficiency. For the *C. spectabilis* isolates (05-03, 05-16, 05-25, 05-23, 05-01 e 05-21), the experiment was conducted in randomized block design (RBD), factorial (8x2), six treatments with the isolates mentioned above and 2 control treatments, with and without addition of mineral N, coinoculated or not with the Ab-V5 strain.

For the bacterial isolates with capacity to nodule *L. albus* (06-01, 06-21, 06-09, 06-03, 06-17 and 06-27), the experiment was conducted in RBD, factorial (8x2), six

treatments with the isolates mentioned above and 2 control treatments, with and without addition of mineral N, coinoculated or not with the Ab-V5 strain.

Both experiments were installed in a potting test containing 8 dm³ of soil, the chemical characterization Embrapa (2011) showed the following results: pH (H₂O) = 5.2; P = 10 mg dm⁻³; K⁺ = 119 mg dm⁻³; Ca²⁺ = 1.5 cmol_c dm⁻³; Mg²⁺ = 0.9 cmol_c dm⁻³; Al³⁺ = 0.2 cmol_c dm⁻³; base sum (SB) = 2.6 cmol_c dm⁻³; CTC potential = 6.0 cmol_c dm⁻³; base saturation (V%) = 40.0; aluminium saturation (m%) = 10 e organic matter (M.O.) = 22 g kg⁻¹.

The liming was performed with dolomitic limestone according to the method of raising the base saturation to 60%. The soil was moistened and incubated in black plastic bags in order to increase the rate of limestone reaction. After 30 days, the macronutrients (phosphorus and potassium) were added following the recommendation of Novais et al. (1991).

Ten days after fertilization, four seeds were sown per pot, 1 mL per seed of each strain (Isolate + Ab-V5) was inoculated, in control treatments (with and without mineral N), inoculation was performed only with *A. brasilense*. The experimental design was RBD with four replicates.

After germination, two plants were thinned and the other two plants were maintained until the flowering season, when the following parameters were evaluated: dry matter of the root (DMR), dry matter of the shoot (DMS), nodule number (NN), nodule dry matter (NDM) and relative symbiotic efficiency (RSE).

In order to calculate the RSE, the DMS data of the mineral N treatment associated with the Ab-V5 strain and the DMS of the treatments with each of the isolates were used, adapting the formula of Bergensen et al. (1971), modified as indicated below. In the original formula, the DMS data of the inoculant treatments are used. For this work, were used the DMS values of the treatments with co-inoculation (isolate + Ab-V5) and of the control treatment.

$$RSE\% = \frac{MSPA \text{ coinoculated}}{MSPA \text{ control}} * 100$$

The DMR, DMS, NN, DMN and RSE data were submitted to analysis of variance using the statistical analysis program Sisvar, version 5.3. Treatment averages were compared by the Scott-Knott test at 5% probability.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and morphological characterization of bacterial isolates

A total of 197 isolates were obtained from the nodules of the bait plants, 29 from *C. spectabilis*, 30 isolates from *L. albus*, 96 isolates from *A. pintoii* and 42 isolates from *V. unguiculata*.

For the parameters evaluated in the morphological characterization, the time of growth and the alteration of the pH of the culture medium 79 were the ones that allowed a greater distinction between the isolates. In general, most bacterial isolates showed fast growth. The pH of the culture medium 79 was acidified by a large part of the *C. spectabilis*, *A. pintoii* and *V. unguiculata* isolates, whereas for *L. albus* it was observed that most of the isolates alkalized the medium (Figure 1).

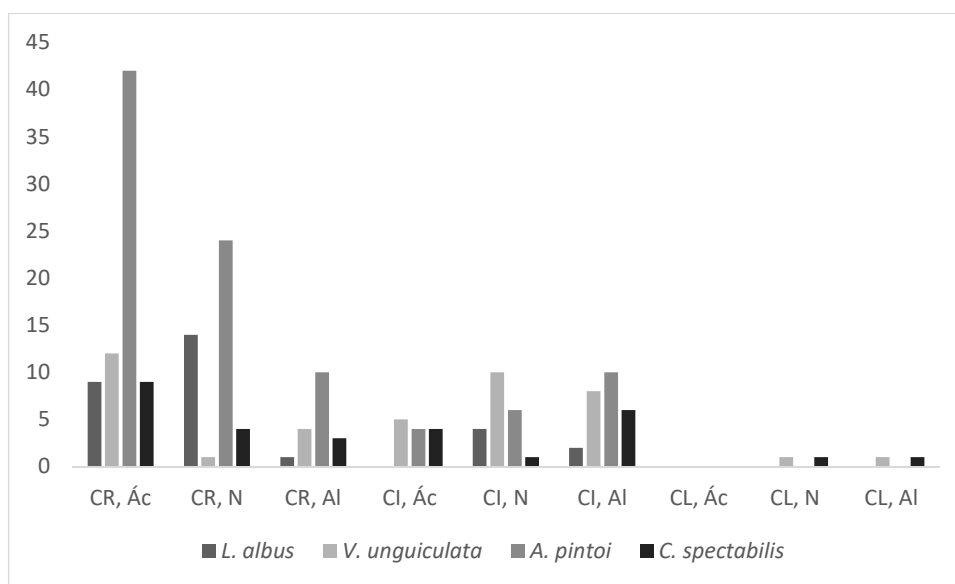


Figure 1: Morphological characteristics of the isolates of *L. albus*, *C. spectabilis*, *V. unguiculata* and *A. pintoii* based on the time for colony formation and alteration of the pH of the medium (CR, Ac = fast growth, acid medium, CR, N = fast growth,

neutral medium, CR, Al = Fast growth, alkaline medium, CI, Ac = Intermediate growth, acid medium CI, N = Intermediate growth, neutral medium, CI, Al = Growth medium, alkalinized medium, CL, c = Slow growth, acid medium, CL, N = Slow growth, neutral medium, CL, Al = Slow growth, alkalinized medium).

In order to isolate rhizobia from nodules of different species of *C. spectabilis* Bratti et al. (2005), and *V. unguiculata* Chagas Junior et al. (2010), also found a higher proportion of bacteria with the ability to acidify the culture medium and with fast growth, similar results were found on this study (Figure 1). The acidification may be due to the preferential use of sugars by fast growing strains, followed by the excretion of organic acids Tan and Broughton (1981).

Morphological diversity of the strains captured by the bait plants were evaluated using the Shannon index (H') (Table 2). This index is independent of sample size, so that a small number of samples is required to obtain a safe index for comparison purposes Odum (1988). A similar approach was used by Coutinho et al. (1999) and Jesus et al. (2005) in the study of rhizobia communities.

Table 2: Diversity values of rhizobia calculated by the Shannon index (H') for each type of evaluated soil, using different bait plants.

Diversity Shannon index (H')				
Bait plants	Soil samples			
	Alfenas 1	Alfenas 2	Três Pontas 1	Três Pontas 2
<i>A. pinto</i>	1.507	1.209	1.046	0.603
<i>V. unguiculata</i>	0.857	1.157	0.824	0.468
<i>L. albus</i>	1.020	1.134	0.680	0.407
<i>C. spectabilis</i>	0.930	1.161	0.813	0.464

Based on the observed Shannon index data (H') it is possible to note that *A. pintoi* presented the highest diversity values for all soil types. There are studies that *A. pintoi* is a species that may nodulate with native strains, but symbiosis may be ineffective in tropical soils, including cerrado soils Pinto et al. (1999). It is possible to note that in the few studies carried out, no reports were found on the genetic diversity of native populations of rhizobia nodulating *A. pintoi* under natural conditions, however it is a legume that has gained prominence for feeding due to its higher nutritional potential and defoliation tolerance Fernandes et al. (2013) Tamele et al. (2017).

The soil collected in the Três Pontas 2 area was the one that obtained the lowest diversity values, while the soil sampled in the Alfenas 2 area presented, in general, the highest diversity indexes. It can be explained by the chemical characteristics of the soil (Table 1), where the soil sample collected at Alfenas 2 presented higher values of pH, organic matter and base saturation V (%), indicating greater availability of nutrients. Freitas Chagas Junior et al. (2010) found that aluminum was the most limiting factor for bacterial growth, which may justify a lower number of isolates and diversity in the soils of Três Pontas.

According to Marchetti et al. (2017) and Raza et al. (2001), the acidity and toxicity of aluminum are factors commonly associated with tropical soils, and may affect bacterial growth and establishment of symbiosis, since in acidic environment a reduction in protein synthesis occurs. Besides, some cytoplasmatic biochemical reactions of these organisms are sensitive to acidity Aarons and Graham (1991, also affecting the root development of plants Figueiredo et al. (2008).

Rufini et al. (2001) found that in common bean, the increase of pH of the soil favored the symbiosis of nitrogen-fixing bacteria, since soil pH is one of the main limiting factors for symbiosis. Zhang et al. (2006) observed a higher diversity of rhizobia in sites with higher fertility, which had higher concentrations of organic carbon and nitrogen.

Symbiotic efficiency and authentication of bacteria isolates

Tables 3 and 4 present the data analyzed for *C. spectabilis* and *L. albus* in the evaluation of authentication and symbiotic efficiency.

Table 3: Nodule number per pot (NN), dry matter of nodules (DMN), dry matter of the shoot (DMS) (mg.pot^{-1}), dry matter of the root (DMR) (mg.pot^{-1}), and relative symbiotic efficiency (RSE) for *Crotalaria spectabilis*.

<i>TREATMENTS</i>	<i>NN</i>	<i>DMN</i> (mg.pot^{-1})	<i>DMR</i> (mg.pot^{-1})	<i>DMS</i> (mg.pot^{-1})	<i>RSE</i> (%)
Control with N mineral	0.00 d	0.00 c	673.00 b	1771.66 a	100.00 a
Control without N mineral	0.00 d	0.00 c	155.66 f	650.00 d	36.77 d
05-01	4.00 c	6.68 a	465.66 d	1330.66 b	75.27 b
05-03	5.00 a	5.22 b	288.66 e	441.33 e	24.97 e
05-04	0.00 d	0.00 d	376.33 d	507.33 e	28.59 e
05-09	3.00 c	6.20 b	542.33 c	1102.00 c	62.28 c
05-16	6.00 a	7.97 a	667.33 b	1155.66 c	65.25 c
05-17	0.00 d	0.00 d	260.00 e	637.33 d	36.02 d
05-21	4.00 c	8.00 a	827.33 a	1473.33 b	83.01 b
05-22	5.00 a	5.89 b	631.00 b	989.33 c	55.68 c
05-23	3.00 c	8.32 a	845.33 a	1073.33 c	60.71 c
05-24	5.00 a	4.75 b	374.66 d	903.33 c	51.01 c
05-25	0.00 d	0.00 c	153.66 f	117.00 f	6.60 f
05-26	4.00 c	4.52 b	584.33 c	741.00 d	41.90 d

Means followed by equal letters in the column do not differ statistically from one another by the Scott-Knott test (5%).

Table 4: Nodule number per pot (NN), dry matter of nodules (DMN), dry matter of the shoot (DMS) (mg.pot^{-1}), dry matter of the root (DMR) (mg.pot^{-1}), and relative symbiotic efficiency (RSE) for *Lupinus albus*.

<i>TREATMENTS</i>	<i>NN</i>	<i>DMN</i> (mg.pot^{-1})	<i>DMR</i> (mg.pot^{-1})	<i>DMS</i> (mg.pot^{-1})	<i>RSE</i> (%)
Control with N					
mineral	0.00 e	0.00 e	930.00 a	1920.00 a	100.00 a
Control without N					
mineral	0.00 e	0.00 e	223.33 e	693.33 f	36.38 f
06-01	0.00 e	0.00 e	286.66 e	700.00 f	36.52 f
06-03	3.00 b	6.29 a	780.00 b	1506.66 b	78.44 b
06-04	4.00 a	4.88 b	286.66 e	860.00 e	44.97 e
06-06	0.00 e	0.00 e	783.33 b	1096.66 d	57.27 d
06-09	4.00 a	6.36 a	400.00 d	909.33 e	47.35 e
06-11	4.00 a	3.31 c	543.66 c	637.66 f	33.17 f
06-12	0.00 e	0.00 e	334.33 e	625.33 f	32.47 f
06-15	0.00 e	0.00 e	172.00 f	142.66 g	7.46 g
06-17	4.00 a	5.10 b	319.00 e	925.00 e	48.35 e
06-19	4.00 a	6.20 a	280.33 e	680.66 f	35.79 f
06-21	0.00 e	0.00 e	378.00 d	926.66 e	48.61 e
06-24	2.00 d	2.40 b	306.66 e	750.00 f	39.95 f
06-25	3.00 b	5.13 d	316.66 e	860.00 e	44.98 e
06-27	3.00 c	5.82 a	430.00 d	1343.33 c	70.07 c

06-29	0.00 e	0.00 e	259.66 e	732.66 f	38.22 f
06-30	4.00 a	4.97 b	326.66 e	1036.66 d	54.33 d

Means followed by equal letters in the column do not differ statistically from one another by the Scott-Knott test (5%).

In the parameters that evaluate the nodulation data, it is observed that, for both legumes, there was no nodule formation in the control treatments, indicating that there was no contamination in the experiment.

For *C. spectabilis*, the strain 05-21 was highlighted in relation to the other treatments with the presence of inoculation. When compared to the control treatment with N mineral the strain 05-21 showed a relative symbiotic efficiency (RSE) of 83%, presenting a high potential on fixing and providing N to the plant, being more efficient than the control treatment without N mineral. In relation to the production of DMR, the strain 05-21 was better than the control treatment with N mineral.

For *L. albus*, the most prominent strain was 06-03, which presented 78% of symbiotic efficiency when compared to treatment with mineral N, being superior to the control treatment without mineral N, indicating the potential of this strain for supply nitrogen to the plant. Regarding the parameters of DMR and DMS, the strain presented lower values only when compared to the control treatment with mineral N.

Freitas et al. (2011) evaluated nitrogen nodulation and efficiency of caatinga forages, also found that none of the nodulation parameters evaluated (NN and DMN) explained the proportions of nitrogen fixed by the plants. Suggesting that NN is a variable that explains little the symbiotic efficiency Freitas et al. (2011).

The results showed that isolates that promoted a higher production of DMS wasn't necessary those with higher values of NN, that can indicate an inefficiency of great part of the nodules.

As observed, the strain 05-21 isolated from *C. spectabilis* promoted a higher value of DMR when compared to other treatments, including the control treatment with N mineral, which can be associated with the production of indole 3-acetic acid (IAA) by the strain. This phytohormone acts mainly on the formation of lateral roots and roots that increase the nutrient uptake by the plant, contributing to the development of the aerial part Biswas et al. (2000).

The RSE obtained by the strains 05-21 and 06-03 shows their potential in acting as substitute of nitrogen fertilizer, reaching up to 80% of the dry matter production of the aerial part in relation to the control treatment with mineral N, and can be indicated as an alternative to produce these legumes.

Coinoculation of bacterial isolates with *Azospirillum brasilense*

The coinoculation of the isolates with *A. brasilense* was evaluated using the parameters NN, DMN, DMS, DMR and RSE, the results obtained are shown in Tables 5 and 6. It is observed that for both legume species, interaction of isolates with *A. brasilense* was positive, that is, the parameters showed higher values when there was coinoculation.

For *C. spectabilis*, the strain 05-21 was highlighted, which when coinoculated, presented superior results, in all parameters, to the control treatment with N mineral. This strain, associated to *A. brasilense*, showed a symbiotic efficiency (RSE) of over 100%, indicating the positive response to coinoculation and presenting potential for substitution of mineral N, supplying the nutritional needs of the plant and promoting its growth.

For *L. albus*, the interaction was also positive, with higher values in the presence of coinoculation. The best results were obtained by the strain 06-03, being only inferior to the treatment with N mineral, in the parameters of DMR and DMS. The strain obtained an RSE of

92% when compared to the control treatment with mineral N, indicating its potential to guarantee the supply of nitrogen to the plants as well as its growth.

Table 5: Observed values for the pot experiment in the absence (-) and presence (+) of co-inoculation with *Azospirillum brasilense*, for *Crotalaria spectabilis*.

	NN		DMN (mg.pot ⁻¹)		DMS (mg.pot ⁻¹)		DMR (mg.pot ⁻¹)		RSE (%)	
	COINO	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC
	C (-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
*N(+)	0.00 Da	0.00 Da	0.00 Da	0.00 Fa	2.17 Ab	2.44 Ba	0.92 Bb	1.31 Ba	88.92 Ab	100.00 Ba
**N(-)	26.00 Ab	41.00 Aa	0.03 Ba	0.03 Da	1.08 Ca	1.24 Ea	0.67 Cb	0.95 Ca	44.48 Ca	50.93 Ea
05-03	6.00 Ca	8.00 Ca	0.02 Ca	0.02 Ea	0.31 Da	0.43 Fa	0.19 Ea	0.27 Ea	12.62 Da	17.68 Fa
05-25	10.00 Cb	18.00 Ba	0.03 Bb	0.04 Da	1.24 Ca	1.20 Ea	0.22 Ea	0.24 Ea	50.75 Ca	49.29 Ea
05-23	18.00 Ba	24.00 Ba	0.03 Ba	0.02 Ea	1.01 Ca	1.19 Ea	0.62 Cb	0.82 Da	45.12 Ca	49.05 Ea
05-16	19.00 Bb	32.00 Ba	0.03 Bb	0.05 Ca	2.07 Aa	1.76 Db	0.52 Db	0.76 Da	85.22 Aa	72.65 Db
05-01	28.00 Aa	26.00 Ba	0.03 Bb	0.08 Aa	2.05 Aa	2.22 Ca	0.44 Db	1.32 Ba	84.29 Aa	91.18 Ca
05-21	35.00 Ab	55.00 Aa	0.05 Ab	0.06 Ba	1.84 Bb	2.84 Aa	1.32 Ab	1.79 Aa	75.71 Bb	116.41 Aa

Means followed by equal letters, uppercase in the column and lowercase in the row, do not differ statistically from one another by the Scott-Knott test (5%). *N(+): control with N mineral. **N(-): control without N mineral.

Table 6: Observed values for the pot experiment in the absence (-) and presence (+) of co-inoculation with *Azospirillum brasilense*, for *Lupinus albus*

	NN		DMN (mg.pot ⁻¹)		DMS (mg.pot ⁻¹)		DMR (mg.pot ⁻¹)		RSE (%)	
	COINO	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC	COINOC
	C (-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
*N(+)	0.00 Da	0.00 Ga	0.00 Ea	0.00 Da	2.13 Ab	2.74 Aa	1.30 Aa	1.39 Aa	78.31 Ab	100.00 Aa
**N(-)	29.00 Ca	37.00 Fa	0.16 Da	0.23 Ca	0.26 Ea	0.39 Fa	0.74 Ca	0.85 Ca	9.56 Ea	14.27 Ea
06-01	25.00 Cb	36.00 Fa	0.25 Ca	0.33 Ba	0.87 Da	0.88 Ea	0.83 Ca	0.85 Ca	32.14 Da	32.68 Da
06-21	63.00 Ba	52.00 Ea	0.39 Ba	0.38 Ba	0.73 Da	0.86 Ea	0.42 Ea	0.48 Ea	26.78 Da	31.64 Da
06-09	64.00 Ba	71.00 Da	0.37 Ba	0.39 Ba	1.27 Ca	1.36 Da	0.56 Da	0.67 Da	47.30 Ca	50.03 Ca
06-03	81.00 Aa	88.00 Ca	0.56 Aa	0.62 Aa	2.31 Aa	2.50 Ba	1.07 Ba	1.09 Ba	85.29 Aa	92.39 Aa
06-17	96.00 Aa	107.00 Ba	0.44 Ba	0.45 Ba	1.33Cb	1.66 Ca	0.71 Ca	0.83 Ca	48.88 Cb	61.69 Ba
06-27	96.00 Ab	128.00 Aa	0.51 Ab	0.64 Aa	1.57 Bb	1.89 Ca	0.67 Cb	0.81 Ca	57.79 Bb	69.71 Ba

Means followed by equal letters, uppercase in the column and lowercase in the row, do not differ statistically from one another by the Scott-Knott test (5%). *N(+): control with N mineral. **N(-): control without N mineral.

For NN and DMN, it was observed that in both legumes, the coinoculated treatments were superior to those where the rhizobia acted in isolation. Cassán et al. (2009) corroborate these results, reporting that the number of nodules and the percentage of nodulated plants were higher in soybean plants coinoculated with *B. japonicum* and *A. brasilense*, attributing these results to the excretion of metabolic products by *A. brasilense*. The same was observed by Molla et al. (2001), where *Azospirillum* improved the initiation and development of nodules in soybean plants by co-inoculation with *Bradyrhizobium*. In general, nodulation and root growth are better in response to positive interaction between bacteria Ferlini (2006).

Cassán et al. (2009) verified that *A. brasilense* produces regulators of root growth (AIA), justifying better responses in the coinoculated treatments, both for *L. albus* and *C. spectabilis*. The results of DMS and DMR associated to coinoculation also show that the beneficial effect of the association of the strains with *Azospirillum brasilense* is mainly due to the capacity of the bacterium to produce growth phytohormone Bárbaro et al. (2008).

According to Ferlini (2006) the combined inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in soybean increases the production, the same can be observed in this work for *L. albus* and *C. spectabilis*, where some treatments where coinoculation was present, DMS values and DMR were superior to the treatment with the presence of nitrogen fertilizer, showing the potential of these bacteria in not only fixing nitrogen but also stimulating plant production.

Corroborating with these results, Molla et al. (2001), in a laboratory experiment to evaluate the potential of root growth improvement and nodulation in soybean coinoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium*, observed that *Azospirillum* has the potential to significantly stimulate root growth.

In general, the best results found in this study of coinoculation in legumes corroborate with several studies that have been carried out in Brazil, especially with soybeans. The

practice of coinoculation can be considered a key component for degraded pasture recovery programs, representing a new technique to improve crop productivity and contributing to sustainable practices in farming systems.

CONCLUSION

In relation to the diversity, *A. pintoii* presented the highest diversity index of the isolates, indicating the potential of the species as bait plant. For the analyzes of authentication and coinoculation the treatments 06-03 and 05-21, for *L. albus* and *C. spectabilis*, respectively, presented higher values of DMS, DMR and RSE, indicating a greater potential to promote plant growth when coinoculated with *Azospirillum brasilense*.

REFERENCES

- AARONS, S.R.; GRAHAM, P.H. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli to acidity. **Plant and Soil**, 134(1):145-151, 1991.
- BÁRBARO, I. M. et al. Técnica alternativa: coinoculação com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade da cultura da soja no Norte do Estado de São Paulo. **Informações Tecnológicas**, Campinas, 2008.
- BERGERSEN, F.J. et al. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. **Plant and Soil**, 35(1):3-16, 1971.
- BISWAS, J. C. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, 92(5):880–886, 2000.
- BRATTI, A.E. et al. Levantamento de rizóbios em adubos verdes cultivados em sistema integrado de produção agroecológica (sipa). **Embrapa Agrobiologia**, Seropédica, 2005. Available in: < <https://www.embrapa.br/agrobiologia/busca-de-publicacoes/-/publicacao/625685/levantamento-de-rizobios-em-adubos-verdes-cultivados-em-sistema-integrado-de-producao-agroecologica-sipa> > Access in: 09 may 2019.
- CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, 45(1): 28–35, 2009.

COUTINHO, H.L.C. et al. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, 13(2):159-167, 1999.

FERLINI, H. A. Co-Inoculação em Soja (*Glicyne max*) com *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. **Agricultura**, [s.l.], jun. 2006. Available in: <<https://www.engormix.com/agricultura/articulos/co-inoculacion-en-soja-t26446.htm>> Access in: 09 may 2019.

FERNANDES, G.M. et al. In situ degradability and selected ruminal constituents of sheep fed with peanut forage hay. **Archives of Animal Nutrition**, 67(5): 393–405, 2013.

FIGUEIREDO, M.V.B. et al. **Microrganismo e agrobiodiversidade**: o novo desafio para a agricultura. [Guaíba, RS]: Agrolivros, 2008.

FLORENTINO, L.A. ;MOREIRA, F.M.S. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microsimbiote de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, 33(2):215-226, 2009.

FLORENTINO, L. A. et al. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, 66 (5):667-676, 2009.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology – with special reference to the microorganisms of the soil**. New York: McGraw-Hill Book Company, 145p. 1928.

FREITAS, A.D.S. et al. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40(9):1856-1861, 2011.

CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum Agronomy**, 32(1):161-169, 2010.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, 6:811-817, 2015.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 221: 125-131, 2016.

JESUS, E.C. et al. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, 40(8):769-776, 2005.

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

MARCHETTI, M.M. et al. Characterization of bacteria in nodules of arboreal legumes of fragments of the mixed ombrophila forest. **Revista Scientia Agraria**, 18(4):50-62, 2017.

MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, 29:1005-1010, 1997.

MOLLA, A. H et al. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. **Soil Biology & Biochemistry**, 33(4): 457-463, 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F. M. S. , SIQUEIRA, J. O . **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 449-542.

MOREIRA, F. M. D. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, 1(2): 74-99, 2010.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: Oliveira, A. J. E. A. (Ed.). **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA - SEA, 1991, p. 189-253.

ODUM, E.P. **Fundamentos de ecologia**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1988. 927p.

PINTO, P.P. et al. Indigenous rhizobia associated with *Arachis pintoi* in Cerrado soils of Brazil. **Pasturas Tropicales**, 21(2):25-28, 1999.

RAZA, S. et al. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. **The Society for Applied Microbiology**, 32:379-383, 2001.

RUFINI, M. et al. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 46(1):81-88, 2011.

STRALIOTTO, R. Diversidade do rizóbio - evolução dos estudos taxonômicos. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas**

para uma agricultura sustentável. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.p. 221-255.

TAMELE, O.H. et al. Optimal defoliation management of brachiaria grass–forage peanut for balanced pasture establishment. **Grass Forage Science**, 73(2):522-531, 2017.

TAN. K. P.; BROUGHTON W. J. Rhizobia in tropical legumes-XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, 13(5):389-393, 1981.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).

ZHANG, Y. et al. Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan Plateau, China. **FEMS Microbiol.** 260(2):134-142, 2006.