

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Coinoculação *Rhizobium-Bradyrhizobium* e seus Efeitos
sobre o Desenvolvimento, Nodulação e Fixação Biológica
de Nitrogênio no Feijoeiro**

RAFAEL DE ALMEIDA LEITE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
– CIENCIA DO SOLO

COINOCULAÇÃO *Rhizobium-Bradyrhizobium* E SEUS EFEITOS
SOBRE O DESENVOLVIMENTO, NODULAÇÃO E FIXAÇÃO
BiolÓGICA DE NITROGÊNIO NO FEIJOEIRO

RAFAEL DE ALMEIDA LEITE

Sob a Orientação do Pesquisador
Ederson da Conceição Jesus

e Co-orientação do Professor
Adelson Paulo Araújo

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

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento
Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L533c Leite, Rafael de Almeida , 1988-
Coinoculação Rhizobium-Bradyrhizobium e seus efeitos
sobre o desenvolvimento, nodulação e fixação biológica de
nitrogênio no feijoeiro / Rafael de Almeida Leite. - 2018.
62 f.: il.

Orientador: Ederson da Conceição Jesus. Coorientador:
Adelson Paulo Araújo.

Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência
do Solo, 2018.

1. Phaseolus vulgaris. 2. Rizóbios. 3. Coinoculação.
I. Jesus, Ederson da Conceição, 1979-, orient. II. Araújo, Adelson
Paulo, -, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Agronomia - Ciência do
Solo. IV. 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
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

RAFAEL DE ALMEIDA LEITE

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/02/2018

Ederson da Conceição Jesus. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

Tsai Siu Mui. Dr. USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional nesta fase. Estela, mãe, eu não estaria aqui se não fosse por você. Este título e os anteriores são resultados do seu apoio. Minha eterna gratidão.

À UFRRJ e ao PPGA-CS pelo programa de mestrado, pelos ensinamentos e pelas oportunidades. Estendo os agradecimentos aos professores e funcionários que contribuíram neste caminho.

À CAPES, agradeço a concessão de bolsa de mestrado.

À Embrapa, agradeço pela oportunidade de usar os recursos e pessoal, que foram fundamentais ao longo do mestrado. Em especial, agradeço aos pesquisadores do Laboratório de Leguminosas e aos funcionários técnicos e analistas, Marcelo e Adriana, e aos técnicos do Laboratório de Gramíneas Wilson e Lúcio. Agradeço à Andreia do Laboratório de Cromatografia e aos técnicos do Setor de Casa de Vegetação, Ernani, Roberto Carlos e Aurélio.

Meus agradecimentos ao meu orientador Ederson Jesus. Se tiver de te agradecer por tudo, eu teria que redigir outra dissertação somente para isso. É um enorme orgulho poder trabalhar contigo. Muito obrigado por todo ensino, conhecimento, incentivo, apoio e amizade.

Agradeço a co-orientação e disposição do professor Adelson Araújo.

Agradeço ao apoio incondicional, Jéssica Félix, e ao sempre incentivo nas decisões que eu preciso tomar. Você tem estado comigo, partilhando todas as fases da minha vida. Muito obrigado

Guilherme Rigueira e Caroline Almeida, meus amigos queridos. Sou grato por tê-los ao meu lado, dos melhores aos momentos mais difíceis. Agradeço muito pela forte amizade de vocês.

A Jaime Cardoso. Você, quem tanto participou nesses dois anos. Você, quem tanto me apoiou e acreditou em mim. Sou deveras grato pelo reconhecimento, pelo tempo investido e pelo carinho. Muito obrigado por tudo.

Aos demais amigos do Laboratório de Leguminosas, agradeço.

A todos que de alguma forma contribuíram com esse momento, obrigado.

BIOGRAFIA

Rafael de Almeida Leite, filho de Estela Maris de Almeida Leite e Izaias Gomes Leite, nasceu em Paracambi, Rio de Janeiro, em 04 de julho de 1988. Coursou o Ensino Médio no Colégio Fernando Costa, em Seropédica, RJ. Em 2006 entrou no curso de Licenciatura em Ciências Agrícolas na UFRRJ, tendo colado grau em 2011. Em 2008, passou a cursar Tecnologia em Gestão Ambiental na Faculdade de Educação Tecnológica do Rio de Janeiro, e colou grau em 2013. Em 2011 foi aprovado no curso de Agronomia na UFRRJ, onde se formou Engenheiro Agrônomo, em 2016. Durante este tempo, foi bolsista de monitoria na área de morfologia vegetal por dois anos; logo depois foi bolsista de iniciação científica PROIC/UFRRJ por um ano, em projeto de pesquisa sobre agricultura urbana na cidade do Rio de Janeiro; em seguida foi bolsista de iniciação científica CNPq e Faperj na Embrapa Agrobiologia, onde trabalhou com fixação biológica de nitrogênio em comunidades florestais. Em 2014, fez intercâmbio na Aburn University, nos Estados Unidos, onde estudou até 2015. Entre os anos de 2016 e 2018, cursou o Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do solo na UFRRJ.

RESUMO

LEITE, Rafael de Almeida. **Coinoculação *Rhizobium-Bradyrhizobium* e seus efeitos sobre o desenvolvimento, nodulação e fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro.** 2018. 62f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2018.

O feijoeiro é capaz de nodular com uma ampla gama de espécies de rizóbios. Dentre elas, estão espécies do gênero *Bradyrhizobium*, as quais induzem à formação profusa de nódulos vazios e inefetivos. Com base nessa observação, hipotetizou-se que, quando coinoculado com o *Rhizobium tropici*, recomendado como inoculante para a cultura, o *Bradyrhizobium* seria capaz de estimular a formação de nódulos vazios, os quais seriam ocupados pela estirpe eficiente, com consequências positivas sobre a fixação biológica do N₂ (FBN) e o crescimento da planta. Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da coinoculação de *R. tropici* e estirpes de *Bradyrhizobium* no crescimento, nodulação e produção do feijoeiro sob condições estéreis, solo não estéril e campo. As hipóteses são que o feijoeiro é capaz de nodular com estirpes de *Bradyrhizobium*, porém de forma ineficiente; que a coinoculação *Rhizobium-Bradyrhizobium* aumenta a nodulação e a contribuição da FBN para a planta; e que a coinoculação aumenta a produtividade em condições de campo. Diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* foram coinoculadas com a estirpe CIAT 899 de *R. tropici* em um experimento com substrato estéril e em dois experimentos com solo não estéril. As melhores estirpes foram avaliadas no campo, no qual se avaliou o efeito da (co)inoculação *Rhizobium-Bradyrhizobium* na semente e no sulco sobre a produtividade de grãos. Por fim, foi realizado um experimento para avaliação de ocupação nodular e microscopia de nódulos de feijoeiro coinoculados ou não, em condições estéreis. A coinoculação, em especial com a estirpe CPAC 7 de *B. diazoefficiens*, resultou em um maior crescimento e nodulação do feijoeiro em vasos de Leonard. As outras coinoculações (CIAT 899 + 29w e CIAT 899 + USDA 110) também apresentaram resposta no acúmulo de biomassa das plantas, porém, com efeitos menos evidentes. Em condições não estéreis, também foi possível observar um efeito positivo da coinoculação de rizóbios, porém, em menor magnitude. Resultados positivos foram observados em casa de vegetação para o crescimento e acúmulo de N (29w + CIAT 899) em um dos dois experimentos realizados. A coinoculação CIAT 899 + CPAC 7 na semente promoveu um aumento da produtividade de grãos de 20% se comparado à inoculação da CIAT 899 na semente. A avaliação da microscopia e morfologia dos nódulos mostrou que os nódulos induzidos por *Bradyrhizobium* são pouco desenvolvidos, porém, não são vazios, como foi reportado na literatura. Conclui-se que a coinoculação de rizóbios tem potencial para favorecer o crescimento e produção do feijoeiro comum, porém ajustes serão necessários para garantir seu efeito em solo não estéril e no campo.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Rizóbios. Coinoculação

ABSTRACT

LEITE, Rafael de Almeida. ***Rhizobium-Bradyrhizobium* co-inoculation and its effects on plant growth, nodulation and nitrogen biological fixation**. 2018. 62p. Dissertação (Master in Agronomy – Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2018.

Common bean can nodulate with a wide range of rhizobium species. Among them, species from the genus *Bradyrhizobium* induce the formation of a large number of ineffective, empty nodules. Based on this observation, we hypothesized that, when co-inoculated with *Rhizobium tropici*, an efficient symbiont of common beans, *Bradyrhizobium* would be able to stimulate the formation of empty nodules, which, in turn, could be infected by the efficient strain, with positive results over biological N₂ fixation (BNF), and plant growth. The objective of this work was to evaluate the co-inoculation effect of *R. tropici* and *Bradyrhizobium* strains on the growth, nodulation and grain productivity of common bean under sterile, non-sterile soil, and field conditions. The hypotheses are that the common bean nodulates with *Bradyrhizobium* strains, although inefficiently; that co-inoculation enhances nodulation and nitrogen fixation; and that co-inoculation improves grain yields in field conditions. Several strains of *Bradyrhizobium* were co-inoculated with the CIAT 899 strain of *R. tropici* in an experiment with a sterile substrate and two experiments with non-sterile soil. The effect of co-inoculation with the best strains was assessed in the field with two types of inoculation: on-seed and in-furrow. An assay was carried out to evaluate nodule occupancy, and to provide nodules for microscopy and the acetylene reduction. Co-inoculation, especially with the CPAC 7 strain of *B. diazoefficiens*, resulted in improved growth and nodulation of common beans on Leonard jars. The other two co-inoculations (29w + CIAT 899 e USDA 110 + CIAT 899) also stimulated biomass accumulation, although with less evident effects. In non-sterile conditions, we also observed a positive response of rhizobia co-inoculation, but with a smaller magnitude. Positive results were observed in the greenhouse for growth and N accumulation (29w + CIAT 899) in at least one of the experiments. The co-inoculation of CPAC 7 + CIAT 899 on-seed enhanced grain productivity, leading to a 20% increase in yield when compared with the inoculation of CIAT 899 only. Microscopy and morphological analysis showed that nodules induced by *Bradyrhizobium* are poorly developed; they are not empty as reported in the literature. We concluded that the *Rhizobium-Bradyrhizobium* co-inoculation has potential to enhance the growth and grain production of common beans, although adjustments are needed to ensure its effects on non-sterile soil and in field conditions.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Rhizobia. Co-inoculation

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Contagem associada às sementes após a inoculação com as estirpes para o experimento de campo. 14
- Tabela 2:** Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSNN), e nitrogênio total da parte aérea (NPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo não estéril 17
- Tabela 3:** massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSNN), e nitrogênio total da parte aérea (NPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta 18
- Tabela 4:** Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes. Cultivo de duas plantas por vaso 19
- Tabela 5:** Valores médios de massa seca de parte Aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes. Cultivo de duas plantas por vaso 20
- Tabela 6:** Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de raiz (MSR), número total de nódulos (NNT), massa seca total de nódulos (MSNNT), número de nódulos maiores que 2,00 mm (NN>2), massa seca total de nódulos maiores que 2,00 mm (MSNN>2), número de nódulos menores que 2,00 mm (NN<2) e massa seca total de nódulos menores que 2,00 mm (MSNN<2) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta 23
- Tabela 7:** massa seca de parte aérea total (MSPAT), massa seca de folhas (MSPAF), massa seca de caule (MSPAC), e massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Foram cultivadas duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta..... 23
- Tabela 8:** número total de nódulos (NNT) e massa seca total de nódulos (MSNNT) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em

experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso 24

Tabela 9: número de nódulos maiores que 2,00 mm (NN>2) e massa seca total de nódulos maiores que 2,00 mm (MSNN>2) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso 24

Tabela 10: número de nódulos menores que 2,00 mm (NN<2) e massa seca total de nódulos menores que 2,00 mm (MSNN<2) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard, Cultivo de duas plantas por vaso 24

Tabela 11: Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), número de nódulos (NN), e massa seca de nódulos (MSNN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante 26

Tabela 12: Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de produtividade (Prod), número de vagens por planta (Vagens/planta), número de grãos por vagem (grãos/vagem), e peso de 100 grãos (P100) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante .26

Tabela 13: Valores médios de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSNN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. Dados correspondem à soma de 5 plantas coletadas em sequência na parcela 28

Tabela 14: Valores médios de produtividade (Prod), número de vagens por planta (Vagens/planta), número de grãos por vagem (Grãos/vagem) e peso de 100 grãos (P100) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante 29

Tabela 15: massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSNN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e

Bradyrhizobium, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. Dados correspondem à soma de 5 plantas coletadas em sequência na parcela. TN = testemunha nitrogenada. TA = testemunha absoluta..... 30

Tabela 16: produtividade (Prod), número de vagens por planta (Vagens/planta), número de grãos por vagem (Grãos/vagem) e peso de 100 grãos (P100) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. TN = testemunha nitrogenada. TA = testemunha absoluta 30

Anexo B2: Tabela de comparações múltiplas pareadas pelo teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) para massa seca de parte aérea (MSPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes. Cultivo de duas plantas por vaso 51

Anexo C10: Tabela de comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) para para massa seca de parte aérea total (MSPAT) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta..... 57

Anexo C11: Tabela de comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) para para massa seca de folha (MSPAF) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta..... 58

Anexo C12: Tabela de comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) para para massa seca de caule (MSPAC) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta..... 58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gráfico de *boxplot* para massa seca de parte aérea (MSPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta. 18
- Figura 2:** Gráfico de *boxplot* para massa seca de parte aérea (MSPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes para coinoculação; TA = testemunha absoluta. 21
- Figura 3:** Gráfico de *boxplot* para massa seca de parte aérea total (MSPAT) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta. 25
- Figura 4:** Gráfico de *boxplot* para massa seca de parte aérea (MSPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. 31
- Figura 5:** Gráfico de *boxplot* para produtividade (Prod) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. 31
- Figura 6:** (a) Nódulos de feijoeiro comum induzido por *R. tropici* CIAT 899. (b) Corte transversal do nódulo induzido por *R. tropici* CIAT 899. 32
- Figura 7:** Seção transversal de nódulo de feijoeiro comum induzido por *R. tropici* CIAT 899 com endocitose típica (estrela). (a) aumento em 100x; (b) aumento em 200x. 32
- Figura 8:** Seções transversais de nódulos de feijoeiro comum coinoculados: (a) *B. diazoefficiens* CPAC 7 + *R. tropici* CIAT 899, aumento de 100x. (b) *B. diazoefficiens* USDA 110 + *R. tropici* CIAT 899, aumento de 200x. 33
- Figura 9:** (a) Nódulos de feijoeiro comum induzido por *B. elkanii* 29w. (b) Corte transversal do nódulo induzido por *B. elkanii* 29w. 33
- Figura 10:** Seção transversal de nódulo de feijoeiro comum induzido por *B. elkanii* 29w. (a) aumento em 200x de zona de divisão celular; (b) aumento em 1000x, presença de bactérias nos espaços intercelulares (setas) e células em mitose (estrela). 33

- Anexo A1:** Gráfico de *boxplot* para massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta.....48
- Anexo A2:** Gráfico de *boxplot* para massa seca nódulos (MSNN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta. 48
- Anexo A3:** Gráfico de *boxplot* para número de nódulos (NN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta.....49
- Anexo A4:** Gráfico de *boxplot* para nitrogênio acumulado na parte aérea (NPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta. 49
- Anexo B1:** Gráfico de *boxplot* para massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes para coinoculação; TA = testemunha absoluta..... 50
- Anexo C1:** Gráfico de *boxplot* para massa seca de folhas (MSPAF) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta.....53
- Anexo C2:** Gráfico de *boxplot* para massa seca de caule (MSPAC) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta..... 53
- Anexo C3:** Gráfico de *boxplot* para massa seca raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta..... 54
- Anexo C4:** Gráfico de *boxplot* para número total de nódulos (NNT) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação

dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.....	54
Anexo C5: Gráfico de <i>boxplot</i> para massa seca total de nódulos (MSNNT) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Bradyrhizobium</i> após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.....	55
Anexo C6: Gráfico de <i>boxplot</i> para número de nódulos > 2,00 mm (NN>2) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Bradyrhizobium</i> após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.....	55
Anexo C7: Gráfico de <i>boxplot</i> para massa seca de nódulos > 2,00 mm (MSNN>2) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Bradyrhizobium</i> após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.....	56
Anexo C8: Gráfico de <i>boxplot</i> para número de nódulos < 2,00 mm (NN<2) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Bradyrhizobium</i> após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.....	56
Anexo C9: Gráfico de <i>boxplot</i> para massa seca de nódulos < 2,00 mm (MSNN<2) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Bradyrhizobium</i> após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.....	57
Anexo D1: Gráfico de <i>boxplot</i> para massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Bradyrhizobium</i> , com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de <i>Rhizobium-Bradyrhizobium</i> e as formas de aplicação do inoculante. Dados correspondem à soma de 5 plantas coletadas em sequência na parcela.....	59
Anexo D2: Gráfico de <i>boxplot</i> para número de nódulos (NN) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Bradyrhizobium</i> , com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de <i>Rhizobium-Bradyrhizobium</i> e as formas de aplicação do inoculante. Dados correspondem à soma de 5 plantas coletadas em sequência na parcela.....	59
Anexo D3: Gráfico de <i>boxplot</i> para massa seca de nódulos (MSNN) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Bradyrhizobium</i> , com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos	

das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. Dados correspondem à soma de 5 plantas coletadas em sequência na parcela. 60

Anexo E1: Gráfico de *boxplot* para número de vagens por planta (Vagens/planta) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. 61

Anexo E2: Gráfico de *boxplot* para número de grãos por vagem (Grãos/vagem) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. 61

Anexo E3: Gráfico de *boxplot* para peso de 100 grãos (p100) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. 62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Fixação Biológica de Nitrogênio no Feijoeiro	3
2.2. <i>Bradyrhizobium</i>	4
2.3. Produção e Produtividade da Cultura do Feijoeiro	5
2.4. Coinoculação com Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Crescimento de Bactérias e Preparo de Inóculos	10
3.2. Limpeza e Germinação das Sementes de Feijoeiro	10
3.3. Primeiro Experimento de Seleção em Vasos com Solo Não Estéril	10
3.4. Segundo Experimento de Seleção em Vasos com Solo não Estéril	11
3.5. Experimento para Teste em Vasos de Leonard	12
3.6. Experimento de Coinoculação em Campo	13
3.7. Experimentos de Ocupação Nodular e Redução do Acetileno	15
3.7.1. Análise de redução do acetileno	15
3.7.2. Análise de microscopia óptica e avaliação da ocupação nodular	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Primeiro Experimento de Seleção em Vasos com Solo Não Estéril	17
4.2. Segundo Experimento de Seleção em Vasos com Solo Não Estéril	19
4.3. Experimento de Coinoculação em Vasos de Leonard com as Estirpes Seleccionadas	22
4.4. Experimento de Coinoculação em Campo	25
4.5. Experimento de Ocupação Nodular e Redução do Acetileno	32
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
8. ANEXOS	48

1. INTRODUÇÃO

O feijão é considerado a leguminosa mais importante para consumo humano direto e tem grande importância nos hábitos alimentares de diversos países, muitos deles economicamente emergentes, como países da América Latina e África (BROUGHTON et al., 2003). No Brasil, além do seu evidente valor alimentício como uma fonte básica de proteínas e aminoácidos, o feijão apresenta sua importância econômica e social por envolver uma grande quantidade de pequenos produtores na lavoura (PELEGRIN et al., 2009). O país é o terceiro maior produtor de feijão do mundo (FAOSTAT, 2016), mas esse patamar é resultado da enorme área plantada, acima de 3 milhões de hectares em diversas regiões (CONAB, 2017), em que a produtividade média é relativamente baixa quando comparada ao potencial que a cultura oferece (HUNGRIA et al., 2003).

Os baixos indicadores da produção de feijão no país, em parte, devem-se à baixa aplicação de insumos agrícolas que favoreçam a maior expressão do potencial produtivo da cultura (HUNGRIA et al., 2003). Dentre as necessidades do feijoeiro, o nitrogênio é uma das maiores em termos de nutrientes, e, com o qual, a planta responde diretamente com o aumento da biomassa e produção de grãos (BROUGHTON et al., 2003). A cultura pode extrair o nitrogênio diretamente do solo, dos estoques naturais ou daquele aplicado como fertilizante, ou, por se tratar de uma leguminosa, a planta pode se associar a bactérias conhecidas como rizóbios que são capazes de promover a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).

A FBN no feijoeiro é considerada baixa quando comparada à cultura da soja, capaz de ser autossuficiente em termos de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2006). Há, atualmente, três estirpes de *Rhizobium tropici* recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil (BRASIL, 2011). Além das estirpes recomendadas, o feijoeiro é considerado uma planta promíscua visto sua capacidade de nodular com diversas espécies de rizóbio (MICHIELS et al., 1998) e apresenta baixos índices de ocupação nodular pelas estirpes inoculadas (VARGAS et al., 2000). Nos solos brasileiros, a ampla variedade de estirpes nativas, mais adaptadas às condições naturais, é um fator crucial na resposta à nodulação.

Tem-se estudado, para diversas culturas, dentre elas o feijoeiro, os efeitos gerados pela inoculação com bactérias capazes de favorecer o desenvolvimento da planta, conhecidas como bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR, do inglês *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). São microrganismos, geralmente de vida livre e associados à rizosfera das plantas que, por conta de diversos efeitos, como a produção ou indução da produção de hormônios nas plantas, solubilização e disponibilização de nutrientes, síntese de antibióticos e competição com patógenos, dentre outros, têm a habilidade de promover o crescimento das plantas e aumentar a produção das culturas de interesse econômico. Nesta perspectiva, bactérias capazes de realizar a FBN também são consideradas promotores de crescimento (VERMA et al., 2010).

Diversas culturas têm se beneficiado com a inoculação de PGPR ou com a coinoculação destas com bactérias fixadoras de nitrogênio. No feijoeiro, há diversos estudos com a inoculação de *Azospirillum brasilense* e coinoculação deste com estirpes recomendadas para o feijoeiro (BURDMAN et al., 1996; BURDMAN et al., 1997; REMANS et al., 2007; REMANS et al., 2008). O efeito principal atribuído ao *Azospirillum* é o de favorecer um melhor desenvolvimento do sistema radicular, com a maior formação de pelos radiculares, o que pode favorecer a formação de mais nódulos pela maior disponibilidade de sítios de infecção (BURDMAN et al., 1996). Além do *Azospirillum*, outras bactérias são testadas para efeito de promoção de crescimento (STAJKOVIC et al., 2011), mostrando que pode existir uma ampla gama de microrganismos com potencial para promover o crescimento de plantas a nível de produção.

Dentre esses microrganismos, outras bactérias fixadoras de nitrogênio constituem uma fonte de pesquisa para efeitos de promoção de crescimento. Considerando o feijoeiro como uma planta promíscua, capaz de nodular com uma diversidade de microrganismos de diferentes gêneros (MICHIELS et al., 1998), cogitou-se a hipótese de que a coinoculação da planta com um rizóbio eficiente e um outro ineficiente, mas capaz de induzir a nodulação, pudesse trazer benefícios ao crescimento da planta através da ocupação dos nódulos formados pela estirpe eficiente. Isso se baseia na observação, feita por alguns autores, de que os nódulos formados por várias estirpes de *Bradyrhizobium* são vazios; ou seja, essas estirpes são capazes de induzir a formação de nódulos, porém, sem infectá-los. Este trabalho é a continuação de uma sequência de experimentos já realizados em nosso laboratório que mostraram efeito dessa coinoculação.

Até o momento, no melhor entendimento deste grupo de pesquisa, não há registros de efeito benéfico da coinoculação do feijoeiro com *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, além de uma dissertação de mestrado recentemente defendida na UFRRJ e com a participação desta equipe de trabalho. A ideia seguinte a esses estudos, ao qual se propôs este projeto, foi testar o efeito de outras estirpes de *Bradyrhizobium*, em condições estéreis e não estéreis, e avançar na compreensão dessa interação entre os rizóbios coinoculados e a planta hospedeira.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da coinoculação do feijoeiro com rizóbios eficientes e estirpes de *Bradyrhizobium* no crescimento, nodulação e produtividade das plantas sob condições estéreis, solo não estéril e campo.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Avaliar o potencial de estirpes de *Bradyrhizobium* para coinoculação do feijoeiro em substrato estéril e não estéril;
- Selecionar até 3 estirpes de *Bradyrhizobium* com potencial para coinoculação;
- Avaliar o desempenho dessas estirpes sobre a produtividade do feijoeiro no campo;
- Avaliar a nodulação e infecção dos nódulos (co)inoculados com *Bradyrhizobium*.

As hipóteses do estudo são:

- O feijoeiro é capaz de nodular com estirpes de *Bradyrhizobium*, porém de forma ineficiente;
- A coinoculação *Rhizobium-Bradyrhizobium* aumenta a nodulação e a contribuição da FBN para o feijoeiro;
- A coinoculação *Rhizobium-Bradyrhizobium* aumenta a produtividade do feijoeiro em condições de campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fixação Biológica de Nitrogênio no Feijoeiro

Rizóbios são bactérias fixadoras de nitrogênio que formam nódulos radiculares nas leguminosas. A maioria das espécies de rizóbio estão na família de α -proteobacteria Rhizobiaceae, principalmente nos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* e *Bradyrhizobium*. Entretanto, outros gêneros possuem espécies capazes de induzir a formação de nódulos, como *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Cupriavidus*, *Devosia* e *Shinella* (WEIR, 2016).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta da família Fabaceae capaz de se associar com bactérias comumente conhecidas como rizóbios, e formar estruturas hipertróficas nas raízes onde essas bactérias se desenvolvem e realizam a fixação biológica do N₂ (FBN). Nestas estruturas, os nódulos radiculares, a célula bacteriana se diferencia em bacteroide, e é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônio, que pode ser incorporado nos processos bioquímicos da planta através de um complexo enzimático chamado nitrogenase (VASSE et al., 1990).

As bactérias que nodulam o feijoeiro foram, inicialmente, classificadas como *Rhizobium phaseoli* em função da sua especificidade com a planta hospedeira. O gênero, então, foi dividido, 50 anos depois, em três espécies: *R. meliloti*, *R. loti* e *R. leguminosarum*. *R. leguminosarum* foi, então, dividido em três biovars, de acordo com a leguminosa que nodulava, sendo, para o feijoeiro, chamado de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (STRALIOTTO e RUMJANEK, 2000). O avanço das técnicas de biologia molecular trouxe a identificação de subgrupos de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, dividindo as estirpes nos tipos I e II (MARTÍNEZ et al., 1985; BROM et al., 1988). As estirpes do tipo I foram classificadas em *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli*. As estirpes do tipo II foram reclassificadas em *Rizobium tropici*, inicialmente isoladas de *Phaseolus vulgaris* e *Leucaena leucocephala* (leucena) em solos ácidos tropicais (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). Como *P. vulgaris* e *L. leucocephala* são plantas introduzidas no Cerrado, acredita-se que *R. tropici* fosse simbionte de outra leguminosa da região (STRALIOTTO e RUMJANEK, 2000), assim como também já foi isolado na África (DAGUTAT e STEIN, 1995, ANYANGO et al., 1995) e na França (AMARGER et al., 1994).

Atualmente, três estirpes de *Rhizobium* são recomendadas para a cultura do feijoeiro no país (BRASIL, 2011): CIAT 899 de *R. tropici*, considerada uma estirpe modelo de *R. tropici*, foi isolada em Carmen del Viboral, Colômbia, pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical, resistente a condições tropicais ácidas e a metais pesados (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991, YESSICA, et al., 2013); PRF 81 de *R. freirei* (previamente descrita como *R. tropici* e reclassificada por Dall'agnol et al, 2017), isolada no estado do Paraná, com boas características de FBN, tolerância à acidez, competitividade e produtividade (HUNGRIA et al., 2000); e H 12, de *R. tropici*, isolada no Distrito Federal, também recomendada como inoculante para a cultura por ser eficiente e competitiva (MOSTASSO et al., 2002).

No entanto o feijoeiro é considerado uma planta promíscua (MICHIELS et al., 1998). Os registros da literatura mostram que a planta é capaz de nodular com diversos gêneros de bactérias além de *Rhizobium*, que naturalmente ocorrem nos solos (WANG e WEI, 2016). O feijoeiro também pode ser nodulado por espécies de β -proteobactéria. Talbi et al. (2010) isolaram *Burkholderia phymatum* de nódulos de feijoeiro em solos do Marrocos e verificaram que as estirpes isoladas foram capazes de reduzir acetileno quando cultivadas ex planta. Outra espécie de β -proteobactéria, *Cupriavidus necator*, foi isolada de nódulos de feijoeiro e leucena a partir de solos do estado de Minas Gerais, e, quando reinoculadas, foram capazes de nodular essas plantas, além de outras três leguminosas (SILVA et al., 2012). E, mais

recentemente, foi demonstrado que o feijoeiro nodula com *Paraburkholderia* (previamente *Burkholderia*) em solos ácidos do Brasil (DALL'AGNOL et al., 2016; 2017).

Alguns dos estudos mencionados reportam uma interação entre *Bradyrhizobium* e o feijoeiro (MICHIELS et al., 1998; WANG e WEI, 2016) com a indução na formação de um grande número de nódulos associado a uma grande massa (MICHIELS et al., 1998). Entretanto, essa relação não é eficiente, forma nódulos amorfos, sem atividade da nitrogenase, e foram considerados nódulos ineficientes (GRAHAM e PARKER, 1964; MARTÍNEZ et al., 1985; MICHIELS et al., 1998). Para outras culturas, como a soja e o feijão caupi, o *Bradyrhizobium* é o gênero que se destaca. Para a soja, duas espécies de *Bradyrhizobium* são recomendadas, *B. japonicum*, hoje, chamado de *B. diazoefficiens* (DELAMUTA et al., 2013), e *B. elkanii*.

Em geral, esses dados apontam para a capacidade da planta de feijoeiro nodular com um grande número de bactérias, ressaltando a promiscuidade das interações planta-microrganismo que já é bem conhecida para a cultura (MICHIELS et al., 1998). A questão mais importante associada a este fator é superar a competição entre as estirpes inoculadas e a ampla gama de bactérias que podem competir pelos nichos de nodulação na planta, formando associações que são menos eficientes do que o esperado.

2.2. *Bradyrhizobium*

Bradyrhizobium (adjetivo grego *bradus*, lento, mais o termo genérico *rhizobium*, de bactérias que nodulam leguminosas) é um gênero de estirpes de crescimento lento e não-ácido derivado de *Rhizobium*, que, dentre as diversas características fenotípicas, genéticas e bioquímicas, foi recomendado pela separação do antigo gênero (JORDAN, 1982). O gênero é considerado um dos mais abundantes em amostras de solo coletadas em diversos países (SHAH e SUBRAMANIAN, 2018) e em solos tropicais (HUNGRIA et al., 2015). A espécie *B. japonicum* foi definida como a espécie tipo do gênero (JORDAN, 1982) e reclassificada como de *B. diazoefficiens* (DELAMUTA et al., 2013). Dentre a diversidade genética em *B. japonicum*, foi identificada a espécie *B. elkanii* (KUYKENDALL et al., 1992). As duas espécies são recomendadas para a cultura da soja no país (BRASIL, 2011) e, logo, já contam com um conhecimento técnico-científico de produção a nível industrial.

As espécies de *Bradyrhizobium* são bastantes conhecidas pela nodulação com soja e feijão-caupi. A soja é a leguminosa mais importante plantada mundialmente. Os programas de seleção de cultivares de soja no Brasil priorizaram características de produtividade, resistência à doenças e qualidade de semente, associadas à adaptação ao Cerrado brasileiro (comprimento de dia curto e altas temperaturas), e, em termos de adaptação à fertilidade, seleção para a FBN (HUNGRIA et al., 2005; HUNGRIA et al., 2015). Atualmente, como resposta aos processos de seleção de cultivares e estirpes de *Bradyrhizobium*, o Brasil é o segundo maior produtor, com uma produção estimada em mais de 111 milhões de toneladas anuais, com produtividade de 3185 kg ha⁻¹ (CONAB, 2018). A relação entre a planta e as estirpes tornou-se tão eficiente que a soja, hoje, é a uma das produtoras de grãos que mais contribui com a fixação biológica, tendo sido estimada uma taxa de 155 kg N ha⁻¹ obtido pela FBN no Brasil (BODDEY et al., 1990), mas com registros de N fixado superiores, de 311 kg N ha⁻¹ (UNKOVICH e PATE, 2000) e até 450 kg N ha⁻¹ (RENNIE et al., 1988).

Durante o processo de seleção de cultivares de soja e estirpes de *Bradyrhizobium* no Brasil, foram utilizadas poucas estirpes para selecionar os novos cultivares, mais adaptados às condições brasileiras, o que resultou em uma alta especificidade entre a planta e a estirpe (HUNGRIA e MENDES, 2015). Uma das estirpes mais utilizadas de *B. japonicum* (reclassificado como *B. diazoefficiens*) é a USDA 110, isolada de soja em 1959, na Flórida, USA (KEYSER e GRIFFIN, 1987). Essa estirpe tem sido recomendada, desde então, como

inoculante nos Estados Unidos, Europa, Ásia e África (HUNGRIA e MENDES, 2015) e é considerada uma estirpe modelo da espécie (VAN BERKUM e FUHRMANN, 2000).

No Brasil, uma das estirpes selecionadas durante o período de expansão da cultura, a partir do final dos anos 1960, foi a estirpe SEMIA 587 de *B. elkanii*, isolada em 1967, no Rio Grande do Sul, que ainda permanece recomendada para a cultura (BRASIL, 2011; HUNGRIA e MENDES 2015). Outra estirpe selecionada foi a estirpe 29w de *B. elkanii*, selecionada em 1979. A estirpe mostrou-se eficiente e competitiva em regiões de Cerrado, principal bioma onde a cultura é produzida, e até hoje permanece como recomendada para a cultura (VARGAS et al., 1992; BRASIL, 2011; HUNGRIA e MENDES 2015). Em seguida, a com a alta demanda de N pelas cultivares mais produtivas, novos programas de seleção foram realizados. Uma das formas de seleção foi a recuperação de nódulos de soja de áreas com histórico de inoculação de *Bradyrhizobium* SEMIA 566, e, dessa forma, foi selecionada a estirpe CPAC 15 *B. japonicum* (*B. diazoefficiens*), que se mostrou mais eficiente na produção de grãos que as estirpes 29w e SEMIA 587 (VARGAS et al., 1992; PERES et al., 1993; HUNGRIA e MENDES 2015). A segunda forma de seleção de estirpes foi baseada no isolamento de colônias individuais da estirpe CB 1809, por variantes com boa FBN e competitividade. Após ensaios de casa de vegetação, de campo e reisolamento dos nódulos, foi identificada a estirpe CPAC 7 de *B. japonicum* (*B. diazoefficiens*), que também se mostrou eficiente na simbiose e na produção de grãos (VARGAS et al., 1992; PERES et al., 1993; HUNGRIA e MENDES 2015). As estirpes 29w, SEMIA 587, CPAC 7 e CPAC 15 ainda são recomendadas para a cultura da soja no país (BRASIL, 2011).

O gênero *Bradyrhizobium* também é reconhecido por nodular diversas espécies de leguminosas florestais (TURK e HEISER, 1992, MOREIRA et al., 1993). A grande diversidade do gênero tem sido avaliada, mas o conhecimento sobre o gênero e suas espécies ainda é pouco documentado (HUNGRIA et al., 2015; DELAMUTA et al., 2017). O gênero é comumente encontrado em nódulos de diversas espécies florestais como *Acacia mangium*, *Acacia auriculiformis*, *Albizia lebbek* (TURK e HEISER, 1992). Recentemente, diversas espécies foram descritas de estirpes isoladas em solos da Amazônia, tanto de leguminosas herbáceas: *B. manausense* e *B. brasilense* de *Vigna unguiculata* (SILVA et al. 2014a, COSTA et al., 2017), *B. stylosanthis* de *Stylosanthes capitata* (DELAMUTA et al. 2016) e *B. brasilense* de *Macroptilium atropurpureum* (COSTA et al., 2017); e de leguminosas florestais: *B. neotropiale*, *B. centrolobii* e *B. macuxiense* de *Centrolobium paraense* (ZILLI et al., 2014), *B. ingae* de *Inga laurina* (SILVA et al., 2014) e *B. forestalis* de *Inga* sp. e *Swartzia* sp. (COSTA et al., 2018).

2.3. Produção e Produtividade da Cultura do Feijoeiro

As pesquisas vêm mostrando que a FBN pode favorecer altas produtividades na cultura do feijoeiro, muito acima das médias nacionais, entretanto, a média geral da produtividade nacional ainda é considerada baixa (HUNGRIA et al., 2003). Na safra 2016/2017, a produção total de feijão comum no país correspondeu a, aproximadamente, 3,4 milhões de toneladas, distribuídas em 3 milhões de hectares, com uma média de produtividade de 1050 kg ha⁻¹. Os estados do Paraná, Minas Gerais e Bahia são os maiores produtores, e, juntamente com Ceará, lideram a lista de área plantada (CONAB, 2017). Para 2018, a estimativa da produção de feijão alcança 3,3 milhões de toneladas, com queda de 2% frente ao ano anterior. A área plantada e a produtividade praticamente se mantiveram as mesmas.

A produtividade do feijoeiro, no entanto, é capaz de alcançar valores muito acima da média nacional, principalmente quando a cultura é suprida de insumos e em experimentos com inoculação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada. Em algumas pesquisas de seleção de estirpes para o feijoeiro e de respostas da planta à inoculação e/ou à adubação com

nitrogênio mineral é comum encontrar valores de produtividade acima de 2000 kg ha⁻¹, alguns, chegando até a 3000 kg ha⁻¹ (MOSTASSO et al., 2002; HUNGRIA et al., 2003; PELEGRIN et al., 2009; BRITO et al., 2015). Isso também pode ser observado em dados de produtividade média de alguns estados, como Goiás, que ultrapassou 2500 kg ha⁻¹ em 2016, considerando as três safras anuais (CONAB 2017).

Entretanto, as baixas médias no país estão intrinsecamente associadas ao baixo nível tecnológico empregado na cultura e a solos com baixa fertilidade, especialmente em termos de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2003); e baixos níveis de fósforo, pH baixo, e altas temperaturas (HUNGRIA e VARGAS, 2000); e a fatores da relação planta-rizóbio, como a capacidade do feijoeiro em nodular com diversas espécies de rizóbio, nem sempre com resposta positiva (MICHIELS et al., 1998), a baixa taxa de ocupação nodular pela estirpe inoculada (VARGAS et al., 2000), e a ocorrência de populações naturais de rizóbios altamente adaptadas às condições tropicais (GRANGE e HUNGRIA, 2004), que podem apresentar alta competitividade com a estirpe comercial (MOSTASSO et al., 2000).

Diversos fatores, tanto genéticos quanto ambientais, contribuem para que a performance do feijoeiro inoculado fique aquém do esperado. A nodulação no feijoeiro é relativamente lenta (CHAVERRA et al., 1992). Como consequência, a FBN não contribui de forma significativa para a nutrição nitrogenada da planta em cultivares de feijoeiro de ciclo curto (ISOI e YOSHIDA, 1991; CHAVERRA et al., 1992). Estimativas indicam que a simbiose rizóbio-feijoeiro foi capaz de fixar até 129 mg N planta⁻¹ (AKTER et al., 2014). Hardarson et al. (1993) encontraram valores de N fixado de 11 a 50 kg N ha⁻¹, no Brasil, e valores que alcançaram 108 kg N ha⁻¹ no México. Esta capacidade de fixação pode variar em função de diversos fatores que afetam diretamente a nodulação. A simbiose rizóbio-feijoeiro é bastante sensível a fatores ambientais como temperatura, umidade e acidez do solo, que podem restringir a formação de nódulos (HUNGRIA & VARGAS, 2000). A nodulação também é afetada pela competição entre as estirpes inoculadas e os rizóbios nativos do solo, que, muitas vezes, são competitivos mas pouco eficientes na fixação do nitrogênio (GRAHAM, 1981; THIES et al., 1991; MOSTASSO et al., 2000). A maioria dos solos em que o feijoeiro é cultivado no Brasil possui estirpes nativas de rizóbio que podem competir pela nodulação, resultando em associações simbióticas menos eficientes em relação à inoculação (VARGAS et al., 2000; RAPOSEIRAS et al., 2006).

Em termos de nutrientes, a cultura do feijoeiro tem como uma das principais exigências o nitrogênio (CARVALHO et al., 2001). As principais fontes de nitrogênio para a cultura são o solo e a matéria orgânica nele contida, a fertilização com adubos nitrogenados e a fixação biológica pela associação com rizóbios (HUNGRIA et al., 1997). Visto que o processo industrial de obtenção de nitrogênio atmosférico é caro e trabalhoso, a FBN tem inúmeras vantagens com baixo custo energético, renovável e manipulável (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O suprimento adequado de nitrogênio através da simbiose com rizóbios eficientes pode aumentar a produção a um custo menor e prevenir poluição de corpos hídricos por contaminação com nitrogênio (HUNGRIA et al., 2003). Há, então, além de uma questão econômica, uma perspectiva de conservação de recursos naturais que urge a necessidade do melhoramento da FBN na cultura do feijoeiro.

De forma a suprir a necessidade de nitrogênio da cultura, algumas pesquisas de campo vêm sendo realizadas com a associação da inoculação das estirpes eficientes e comerciais de rizóbio com baixas doses de nitrogênio mineral como estratégia para melhorar os efeitos da FBN (PELEGRIN et al., 2009; BRITO et al., 2015). A hipótese é que haja a suplementação de nitrogênio até o estabelecimento eficiente da nodulação, de forma que a cultura possa se desenvolver até a FBN ser capaz de fornecer as necessidades de nitrogênio da planta (OLIVEIRA et al., 2003). Isso, no entanto, deve ser equilibrado e a dosagem deve

proporcionar o desenvolvimento da cultura de forma que não haja prejuízo à simbiose com os rizóbios (BRITO et al., 2015).

Além dos rizóbios e de sua capacidade associativa com as leguminosas, um outro grupo de microrganismos se destaca promovendo associações com plantas de forma a proporcionar benefícios que podem ser implantados na lavoura, as bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR, do inglês *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). São bactérias capazes de colonizar o sistema radicular de plantas e promover benefícios de diversas formas, que levam ao melhor desenvolvimento do vegetal, e que podem ser inoculadas juntamente com os rizóbios (VERMA et al., 2010).

2.4. Coinoculação com Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas

Bactérias promotoras do crescimento vegetal são um grupo de bactérias de vida livre que possuem a capacidade de promover o crescimento e aumentar a produção de plantas cultivadas. Estes efeitos de crescimento podem ocorrer de forma indireta quando essas bactérias reduzem ou previnem o efeito deletério de organismos patogênicos, competem por nichos na rizosfera, e induzem a resistência sistêmica do vegetal; e diretamente no crescimento das plantas quando envolvem a síntese de compostos, induzem a síntese de fitormônios ou quando as bactérias facilitam a absorção de algum tipo de nutriente na rizosfera (como através da solubilização de fósforo). Isso inclui as diversas bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam a rizosfera e os rizóbios da simbiose leguminosa-rizóbio (VERMA et al., 2010).

A inoculação simultânea de plantas com *Rhizobium* e outras bactérias promotoras de crescimento tem mostrado potencial para o desenvolvimento da planta, nodulação e fixação de nitrogênio em diversas leguminosas (REMANS et al., 2007). A resposta positiva à coinoculação destas plantas pode ser atribuída a uma nodulação mais precoce, ao aumento do número de nódulos e ao melhor desenvolvimento do sistema radicular (BURDMAN et al., 1996; REMANS et al., 2008), que podem levar a uma maior taxa de fixação e disponibilidade de nitrogênio e a maior absorção de nutrientes, que, conseqüentemente, pode culminar com a maior produção de grãos.

Em experimento em sistema hidropônico, Burdman et al. (1996) verificaram que a coinoculação do feijoeiro com uma mistura de *Rhizobium tropici* (CIAT 899) e *Rhizobium etli* (TAL 182) (sob diferentes concentrações) e *Azospirillum brasilense* Cd (ATCC 29729) aumentou, em média, o número de nódulos das raízes em 17% e promoveu a formação de pelos radiculares na ordem de 66% quando *A. brasilense* foi inoculado sozinho. O desenvolvimento de pelos radiculares nos estágios iniciais pode contribuir para o suprimento da demanda de água e minerais da plântula (GERMAN et al., 2000) especialmente considerando que 60% da produção de feijão nos países em desenvolvimento ocorre em condições de estresse hídrico (GRAHAM e RANALLI, 1997). Burdman et al. (1996) ainda verificaram que *A. brasilense* aumentou a secreção de flavonóides indutores dos genes de nodulação. Esses resultados mostram que *A. brasilense* aumenta a nodulação no feijoeiro, e que parte desse efeito pode ser explicada pelo maior desenvolvimento do sistema radicular com a formação de mais pelos radiculares e pela maior secreção de flavonóides indutores dos genes de nodulação.

Outros experimentos com *Azospirillum brasilense* também têm mostrado bons indícios que confirmam e justificam a coinoculação e o efeito das PGPR no feijoeiro. Burdman et al. (1997) também verificaram o aumento do número de nódulos totais e nódulos da parte superior da raiz em coinoculação de *Rhizobium tropici* (CIAT 899) e *Azospirillum brasilense* Cd (ATCC 29729), sugerindo-se que isso pode levar a uma nodulação precoce uma vez que nódulos da parte superior da raiz são formados primeiro. Os experimentos

verificaram aumento na redução do acetileno nos tratamentos coinoculados indicando uma maior FBN. Também foi reportado que doses elevadas dos inoculantes podem inibir o ganho de biomassa e área foliar, sendo necessário um ajuste nas doses. Em experimento seguinte, doses menores do inoculante de *Azospirillum* coinoculado levaram ao maior acúmulo de biomassa (BURDMAN *et al.*, 1997).

Além do *Azospirillum*, outras bactérias têm sido usadas como promotoras de crescimento no feijoeiro. Stajkovic *et al.* (2011) testaram, em casa de vegetação, duas estirpes de *Bacillus* e duas de *Pseudomonas* em coinoculação com *Rhizobium phaseoli* e avaliaram, em alguns tratamentos, o aumento da matéria seca de parte aérea, e teores de nitrogênio e fósforo nas plantas. Remans *et al.* (2007) avaliaram o efeito de quatro PGPR no feijoeiro sob condições de suficiência e insuficiência de fósforo, mostrando que três delas eram fortemente dependentes da nutrição com fósforo. As pesquisas mostram que há um efeito sólido na coinoculação do feijoeiro com PGPR, mas que alguns dos mecanismos ainda permanecem ocultos e que os diversos fatores ambientais afetam diretamente o resultado da coinoculação, sendo necessário pesquisas mais aprofundadas no tema.

Em outro efeito atribuído aos promotores de crescimento, estudos de resistência à seca por ação de PGPR têm obtido resultados promissores. Plantas de feijoeiro coinoculadas com *Rhizobium tropici* e *Paenibacillus polymyxa* tiveram maior acúmulo de biomassa de parte aérea e número de nódulos em condições de deficiência hídrica em relação ao controle apenas com *Rhizobium* e ao controle sem inoculação, ajudando a aliviar os efeitos causados pelo estresse (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Esses resultados mostram o potencial de PGPR para aliviar condições de estresse hídrico, que afetam diretamente o crescimento e nodulação das plantas (MNASRI *et al.*, 2007) e a produção de grãos (ACOSTA-GALEGOS e SHIBATA, 1989).

Dentre os mecanismos propostos para ação de microrganismos na resistência ao estresse hídrico estão a produção do ácido indolacético (AIA), que é responsável por induzir o crescimento e aumento da superfície das raízes (KLOEPPER *et al.*, 2007), possibilitando, assim, o aumento dos sítios de infecção para os rizóbios; e a produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)-deaminase, que degrada o ACC, precursor do fitormônio etileno, que, endogenamente, regula a homeostase da planta em condições de estresse, reduzindo crescimento de raízes e parte aérea (SALEEM *et al.*, 2006; GLICK *et al.*, 2007) e inibindo a nodulação (MA *et al.*, 2002). A ACC-deaminase metaboliza o ACC em α -acetobutirato e amônia, e inibe a produção de etileno que, por sua vez, inibe o crescimento das raízes (HONMA e SHIMOUTA, 1978). Plantas inoculadas com bactérias que contêm ACC-deaminase podem apresentar maior crescimento de raízes em função da menor quantidade de etileno e resistir melhor a situações de estresse. (BURD *et al.*, 2000). Dentre os microrganismos que possuem esses mecanismos, e que tem potencial para promoção de crescimento, pode-se citar espécies do gênero *Azospirillum* (GERMAN *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2009).

No caso do *Bradyrhizobium*, não foram encontrados registros de que produza ACC-deaminase, mas algumas espécies do gênero, como *B. elkanii*, são conhecidas pela produção de rizobitoxina, que também apresenta ação de inibidor do etileno (MINAMISAWA e KUME, 1987). Apesar da inconsistência de alguns resultados, é reportado que há uma redução na sensibilidade ao etileno em algumas leguminosas, que pode ser explicada pela sensibilidade inerente à espécie vegetal (YUHASHI *et al.*, 2000).

Propõe-se, neste trabalho, testar outras espécies de bactérias, com uma abordagem de coinoculação de rizóbios, de modo que um desses rizóbios agiria como um estimulador da nodulação com a estirpe eficiente, deste modo contribuindo para a FBN na planta. Esta hipótese surgiu a partir da observação de que grande número de estirpes de rizóbio, em

especial *Bradyrhizobium*, estimulam a nodulação profusa do feijoeiro, porém com a formação de nódulos vazios e, obviamente, ineficientes (MICHIELS et al., 1998).

A premissa é que os nódulos ineficientes formados pelas estirpes de *Bradyrhizobium* possam ser infectados pela estirpe eficiente coinoculada. O nódulo, então ineficiente, passaria a se desenvolver, e abrigar os bacteroides da estirpe eficiente, passando a fixar nitrogênio e contribuir ativamente para o crescimento da planta. Ao contrário do que é reportado na literatura (MICHIELS et al., 1998), foram encontradas evidências que os nódulos induzidos pelo *Bradyrhizobium* não são vazios, e foi possível isolar as bactérias em meio de cultura e observá-las no interior dos nódulos através de microscopia ótica.

A coinoculação de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* foi tentada apenas uma vez por Bastos (2016). Os resultados mostraram que a coinoculação tem efeito sobre a nodulação e crescimento das plantas. As plantas coinoculadas acumularam mais biomassa e nitrogênio na parte aérea, e produziram mais nódulos que o controle com a estirpe eficiente, em condições de vasos de Leonard. Esses resultados, além disso, foram dose-dependente, manifestando-se quando o *Bradyrhizobium* foi aplicado na mesma dose que o *Rhizobium* (BASTOS, 2016). Outros dados de Bastos (2016) mostram que, em condições de solo não estéril, também há efeito da coinoculação, porém, menos expressivo, provavelmente em função da competição das estirpes inoculadas com as bactérias nativas. A resposta da planta à coinoculação nessa condição é inconsistente e os resultados apontam para necessidade de se trabalhar melhor a metodologia de inoculação para que o efeito observado se expresse de forma significativa no solo, na presença de uma comunidade microbiana diversa e, provavelmente, rica em rizóbios nativos.

Ainda não se sabe se o *Bradyrhizobium* desempenha algum papel na indução de resistência à situação de estresse em condição de coinoculação no feijoeiro. É reportado na literatura que *Bradyrhizobium elkanii* produz e secreta AIA, enquanto que *B. diazoefficiens*, previamente descrito como *B. japonicum* (STANLEY et al., 1985) não produz AIA (MINAMISAWA e FUKAI, 1991). Fukuhara et al., (1994) propuseram que a produção localizada de AIA pode manter os meristemas das raízes ativos e aumentar a nodulação em soja. Assim sendo, um possível mecanismo para a manifestação dos efeitos da coinoculação *Rhizobium-Bradyrhizobium* no feijoeiro pode estar no fato da estirpe coinoculada de *Bradyrhizobium* produzir AIA, levando ao crescimento radicular e aumento da nodulação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Crescimento de Bactérias e Preparo de Inóculos

O cultivo das bactérias e preparo dos inóculos dos experimentos propostos seguiram o mesmo método, variando-se apenas as estirpes conforme cada experimento. A estirpe controle utilizada foi a CIAT 899 (= BR322; = SEMIA 4077) de *Rhizobium tropici*, que, em simbiose com o feijoeiro, fixa nitrogênio eficientemente e é recomendada como inoculante para a cultura (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; HUNGRIA et al., 2003; BRASIL, 2011). As estirpes coinoculadas foram do gênero *Bradyrhizobium*, selecionadas a partir da lista disponível na Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. Foram selecionadas 7 estirpes com base em resultados de ensaios prévios e resultados da literatura (MICHIELS et al., 1998), e utilizadas conforme a necessidade de cada experimento. As culturas foram mantidas sob refrigeração e, quando necessário, repicadas para meio YMA para renovação das colônias.

Os inóculos foram preparados em meio líquido TY (triptona, 5 g; extrato de levedura, 3 g; CaCl₂.H₂O, 0,9 g; água destilada 1000 mL; Ph 6,8-7,2) ou YM (manitol, 10 g; K₂HPO₄ 10% P/V, 1 mL; KH₂PO₄ 10% P/V, 4 mL; MgSO₄.H₂O 10% P/V, 2 mL; NaCl 10% P/V, 1 mL, extrato de levedura, 0,4 g; água destilada, 1000 mL; pH 6,8-7,0) (DÖBEREINER et al., 1999), com pH entre 6,8 e 7,0. A estirpe CIAT 899 foi crescida com 3 dias de antecedência à inoculação, sob agitação de 150 rpm em câmara de incubação a 30°C. As estirpes de *Bradyrhizobium* foram cultivadas da mesma forma, porém com tempo de crescimento de 7 dias. Nas ocasiões de montagem dos experimentos, para a lavagem das bactérias, o inóculo foi centrifugado, em tubos de centrifugação de 50 mL, estéreis, por 10 minutos, a 4°C e 4000 g, com uma centrifugação para retirar o meio de cultura e mais três centrifugações sucessivas, nas mesmas condições, com solução de NaCl a 0,85%. Após o processo de lavagem, as células foram ressuspensas com a mesma solução salina e a densidade óptica (DO) dos inóculos foi ajustada para 0,8 a 1,0 em espectrofotômetro a 600 nm, que corresponde a, aproximadamente, 10⁸ UFC mL⁻¹.

3.2. Limpeza e Germinação das Sementes de Feijoeiro

Foi utilizada a cultivar Pérola de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). As sementes foram desinfestadas superficialmente com etanol 96° por 30 segundos e, após, por 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1%. Posteriormente, foram lavadas com água destilada autoclavada por dez vezes. As sementes foram germinadas em placas de vidro autoclavadas, previamente preparadas com algodão e papel filtro, por 3 dias em ausência de luz a 30°C.

3.3. Primeiro Experimento de Seleção em Vasos com Solo Não Estéril

O primeiro experimento realizado teve o objetivo de avaliar o efeito da coinoculação das estirpes USDA 110 (= BR 116, = TAL 102) e 29w (= BR 29, = SEMIA 5019), de *Bradyrhizobium*, com a estirpe CIAT 899, de *R. tropici*, em solo não estéril.

O experimento foi conduzido no delineamento de blocos casualizados, com 6 repetições e 6 tratamentos. Os tratamentos testados foram os seguintes: inoculação com a estirpe 29w de *Bradyrhizobium elkanii* (10⁸ UFC semente⁻¹); inoculação com a USDA 110 de *B. diazoefficiens* (10⁸ UFC semente⁻¹); coinoculação com as estirpes 29w e CIAT 899 (10⁸ UFC semente⁻¹, cada); coinoculação com as estirpes USDA 110 e CIAT 899 (10⁸ UFC semente⁻¹, cada); inoculação com a CIAT 899 (10⁸ UFC semente⁻¹); e um controle absoluto,

sem inoculação. Cada semente pré-germinada recebeu a dose proposta de rizóbios em 1 mL de cada inoculante com dose ajustada através de pipeta automática e ponteiras estéreis.

O experimento foi montado em vasos com 3 kg de solo do horizonte subsuperficial de um Argissolo proveniente do campo experimental da Embrapa Agrobiologia. Os resultados da análise química do solo foram: pH, 5,34; C, 0,55%; Al, 0,10 cmol_c kg⁻¹; Ca, 1,27 cmol_c kg⁻¹; Mg, 0,60 cmol_c kg⁻¹; P, 1,44 mg dm⁻³; K, 13,55 mg dm⁻³. A calagem foi realizada em cada vaso conforme a recomendação do Manual de Adubação e Calagem do Estado do Rio de Janeiro (FREIRE et al., 2013), e, 15 dias após, cada vaso recebeu as seguintes doses de nutrientes: 10 mg kg⁻¹ de Mg, como MgSO₄.7H₂O; 2 mg kg⁻¹ de Cu, como CuSO₄.5H₂O; 1 mg kg⁻¹ de Zn, como ZnSO₄.7H₂O; 0,1 mg kg⁻¹ de B, como H₃BO₃; 0,2 mg kg⁻¹ de Mo, como Na₂MoO₄.2H₂O, 1 mg kg⁻¹ de Fe, como Fe-EDTA e 80 mg kg⁻¹ de P, como KH₂PO₄. O solo apresentou uma contagem de rizóbios em feijoeiro comum de 3,57 UFC g solo⁻¹ úmido pelo método do Número Mais Provável (WOOMER et al, 1988).

Após adubação, o solo foi homogeneizado e cada vaso recebeu 4 sementes pré-germinadas e os inoculantes conforme cada tratamento. Após 10 dias, duas plantas foram desbastadas e as outras duas permaneceram até o final do experimento. O experimento foi coletado quando 50% das plantas encontravam-se no estágio R6 (floração plena), aos 44 dias após semeadura. A parte aérea foi cortada ao nível do solo e colocada para secar em estufa de circulação de ar fechada, a 65°C para secagem, até peso constante. O sistema radicular foi lavado em água corrente e acondicionado sob refrigeração até a retirada e contagem de nódulos. As raízes e os nódulos foram secos sob as mesmas condições da parte aérea. A parte aérea foi moída e submetida para análise de N total pelo método Kjeldahl.

As seguintes variáveis foram mensuradas: massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSNN) e nitrogênio da parte aérea (N). A análise dos dados foi realizada no ambiente R (R CORE TEAM 2017) e na plataforma RStudio (R TEAM STUDIO, 2017).

As premissas de normalidade e heterogeneidade de variância dos resíduos foram analisadas para cada variável por análise gráfica e pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett. Concluiu-se que os dados não apresentaram distribuição normal e que a variância dos resíduos era heterogênea. Os dados de MSPA, MSR e MSNN foram submetidos à transformação de Box-Cox, que se apresentou eficiente em adequar às premissas de normalidade e homocedasticidade. As variáveis foram submetidas à ANOVA e teste de médias de Duncan a 5% de probabilidade, com a função *lsmeans* do pacote *emmeans* (LENTH, 2017).

3.4. Segundo Experimento de Seleção em Vasos com Solo não Estéril

Foi montado um experimento em vasos com solo não estéril com o objetivo de selecionar, dentre sete estirpes de *Bradyrhizobium*, as três que proporcionassem maior acúmulo de biomassa quando coinoculadas com a estirpe controle CIAT 899 de *R. tropici*. A escolha das estirpes foi baseada no experimento anterior, além de mais cinco estirpes selecionadas a partir de Michiels et al. (1998).

O experimento foi conduzido no delineamento de blocos casualizados, no esquema fatorial completo 8x2, com o primeiro fator sendo a inoculação ou não das estirpes de *Bradyrhizobium*, e o segundo, a inoculação ou não da estirpe eficiente CIAT 899 de *R. tropici*. As estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas neste experimento foram: 29w (*B. elkanii*), USDA 110 (*B. diazoefficiens*), CPAC 7 (*B. diazoefficiens*, = BR 85), BR 5609 (*Bradyrhizobium* sp.), BR 6204 (*Bradyrhizobium* sp.), BR 10303 (*Bradyrhizobium* sp.) e INPA 14B (*Bradyrhizobium* sp.).

O experimento foi montado com solo de horizonte superficial de um Argissolo proveniente do campo experimental da Embrapa Agrobiologia. A análise química do solo

mostrou os seguintes resultados: pH, 6,04; C, 0,88%; Al, 0,00 cmol_c kg⁻¹; Ca, 3,06 cmol_c kg⁻¹; Mg, 1,09 cmol_c kg⁻¹; P, 3,38 mg dm⁻³; K, 110,3 mg dm⁻³. Não foi necessário realizar a calagem para este solo. Antes do plantio, o solo recebeu as seguintes doses de nutrientes: 10 mg kg⁻¹ de Mg, como MgSO₄.7H₂O; 2 mg kg⁻¹ de Cu, como CuSO₄.5H₂O; 1 mg kg⁻¹ de Zn, como ZnSO₄.7H₂O; 0,1 mg kg⁻¹ de B, como H₃BO₃; 0,2 mg kg⁻¹ de Mo, como Na₂MoO₄.2H₂O, 1 mg kg⁻¹ de Fe, como Fe-EDTA, e 120 mg kg⁻¹ de P, como KH₂PO₄. Foram utilizados 4 kg de solo por vaso. Anteriormente, foi realizada uma contagem de rizóbios em feijoeiro neste solo, que mostrou uma população estimada em 9,1 UFC g⁻¹ de solo, pelo método do Número Mais Provável (WOOMER et al, 1988).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia. No plantio, foram semeadas 4 sementes pré-germinadas por vaso. Cada uma das sementes foi inoculada com 1 mL de um inóculo ajustado para D.O. 0,8, correspondente a, aproximadamente, 10⁸ UFC mL⁻¹. O preparo dos inoculantes foi feito conforme descrito no item 3.1. Os vasos foram desbastados após 10 dias e foram duas plantas por vaso. Aos 23 dias de cultivo, foi realizada uma adubação de cobertura a meia força iônica da dose inicial em função do aparecimento de sintomas que se assemelhavam à deficiência de Mg. O experimento foi coletado quando 50% das plantas encontravam-se no estágio R6 (Figura 2).

As variáveis mensuradas foram a massa seca da parte aérea e a massa seca das raízes. A parte aérea foi cortada na região do coleto e acondicionada em sacos de papel para a secagem. O sistema radicular foi coletado em uma peneira, sob lavagem com água corrente, de forma a minimizar os danos e perdas de raízes. O material vegetal foi colocado em estufa de circulação de ar fechada, a 65°C para secagem, até peso constante. Após seco, todo o material foi pesado.

A análise de variância foi executada no ambiente R (R CORE TEAM 2017) e na plataforma RStudio (R TEAM STUDIO, 2017), e auxílio dos pacotes *agricolae* (DeMENDIBURU, 2009) e *easyanova* (ARNHOLD, 2013). Em função da falta de normalidade dos dados de MSPA, a variável foi submetida ao teste não paramétrico de Kruskal-Conover, a 5% de probabilidade, com o pacote *PMCMR* (POHLERT, 2014); enquanto que os dados de MSR (normais e homocedásticos) foram submetidos ao teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade, com o pacote *emmeans* (LENGTH, 2017).

3.5. Experimento para Teste em Vasos de Leonard

As duas estirpes que proporcionaram maior incremento em biomassa vegetal em coinoculação no solo não estéril foram selecionadas para serem avaliadas em vasos de Leonard, com substrato estéril. Além delas, foi avaliada a estirpe USDA 110, que é a estirpe modelo do gênero *Bradyrhizobium*.

O experimento foi conduzido no delineamento de blocos casualizados, com 6 tratamentos e 6 repetições. Os tratamentos foram: três coinoculados com *R. tropici* CIAT 899 e as estirpes de *Bradyrhizobium* 29w (*B. elkanii*), USDA 110 (*B. diazoefficiens*) e CPAC 7 (*B. diazoefficiens*), um controle com a estirpe CIAT 899, uma testemunha nitrogenada e uma testemunha sem inoculação.

O experimento foi conduzido em vasos de Leonard, tendo como substrato 1 kg de uma mistura 1:1 (v/v) de pedra fina (brita n° 1) e vermiculita, autoclavados a 120 °C por 30 minutos. Cada vaso recebeu quatro sementes pré-germinadas da cultivar Pérola e 1 mL de inóculo na dose de 10⁸ UFC mL⁻¹ conforme descrito no item 3.1, ajustado diretamente da suspensão em crescimento, sem centrifugação. Duas plantas foram desbastadas 10 dias após a semeadura e o experimento foi conduzido com duas plantas até o momento da colheita.

Foram utilizados, como fonte de nutrientes, 400 mL de solução nutritiva (NORRIS e T'MANNETJE 1964), a qual foi trocada semanalmente. O tratamento nitrogenado recebeu,

também semanalmente, uma solução nutritiva com 70 mg N nas duas primeiras semanas, 105 mg N nas duas semanas seguintes, e 140 mg N pelo restante do experimento, totalizando 630 mg N, na forma de NO_3NH_4 . Houve a necessidade de aumentar a dose de nitrogênio para este tratamento, visto que as plantas não estavam respondendo às doses utilizadas anteriormente.

O experimento foi coletado no estádio R6 (floração plena) (Figura 3). As seguintes variáveis foram avaliadas: massa seca de folhas (MSPAF), massa seca de caule (MSPAC), massa seca total da parte aérea (MSPAT), massa seca de raízes (MSR), número total de nódulos (NNT), massa seca total de nódulos (MSNNT), número de nódulos maiores que 2,00 mm ($\text{NN}>2$), massa seca de nódulos maiores que 2,00 mm ($\text{MSNN}>2$), número de nódulos menores que 2,00 mm ($\text{NN}>2$), massa seca de nódulos menores que 2,00 mm ($\text{MSNN}>2$).

A parte aérea foi separada em caule e folha, e levada à estufa de circulação de ar fechada a 65°C , até peso constante. As raízes foram acondicionadas sob refrigeração até a retirada e contagem de nódulos, e ambos também foram levados à estufa para secagem. A separação dos nódulos por tamanho foi feita por peneiramento, com os nódulos ainda frescos, assim que foram retirados das raízes.

A análise de variância e os testes de Tukey e Kurskal-Conover (5% de probabilidade) foram executados no ambiente R (R CORE TEAM 2017) e na plataforma RStudio (R TEAM STUDIO, 2017), com os pacotes *agricolae* (DeMENDIBURU, 2009) e *easynova* (ARNHOLD, 2013). Com exceção das três variáveis da parte aérea (MSPAF, MSPAC, MSPAT), que não apresentaram homogeneidade de variância nos resíduos, todos os outros foram considerados com distribuição normal e com variâncias homogêneas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, e por análise gráfica. Os dados de parte aérea, então, foram submetidos ao teste de comparação não paramétrico de Kruskal-Conover com o pacote *PMCMR* (POHLERT, 2014), a 5% de probabilidade, enquanto que as demais variáveis foram submetidas ao teste de médias de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.6. Experimento de Coinoculação em Campo

Baseado em todos os experimentos anteriores, e nos efeitos positivos encontrados através da coinoculação do feijoeiro com *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, foi realizado um experimento de campo para avaliar se os efeitos positivos na simbiose se refletem, efetivamente, na produção de grãos. Foram testadas duas das melhores estirpes dos experimentos anteriores, com duas formas de aplicação.

O experimento foi conduzido no delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial $3 \times 2 + 2$, com 4 repetições por tratamento. Os tratamentos foram formados a partir da combinação de dois fatores: o tipo de inóculo, isto é, dois tipos de coinoculação ou inoculação apenas com a estirpe eficiente (29w + CIAT 899, CPAC 7 + CIAT 899 e CIAT 899); e a forma de aplicação dos inoculantes, a saber, a inoculação na semente ou a inoculação na semente e no sulco de plantio. Os tratamentos adicionais foram uma testemunha adubada com nitrogênio (e que não foi inoculada com nenhuma das bactérias) e a testemunha absoluta (o controle sem nitrogênio e sem inoculação). Ao total, foram avaliados 8 tratamentos.

A área experimental mediu 1025 m^2 , considerando as parcelas e ruas entre as parcelas. Foi feita uma análise de solo da área, que apresentou os seguintes resultados: pH, 5,66; Al, $0,00 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$; Ca, $2,09 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$; Mg, $1,03 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$; P, $5,2 \text{ mg dm}^{-3}$; K, $68,06 \text{ mg dm}^{-3}$. Em função disso, a área foi adubada com P, na forma de Superfosfato Simples, 120 kg ha^{-1} , e K, na forma de KCl, 40 kg ha^{-1} , conforme o Manual de Adubação e Calagem do Estado do Rio de Janeiro (FREIRE et al., 2013). O tratamento que recebeu nitrogênio mineral foi adubado com uma dose de 80 kg N ha^{-1} , na forma de ureia, dividida em duas aplicações: 40 kg ha^{-1} na semeadura e 40 kg ha^{-1} 30 dias após a semeadura.

A área estava desocupada antes da implantação do experimento, e anterior a isso, foi cultivada com batata-doce, feijão-de-porco como adubação verde para a batata-doce, e, anteriormente, consórcio milheto/guandu. Foi realizada uma contagem de rizóbios em feijoeiro comum para *Rhizobium* e feijão caupi para *Bradyrhizobium*, e o resultado estimou 34 UFC g solo⁻¹ para o *Rhizobium* e 1,46 x 10³ UFC g solo⁻¹ para o *Bradyrhizobium*, baseado na avaliação do Número Mais Provável (WOOMER et al., 1988).

Cada bloco consistiu em 8 parcelas, cada uma medindo 4 x 5 m (20 m²) e contendo 8 linhas de plantio com espaçamento de 0,5 m. As duas linhas mais externas, bem como 1 m de cada ponta da linha foram deixado como bordadura. Foram semeadas 15 sementes m⁻¹ linear. Baseado na taxa de germinação do lote de semente utilizado, a quantidade de plantas esperadas foi de 13 plantas m⁻¹ linear, o que efetivamente correspondeu às contagens realizadas após a germinação e desenvolvimento das plantas.

O inoculante das três bactérias foi fornecido pela empresa Total Biotecnologia. A contagem do inoculante em meio YMA com vermelho-congo apresentou os seguintes resultados: 1,3 x 10⁹ UFC mL⁻¹ para a estirpe 29w; 4,5 x 10⁹ UFC mL⁻¹ para a estirpe CPAC 7; e 4,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹ para a estirpe CIAT 899. As sementes foram inoculadas de modo que fosse esperado uma dose de 1,2 x 10⁶ UFC semente⁻¹ de cada bactéria, conforme os tratamentos. Para a inoculação no sulco, foi utilizada a dose de 1,08 x 10⁸ UFC m linear⁻¹ de cada uma das bactérias conforme os tratamentos. As doses dos inoculantes foram diluídas em um volume de 200 L de calda ha⁻¹ aplicados com o auxílio de um pulverizador costal para cada bactéria. Após as inoculações das respectivas parcelas, as sementes foram cobertas por uma leve camada de solo.

Após a inoculação das sementes, uma parte foi separada para realizar a contagem microbiana associada à inoculação. A contagem foi realizada em meio YMA, com vermelho-congo, e com antibióticos previamente testados para isolar o *Rhizobium* (estreptomincina) ou o *Bradyrhizobium* (espectinomicina) (MARTÍNEZ-ROMERO et al. 1991; BODDEY e HUNGRIA, 1997). Os resultados da contagem seguem a Tabela 1. O procedimento foi feito conforme a Instrução Normativa SDA/MAPA 30 / 2010 (BRASIL, 2010).

Tabela 1: Contagem associada às sementes após a inoculação com as estirpes para o experimento de campo.

Fonte de inoculação	Antibiótico (µg mL ⁻¹)	Estirpe isolada	Contagem associada (UFC semente ⁻¹)
29w + CIAT 899	Estreptomincina (100)	CIAT 899	3,0 x 10 ⁵
	Espectinomicina (10)	29w	4,8 x 10 ⁶
CPAC 7 + CIAT 899	Estreptomincina (100)	CIAT 899	3,2 x 10 ⁵
	Espectinomicina (10)	CPAC 7	7,5 x 10 ⁵
CIAT 899	sem antibiótico	CIAT 899	2,2 x 10 ⁵

O experimento foi avaliado em duas etapas. A primeira avaliação foi realizada aos 48 dias após a semeadura. Foram avaliadas as seguintes variáveis: massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSNN). Para essas avaliações, 5 plantas foram coletadas em sequência, na segunda linha de plantio, deixando-se 1 m de bordadura na linha. Os valores de cada variável correspondem ao somatório das 5 plantas, e as repetições correspondem às parcelas dentro dos blocos.

A segunda coleta foi realizada aos 92 dias após semeadura, e teve o objetivo de avaliar a produtividade da cultura em resposta aos tratamentos de coinoculação. As seguintes variáveis foram avaliadas: produtividade (Prod), número de vagens por planta (vagem planta⁻¹), número de grãos por vagem (grãos vagem⁻¹) e peso seco de 100 grãos (P100). Foi definida

uma área útil de 6 m² para a coleta dos dados. Essa área correspondeu à parte mais interna de cada parcela: as duas linhas mais externas foram desconsideradas, assim como 1 m nas extremidades de cada linha. Todas as plantas da área útil foram coletadas e secas a sombra.

A produtividade foi calculada ajustando-se o grau de umidade das sementes para 13%. A aferição do teor de umidade foi feita conforme as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009). O número de vagens por planta corresponde à média de 30 plantas coletadas dentro da área útil, escolhidas aleatoriamente. O número de grãos por vagens corresponde à média de 20 vagens escolhidas aleatoriamente dentre as plantas coletadas. Para o peso seco de 100 grãos, foram escolhidos 100 grãos ao acaso, os quais foram secos em estufa de circulação de ar forçada a 105 °C, por 24 horas.

Os dados foram tabelados e submetidos à análise exploratória, análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey ($p < 10\%$) no ambiente R (R CORE TEAM 2017) e na plataforma RStudio (R TEAM STUDIO, 2017), com os pacotes *agricolae* (DeMENDIBURU, 2009) e *easyanova* (ARNHOLD, 2013). O quadro de ANOVA foi construído em três etapas: os graus de liberdade e a soma dos quadrados dos tratamentos, dos blocos e dos resíduos foram obtidos de uma primeira ANOVA, que considerou o experimento como um todo, dividido em blocos ao acaso. A segunda ANOVA avaliou apenas os fatores e a interação entre eles para fornecer os respectivos graus de liberdade e as somas dos quadrados. A terceira etapa consistiu na ANOVA dos tratamentos testemunhas para também fornecer o grau de liberdade e a soma dos quadrados. A ANOVA final consistiu na junção das etapas anteriores. Os quadrados médios foram obtidos pela divisão entre a soma dos quadrados e cada grau de liberdade e o valor F calculado pela divisão dos quadrados médios de cada fonte de variação e o quadrado médio dos resíduos.

3.7. Experimentos de Ocupação Nodular e Redução do Acetileno

Um experimento foi montado com garrafas de vidro de 350 mL, com o objetivo de avaliar o efeito da coinoculação *in vitro* no feijoeiro sobre a morfologia dos nódulos, a atividade da nitrogenase e a ocupação nodular.

O experimento foi delineado em blocos ao acaso, com 8 repetições. O primeiro fator foi dividido em 2 níveis (inoculação ou não com a estirpe controle CIAT 899) e o segundo em 3 níveis (presença de duas estirpes de *Bradyrhizobium* inoculadas separadamente e a ausência de coinoculação). Das 8 repetições, 3 destinaram-se para a análise da redução do acetileno, 2 para microscopia e 2 para isolamento e ocupação nodular, escolhidas ao acaso.

As garrafas receberam duas fitas de papel de germinação, com 20 cm x 2,0 cm, atadas ao gargalo, de modo a prover suporte para a planta e conduzir a solução nutritiva até as raízes. Foram utilizados 200 mL solução nutritiva (NORRIS e T'MANNETJE, 1964), colocados previamente à autoclavagem das garrafas. Cada garrafa recebeu uma semente pré-germinada e 1 mL de inóculo da bactéria correspondente ao tratamento, ajustado para a DO 1,0.

As plantas foram coletadas 4 semanas após a semeadura para as avaliações de ARA, microscopia e ocupação nodular, conforme descrito a seguir.

3.7.1. Análise de redução do acetileno

As plantas utilizadas para análise da redução do acetileno (ARA) (WEAVER e DANSO, 1994), foram cortadas na área do coleto, e as raízes foram acondicionadas em garrafas adaptadas com um septo de silicone para evitar trocas de gases. Dez por cento do volume da garrafa foram retirados com uma seringa e a mesma quantidade foi repostada com acetileno. Após 30 minutos, retirou-se o volume da seringa (60 mL) em gás da garrafa, e injetou-se em frascos de vidro selados e com vácuo. Desse estoque, 1 mL foi retirado e

injetado em cromatógrafo de chama para avaliação da redução do gás acetileno em etileno, com três replicatas por cada amostra.

3.7.2. Análise de microscopia óptica e avaliação da ocupação nodular

As plantas foram inoculadas com 1 mL de inóculo ajustado para 10^8 UFC mL⁻¹ das estirpes CIAT 899 de *R. tropici*, 29w de *B. elkanii* e USDA 110 de *B. diazoefficiens* e coinoculadas com as combinações 29w + CIAT 899 e USDA 110 + CIAT 899, nas mesmas doses. Após 4 semanas, os nódulos foram coletados, seccionados transversalmente e transferidos imediatamente para solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 50mM (pH 6,8), por 24 horas. Estes foram desidratados em série etanólica (15%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%), incluídos em resina acrílica LR White e emblocados em capsulas de gelatina. As análises ao microscópio óptico foram realizadas a partir de seções transversais semi-finas (0,7 – 1,0 µm) obtidas em ultramicrótomo, coradas em azul de toluidina e documentadas em câmera digital.

Nódulos também foram coletados para o isolamento das bactérias em meio de cultura seletivo YMA, com e sem antibióticos. Os antibióticos testados foram estreptomicina (100 µg mL⁻¹) e espectinomicina (10 µg mL⁻¹), previamente avaliados para a seleção de estirpes de *Bradyrhizobium*, que apresentam resistência natural (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; BODDEY e HUNGRIA, 1997). Os nódulos retirados das plantas foram desinfestados pelo mesmo processo de desinfestação das sementes do feijoeiro. Após a desinfestação, os nódulos foram espremidos em placas com YMA e deixados crescer em câmara de incubação a 30°C e avaliados entre 2 e 7 dias.

4. RESULTADOS

4.1. Primeiro Experimento de Seleção em Vasos com Solo Não Estéril

A análise de variância detectou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos para as variáveis massa seca da parte aérea (MSPA), acúmulo de nitrogênio da parte aérea (NPA) e número de nódulos (Tabela 2). As variáveis analisadas não diferiram significativamente entre as coinoculações e o controle com a estirpe CIAT 899 (Tabela 3). Para MSPA e conteúdo de N, ao menos, a coinoculação proporcionou ganhos, mesmo que pouco evidenciados pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). O crescimento médio da parte aérea das plantas nas coinoculações CIAT 899 + 29w e CIAT 899 + USDA 110 foi, respectivamente, 38% e 6% maior que o do controle CIAT 899, e o acúmulo de N foi 12% e 10% maior. Para essas variáveis, outro efeito positivo da coinoculação foi que esta proporcionou às plantas coinoculadas a diferença estatística para o controle sem inoculação, enquanto que, no controle com a CIAT 899 não houve essa diferença (Tabela 3). A dispersão dos dados através de um *boxplot* para MSPA (Figura 6) evidencia o maior acúmulo de biomassa da parte aérea proporcionado pela coinoculação CIAT 899 + 29w. Os *boxplots* das demais variáveis encontram-se no Anexo A.

Tabela 2: Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSNN), e nitrogênio total da parte aérea (NPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo não estéril

Fonte de variação	GL	MSPA	NPA
Tratamento	5	32,18**	28780,4**
Bloco	5	1,25	2239,5
Resíduo	25	4,10	2479,067
CV %	-	28,20	29,15

Fonte de variação	GL	MSR	NN	MSNN
Tratamento	5	0,487	364492,8**	0,0195
Bloco	3	0,258	93105	0,0263
Resíduo	15	0,213	62211,27	0,0272
CV %	-	28,26	34,71	35,34

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Os tratamentos inoculados apenas com as estirpes de *Bradyrhizobium* apresentaram acúmulo de biomassa da parte aérea, nodulação e acúmulo de N inferiores aos coinoculados e ao controle com a estirpe eficiente. Para a maioria dos casos, os resultados foram semelhantes ao controle sem inoculação e, foi até menor no caso da inoculação com a estirpe USDA 110 e

o controle sem inoculação. Isso mostra que as estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas não formam associações eficientes com o feijoeiro.

Tabela 3: massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSNN), e nitrogênio total da parte aérea (NPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta

	MSPA	MSR	NN	MSNN	NPA
	-g vaso ⁻¹ --	-g vaso ⁻¹ -	-vaso ⁻¹ -	-g vaso ⁻¹ -	-mg vaso ⁻¹ -
29w + CIAT 899	10,59 a	1,66 bc	793 ab	0,485	233,01 a
USDA 110 + CIAT 899	8,12 ab	1,57 bc	1243 a	0,420	227,81 a
29w	5,63 cd	2,27 a	445 bc	0,497	137,82 c
USDA 110	4,42 d	1,22 c	308 c	0,364	67,77 c
CIAT 899	7,66 abc	1,50 bc	1036 a	0,468	207,38 ab
TA	6,68 bc	1,64 ab	685 abc	0,569	151,05 bc

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

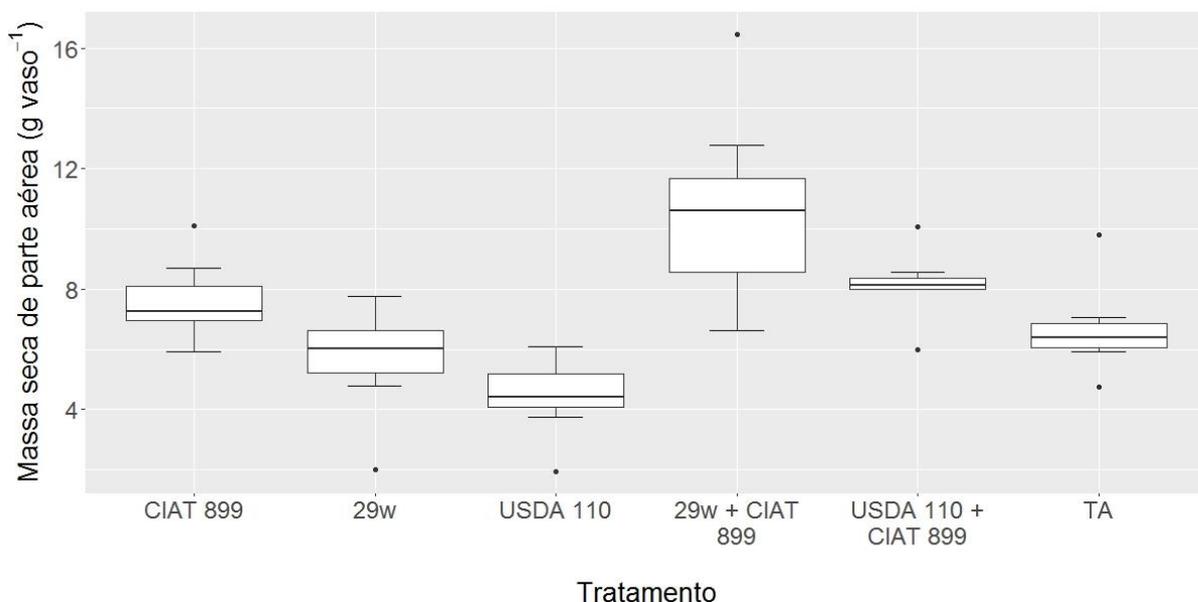


Figura 1: Gráfico de *boxplot* para massa seca de parte aérea (MSPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta.

4.2. Segundo Experimento de Seleção em Vasos com Solo Não Estéril

Os dados de massa seca de parte aérea (MSPA) foram analisados com o teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) por não apresentarem distribuição normal. Os dados de massa seca de raízes (MSR) atenderam aos pressupostos da análise de variância e, portanto, foram por ela analisados (Tabela 4).

A coinoculação de *R. tropici* estirpe CIAT 899 com as estirpes de *Bradyrhizobium* não promoveu diferença significativa quanto à massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) em relação à testemunha inoculada apenas com a estirpe referência CIAT 899 ($p \leq 0,05$) (Tabela 5). Houve, porém, diferença significativa entre os tratamentos coinoculados e os inoculados apenas com *Bradyrhizobium* e o controle sem inoculação pelo teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) para MSPA. É destaque de nota que houve uma grande variabilidade de respostas dentro dos tratamentos coinoculados (Figura 7). Embora algumas repetições de um mesmo tratamento tenham crescido mais, outras parecem não ter respondido à coinoculação. O *boxplot* para a massa seca de raízes e a tabela de comparação pelo teste de Kruskal-Conover encontram-se no Anexo B.

Numericamente, os tratamentos de inoculação com os maiores valores de MSPA foram o 29w + CIAT 899 e o CPAC 7 + CIAT 899. Assim, estes foram selecionados para serem avaliados em condições axênicas.

Tabela 4: Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes. Cultivo de duas plantas por vaso

Fonte de variação	GL	MSR
Tratamento	16	0,962
<i>Bradyrhizobium</i>	7	0,285
<i>Rhizobium</i>	1	9,180**
<i>Bradyrhizobium</i> x <i>Rhizobium</i>	7	0,281
Testemunha x fatorial	1	2,247*
Bloco	4	1,494*
Resíduo	64	0,288
CV %	-	20,12

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 5: Valores médios de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes. Cultivo de duas plantas por vaso

Massa Seca de Parte Aérea (g vaso⁻¹)			
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>		Média
	- CIAT 899	+ CIAT 899	
29w	4,49 *	12,10	8,29
USDA 110	4,50 *	11,37	7,94
CPAC 7	5,27 *	11,99	8,63
BR 5609	4,28 *	10,97	7,63
BR 6204	5,38 *	11,33	8,35
BR 10303	5,31 *	11,55	8,43
INPA 14B	4,75 *	9,76	7,17
-----	4,24 *	11,95	8,09
Média	4,75	11,38	
Massa Seca de Raiz (g vaso⁻¹)			
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>		Média
	- CIAT 899	+ CIAT 899	
29w	2,28	3,46	2,87
USDA 110	2,56	3,01	2,79
CPAC 7	2,21	3,29	2,75
BR 5609	2,60	3,02	2,81
BR 6204	2,06	2,89	2,48
BR 10303	2,52	3,26	2,89
INPA 14B	2,61	2,86	2,73
-----	2,20	2,69	2,45
Média	2,38 B	3,06 A	

Médias seguidas de asterisco diferem do tratamento CIAT 899 a 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Conover. Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na coluna, e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

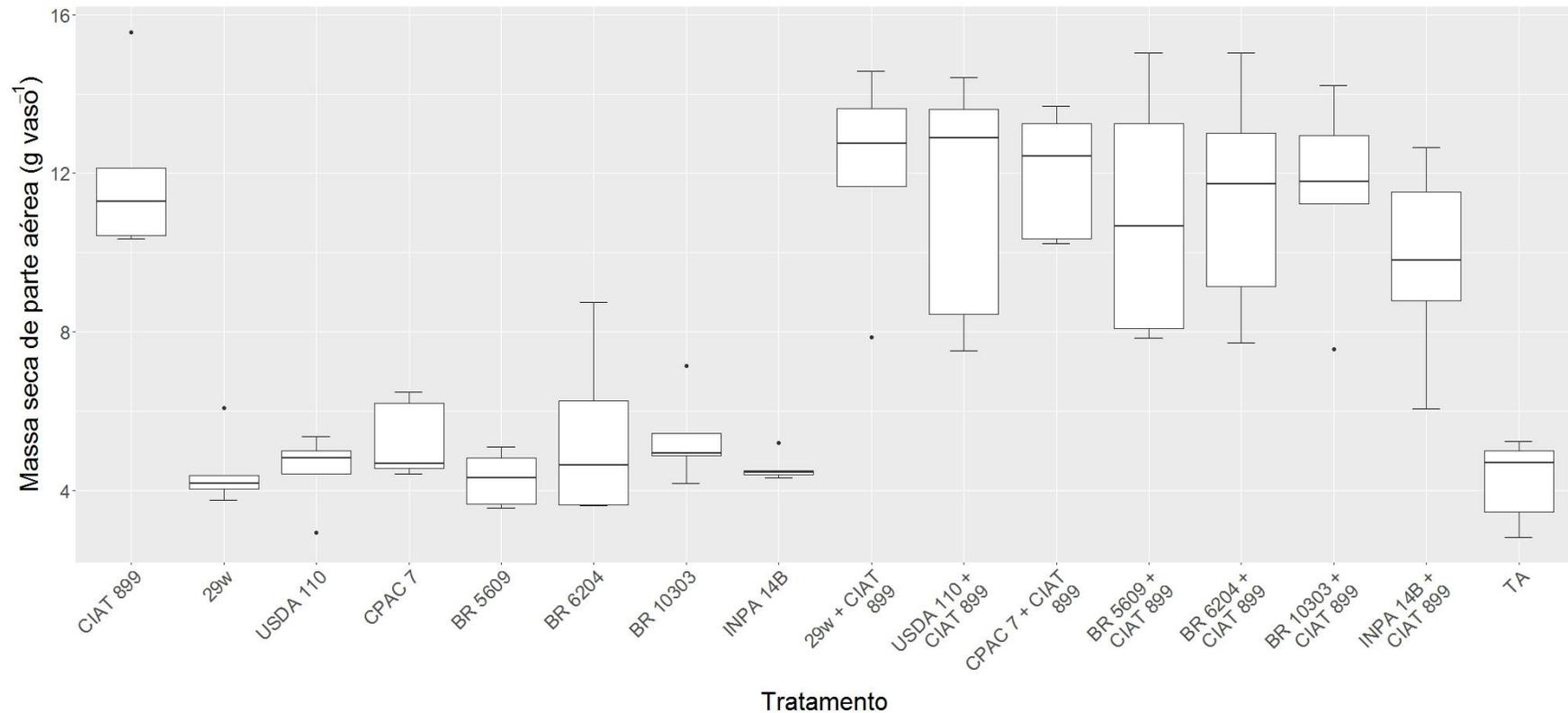


Figura 2: Gráfico de *boxplot* para massa seca de parte aérea (MSPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes para coinoculação; TA = testemunha absoluta.

4.3. Experimento de Coinoculação em Vasos de Leonard com as Estirpes Seleccionadas

As estirpes de *Bradyrhizobium* avaliadas nos experimentos anteriores (29w, USDA 110 e CPAC 7) foram testadas em vasos de Leonard para avaliar o efeito da coinoculação *Rhizobium-Bradyrhizobium* em condições axênicas, sem a influência de rizóbios nativos do solo.

Os dados de massa seca de parte aérea total (MSPAT), de folhas (MSPAF) e de caule (MSPAC) não apresentaram distribuição normal e, portanto, foram analisados com o teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$). Os dados de massa seca de raízes (MSR) e nodulação atenderam aos pressupostos da análise de variância e, portanto, foram por ela analisados (Tabela 6).

As plantas coinoculadas com as estirpes CPAC 7 + CIAT 899 acumularam 59% de massa seca de parte aérea total (MSPAtotal) a mais do que aquelas inoculadas somente com a CIAT 899 (Tabela 7). Também foi observado maior acúmulo médio de folhas na coinoculação CPAC 7 + CIAT 899. O incremento em MSPAtotal com as outras coinoculações foi, respectivamente, de 63% e 48% com as estirpes USDA 110 + CIAT 899 e 29w + CIAT 899, porém o teste de comparação com controle não revelou melhor desempenho que o controle com a CIAT 899. Resultado similar foi observado para massa seca de caule e folhas. Embora, em média, a coinoculação USDA 110 + CIAT 899 tenha proporcionado maior MSPA, análise não a diferenciou do controle inoculado com a CIAT 899 devido à alta variabilidade observada dentro desse tratamento (Figura 6). Os gráficos de *boxplot* para as demais variáveis e as tabelas de comparação múltiplas do teste de Kruskal-Conover podem ser encontrados no Anexo C.

A análise da massa seca de raízes (MSR), também mostrou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 7). Novamente, a coinoculação CPAC 7 + CIAT 899 foi responsável pelo maior acúmulo de raízes dentre os tratamentos coinoculados. As plantas desse tratamento atingiram 45% a mais de MSR que aquelas inoculadas apenas com a estirpe referência. O controle nitrogenado (TN) acumulou mais MSR que os outros tratamentos. As coinoculações não diferiram do controle nitrogenado nem do controle com a estirpe CIAT 899 ($p \leq 0,05$).

Em relação à nodulação, os nódulos foram separados por tamanho após a catação e peneiramento. Isso gerou, além do número de nódulos totais (NNT) e da massa seca total de nódulos (MSNNT), duas classes de nódulos, uma maior que 2,00 mm, e seus respectivos número (NN>2 mm) e massa seca (MSNN>2 mm); e a contraparte de nódulos menores que 2,00 mm, também com número (NN<2 mm) e massa seca (MSNN<2 mm).

Para o total de nódulos, não foi observada diferença significativa para as duas variáveis analisadas, número e massa de nódulos ($p \leq 0,05$). A coinoculação CPAC 7 + CIAT 899 proporcionou, em média, um número de nódulos 50% superior àquele proporcionado pela CIAT 899 ($p \leq 0,05$) (Tabela 8). Em relação à MSNNT, os tratamentos 29w + CIAT 899 e CPAC 7 + CIAT 899 proporcionaram maior massa de nódulos que o controle com a estirpe eficiente, com aumentos de 71 a 80%, respectivamente, na massa seca dos nódulos. As variáveis não apresentaram diferenças significativas provavelmente em função da grande variação dos dados (Anexos C3 e C4).

As frações separadas dos nódulos também não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos (Tabelas 9 e 10), possivelmente em função da variação dos dados (Anexos C6 a C9).

Tabela 6: Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de raiz (MSR), número total de nódulos (NNT), massa seca total de nódulos (MSNNT), número de nódulos maiores que 2,00 mm (NN>2), massa seca total de nódulos maiores que 2,00 mm (MSNN>2), número de nódulos menores que 2,00 mm (NN<2) e massa seca total de nódulos menores que 2,00 mm (MSNN<2) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta

Fonte de variação	GL	MSR	GL	NNT	MSNNT
Tratamento	5	0,3801**	3	226090,7	0,1076
Bloco	3	0,0876	3	159848,7	0,1172
Resíduo	15	0,0412	9	167802,2	0,0573
CV %	-	20,62	-	31,77	33,48

Fonte de variação	GL	NN>2	MSNN>2	NN<2	MSNN<2
Tratamento	3	32131,33	0,0497	103542,3	0,0160
Bloco	3	49910,33	0,0708	36930	0,0095
Resíduo	9	20798	0,0266	98025,4	0,0105
CV %	-	36,90	39,29	34,84	34,17

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 7: massa seca de parte aérea total (MSPAT), massa seca de folhas (MSPAF), massa seca de caule (MSPAC), e massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Foram cultivadas duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta

	MSPAT	MSPAF	MSPAC	MSR
	---g vaso ⁻¹ ---			
29w + CIAT 899	5,78	4,09	1,70	1,07 ab
USDA 110 + CIAT 899	6,35	4,60	1,74	1,20 ab
CPAC 7 + CIAT 899	6,19 *	4,43 *	1,76	1,24 ab
CIAT 899	3,89	2,85	1,04	0,86 bc
TN	4,22	3,04	1,18	1,48 a
TA	0,69 *	0,43 *	0,26 *	0,54 c

Médias seguidas de asterisco diferem do tratamento CIAT 899 a 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Conover. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 8: número total de nódulos (NNT) e massa seca total de nódulos (MSNNT) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso

	NNT ---vaso ⁻¹ ---	MSNNT ---g vaso ⁻¹ ---
29w + CIAT 899	1244	0,72
USDA 110 + CIAT 899	1487	0,89
CPAC 7 + CIAT 899	1455	0,76
CIAT 899	972	0,49

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 9: número de nódulos maiores que 2,00 mm (NN>2) e massa seca total de nódulos maiores que 2,00 mm (MSNN>2) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso

	NN>2 mm -----vaso ⁻¹ -----	MSNN>2 mm -----g vaso ⁻¹ -----
29w + CIAT 899	381	0,41 ab
USDA 110 + CIAT 899	502	0,56
CPAC 7 + CIAT 899	399	0,41
CIAT 899	283	0,29

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 10: número de nódulos menores que 2,00 mm (NN<2) e massa seca total de nódulos menores que 2,00 mm (MSNN<2) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard, Cultivo de duas plantas por vaso

	NN<2 mm -----vaso ⁻¹ -----	MSNN<2 mm -----g vaso ⁻¹ -----
29w + CIAT 899	864	0,31
USDA 110 + CIAT 899	986	0,33
CPAC 7 + CIAT 899	1056	0,35
CIAT 899	689	0,21

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

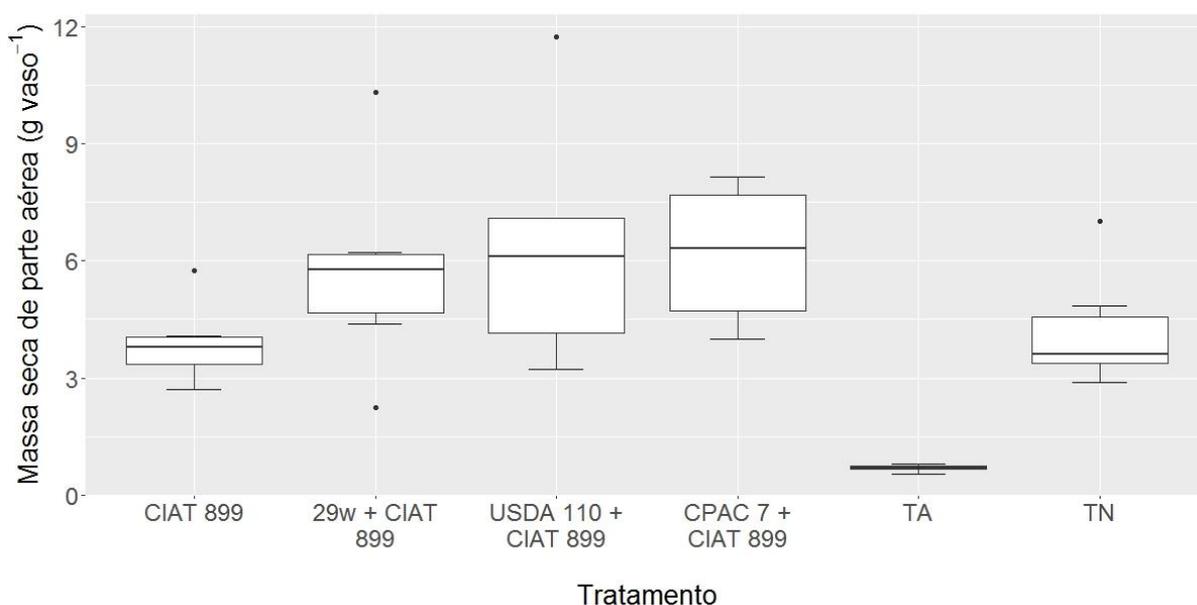


Figura 3: Gráfico de *boxplot* para massa seca de parte aérea total (MSPAT) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta.

4.4. Experimento de Coinoculação em Campo

Não houve diferença significativa entre os tratamentos com respeito ao acúmulo de matéria seca de parte aérea, exceto pelo controle nitrogenado e pelo tratamento de coinoculação de 29w + CIAT 899 no sulco (Tabela 11). O primeiro acumulou significativamente mais MSPA do que o segundo, porém não se diferenciou significativamente dos demais tratamentos (Tabela 13). No que diz respeito à nodulação, o tratamento CPAC 7 + CIAT 899 na semente se destacou com o maior número de nódulos, enquanto o menor número foi observado no controle nitrogenado. As diferenças no número de nódulos não se expressaram em diferença na massa de nódulos, visto que não se observou diferença significativa entre eles para essa variável. Não houve diferença significativa na massa seca de raízes. O gráfico de *boxplot* da massa seca de parte aérea encontra-se na Figura 9, e os das demais variáveis, no Anexo D.

Na segunda coleta, avaliou-se a produção de grãos e vagens em função das combinações das estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Observa-se que a interação foi significativa ao nível de 10% de probabilidade. Portanto, as análises seguintes se basearam nesse nível de significância (Tabela 12).

Observa-se que para o método de inoculação na semente, a coinoculação CPAC 7 + CIAT 899 proporcionou incremento significativo na produtividade do feijoeiro (Tabela 14). Esse incremento correspondeu a uma produtividade de grãos 20% maior do que aquela proporcionada pela inoculação da CIAT 899 na semente. A produtividade desse tratamento foi estatisticamente similar a do controle nitrogenado conforme indicado pela análise de todos os tratamentos em conjunto. A produtividade proporcionada pela coinoculação 29w + CIAT 899 na semente não diferiu da produtividade do controle nitrogenado, porém também não diferiu da CIAT 899 inoculada na semente. Nesse caso, a produtividade proporcionada pela coinoculação foi 12% superior a daquele tratamento.

Tabela 11: Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), número de nódulos (NN), e massa seca de nódulos (MSNN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante

Fonte de variação	GL	MSPA	MSR	NN	MSNN
Tratamento	7	148	0,529	87641,0	150,13
Inoculação	2	30,3	0,434	53394,5	23,59
Aplicação	1	69	0,001	10045,0	0,05
Inoculação x aplicação	2	0,35	0,263	108456,5*	153,32
Testemunha	1	647,5***	0,931	39340,0	378,02*
Testemunha x fatorial	1	260,9*	1,376	240400,0**	319,01*
Bloco	3	254**	0,597	519,3	32,82
Resíduo	21	68	0,647	39124,0	101,29
CV %	-	27,70	25,65	51,40	63,24

*** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; ** Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; * Significativo a 10% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 12: Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de produtividade (Prod), número de vagens por planta (Vagens/planta), número de grãos por vagem (grãos/vagem), e peso de 100 grãos (P100) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante

Fonte de variação	GL	Prod	Vagens/ planta	Grãos/ vagem	P100
Tratamento	7	587792	1,2364	0,120	1,627
Inoculação	2	62011,5	0,2130	0,262	2,240
Aplicação	1	168468	2,6670*	0,070	0,050
Inoculação x aplicação	2	288666*	0,2305	0,102	1,305
Testemunha	1	2886476***	4,5000**	0,001	1,767
Testemunha x fatorial	1	358244*	0,6010	0,042	2,483
Bloco	3	249123	0,9137	0,022	1,603
Resíduo	21	100966	0,7752	0,162	2,398
CV %	-	10,96	10,72	6,53	6,26

*** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; ** Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; * Significativo a 10% de probabilidade pelo teste F.

Não se observou diferenças entre os tratamentos coinoculados e o tratamento de inoculação com a CIAT 899 quando a inoculação foi realizada no sulco. Numa visão global, o melhor tratamento, que se destacou, foi o de coinoculação CPAC 7 + CIAT 899, com uma produtividade superior 8,4% à da CIAT 899 inoculada no sulco.

No que diz respeito à variável número de vagens, observou-se diferenças significativas para a forma de aplicação do inoculante, mas não para o tipo de inoculação e para a interação entre esses dois fatores. O número de vagens por planta foi significativamente maior quando as bactérias foram inoculadas na semente ($p \leq 0,10$).

Não foram encontradas diferenças significativas para o número de grãos por vagem e o peso de 100 grãos. O gráfico de *boxplot* produtividade encontra-se na Figura 10, e os das demais variáveis, podem ser visto no Anexo E. As comparações de médias dos tratamentos com os controles nitrogenado e sem inoculação podem ser observadas nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 13: Valores médios de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSNN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. Dados correspondem à soma de 5 plantas coletadas em sequência na parcela

Massa Seca de Parte Aérea (g)			
Inoculação	Forma de aplicação		Média
	Semente	Sulco	
CPAC 7 + CIAT 899	37,45	34,40	35,93
29w + CIAT 899	34,01	30,16	32,09
CIAT 899	36,17	32,90	34,53
Média	35,88	32,48	

Massa Seca de Raiz (g)			
Inoculação	Forma de aplicação		Média
	Semente	Sulco	
CPAC 7 + CIAT 899	3,44	3,45	3,44
29w + CIAT 899	2,96	3,30	3,13
CIAT 899	3,78	3,39	3,59
Média	3,39	3,38	

Número de nódulos			
Inoculação	Forma de aplicação		Média
	Semente	Sulco	
CPAC 7 + CIAT 899	549	262	406
29w + CIAT 899	263	253	258
CIAT 899	305	480	393
Média	373	331	

Massa seca de nódulos (g)			
Inoculação	Forma de aplicação		Média
	Semente	Sulco	
CPAC 7 + CIAT 899	0,641	0,347	0,494
29w + CIAT 899	0,558	0,559	0,573
CIAT 899	0,470	0,726	0,598
Média	0,557	0,554	

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,1$).

Tabela 14: Valores médios de produtividade (Prod), número de vagens por planta (Vagens/planta), número de grãos por vagem (Grãos/vagem) e peso de 100 grãos (P100) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante

Produtividade (kg ha⁻¹)			
Inoculação	Forma de aplicação		Média
	Semente	Sulco	
CPAC 7 + CIAT 899	3037,7 aA	2610,7 B	2824,3
29w + CIAT 899	2848,8 ab	2504,5	2676,7
CIAT 899	2533,2 b	2801,7	2667,4
Média	2806,6	2639,0	

Número de vagens por planta			
Inoculação	Forma de aplicação		Média
	Semente	Sulco	
CPAC 7 + CIAT 899	6,8	5,8	6,3
29w + CIAT 899	6,4	5,8	6,1
CIAT 899	6,6	6,2	6,4
Média	6,6 A	5,9 B	

Número de grãos por vagem			
Inoculação	Forma de aplicação		Média
	Semente	Sulco	
CPAC 7 + CIAT 899	5,5	5,7	5,6
29w + CIAT 899	5,6	5,5	5,6
CIAT 899	5,1	5,4	5,3
Média	5,4	5,5	

Peso de 100 grãos (g)			
Inoculação	Forma de aplicação		Média
	Semente	Sulco	
CPAC 7 + CIAT 899	24,57	24,35	24,46
29w + CIAT 899	25,53	24,71	25,12
CIAT 899	25,12	25,89	25,51
Média	25,01	24,98	

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na coluna, e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,1$).

Tabela 15: massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSNN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. Dados correspondem à soma de 5 plantas coletadas em sequência na parcela. TN = testemunha nitrogenada. TA = testemunha absoluta

Tratamento	Aplicação	MSPA	MSR	NN	MSNN
		---(g)---	---(g)---	-----	---(g)---
CPAC 7 + CIAT 899	Semente	37,45 ab	3,44	549 a	0,641
CPAC 7 + CIAT 899	Sulco	34,40 ab	3,45	262 ab	0,347
29w + CIAT 899	Semente	34,01 ab	2,96	263 ab	0,558
29w + CIAT 899	Sulco	30,16 b	3,30	253 ab	0,559
CIAT 899	Semente	36,17 ab	3,78	305 ab	0,470
CIAT 899	Sulco	32,90 ab	3,39	480 a	0,726
TN	-----	49,77 a	4,21	82 b	0,107
TA	-----	31,78 b	3,53	222 ab	0,542

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,1$).

Tabela 16: produtividade (Prod), número de vagens por planta (Vagens/planta), número de grãos por vagem (Grãos/vagem) e peso de 100 grãos (P100) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. TN = testemunha nitrogenada. TA = testemunha absoluta

Tratamento	Aplicação	Prod	Vagens/ planta	Grãos/ vagem	P100
		-(kg ha ⁻¹)-	-----	-----	---(g)---
CPAC 7 + CIAT 899	Semente	3.037,7 ab	6,8	5,5	24,57
CPAC 7 + CIAT 899	Sulco	2610,7 b	5,8	5,7	24,35
29w + CIAT 899	Semente	2848,8 b	6,4	5,6	25,53
29w + CIAT 899	Sulco	2504,5 b	5,8	5,5	24,71
CIAT 899	Semente	2533,2 b	6,6	5,1	25,12
CIAT 899	Sulco	2801,7 b	6,2	5,4	25,89
TN	-----	3567,8 a	7,3	5,4	26,14
TA	-----	2366,5 b	5,8	5,4	25,20

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,1$).

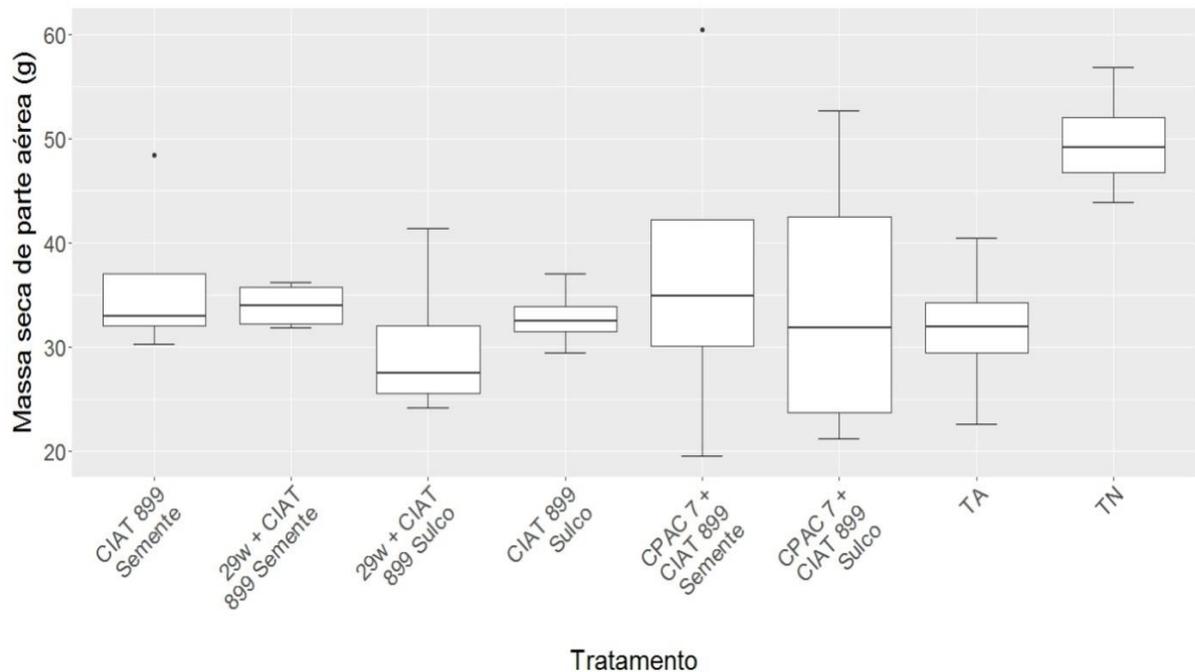


Figura 4: Gráfico de *boxplot* para massa seca de parte aérea (MSPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante.

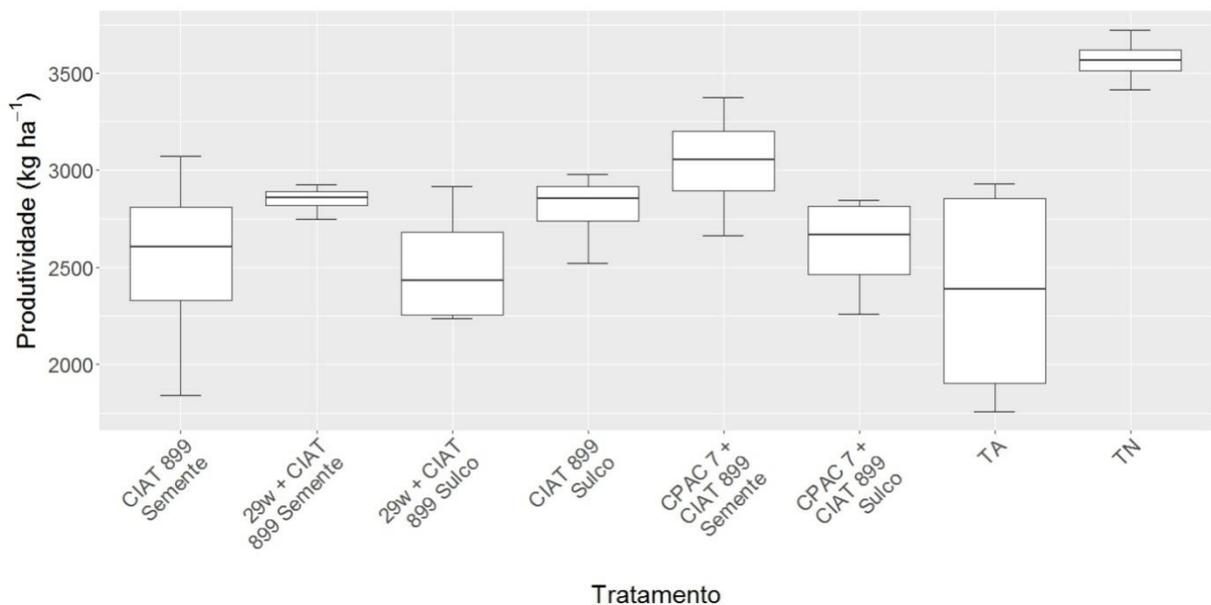


Figura 5: Gráfico de *boxplot* para produtividade (Prod) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante.

4.5. Experimento de Ocupação Nodular e Redução do Acetileno

O feijoeiro nodulado por *R. tropici* apresentou nódulos grandes, esféricos e efetivos, com coloração característica da presença de leghemoglobina (Figura 11a, b). As seções transversais dos nódulos apresentavam estrutura típica com lenticelas no sistema dérmico, parênquima e feixes vasculares anastomosados e zona de infecção contendo células hipertróficas ricas em bacteroides e poucas células intersticiais (Figura 12a, b). As seções transversais dos nódulos coinoculados mostram uma estrutura interna semelhante aos nódulos induzidos pela estirpe CIAT 899 (Figuras 13a, b).

O feijoeiro nodulado por *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) apresentou nódulos pequenos, disformes e com coloração clara no interior, sem evidência visual de leghemoglobina (Figura 14a, b). Os nódulos induzidos pela estirpe 29w apresentaram colonização bacteriana intercelular claramente associada à indução de eventos mitóticos em células vegetais (Figura 15a, b). Não obstante, eventos de endocitose, colonização intracelular e formação de bacteróides foram raros ou nulos. O *Bradyrhizobium* foi capaz de induzir a nodulação e infectar os nódulos no feijoeiro, porém, levando ao estabelecimento de uma associação ineficiente. Não foi observado colonização nodular pela estirpe USDA 110.



Figura 6: (a) Nódulos de feijoeiro comum induzido por *R. tropici* CIAT 899. (b) Corte transversal do nódulo induzido por *R. tropici* CIAT 899.

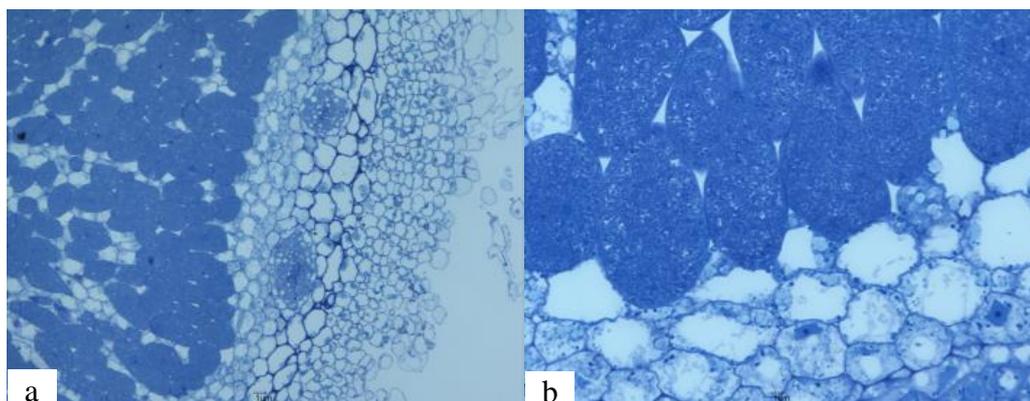


Figura 7: Seção transversal de nódulo de feijoeiro comum induzido por *R. tropici* CIAT 899 com endocitose típica (estrela). (a) aumento em 100x; (b) aumento em 200x.

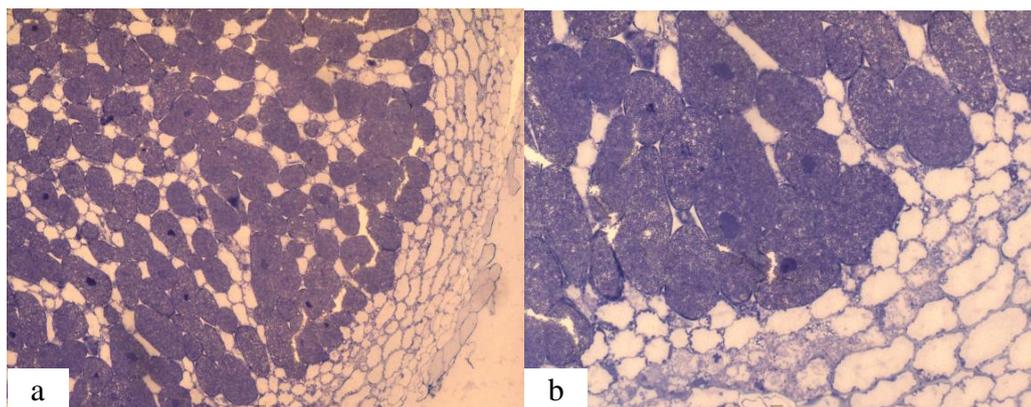


Figura 8: Seções transversais de nódulos de feijoeiro comum coinoculados: (a) *B. diazoefficiens* CPAC 7 + *R. tropici* CIAT 899, aumento de 100x. (b) *B. diazoefficiens* USDA 110 + *R. tropici* CIAT 899, aumento de 200x.

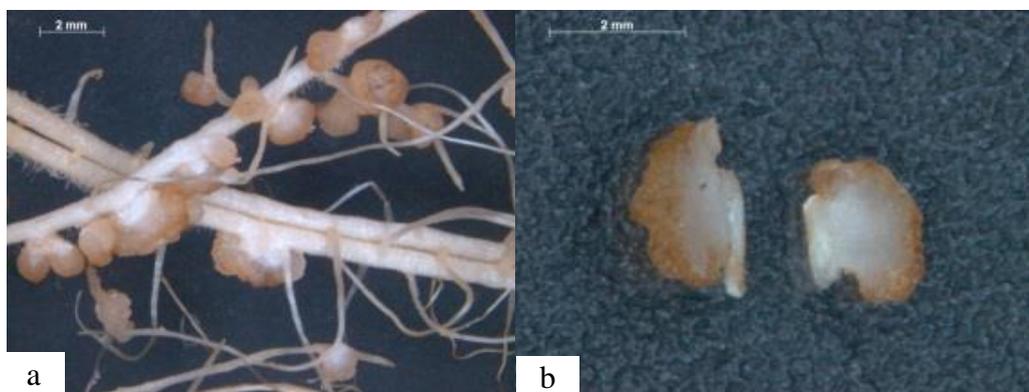


Figura 9: (a) Nódulos de feijoeiro comum induzido por *B. elkanii* 29w. (b) Corte transversal do nódulo induzido por *B. elkanii* 29w.

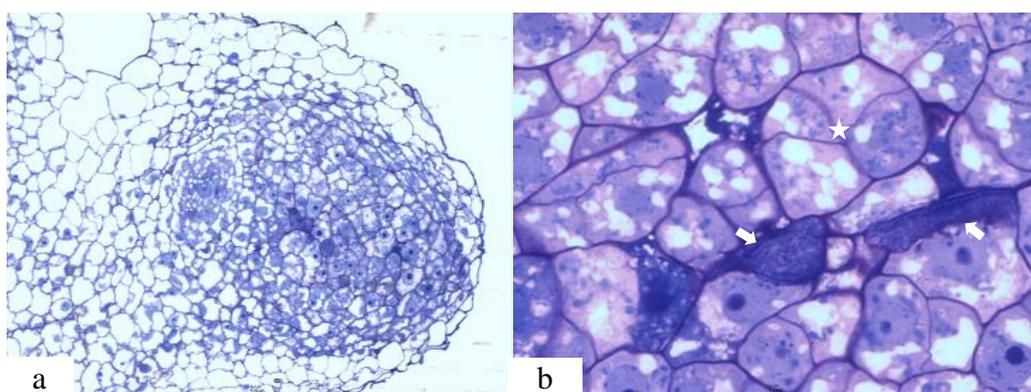


Figura 10: Seção transversal de nódulo de feijoeiro comum induzido por *B. elkanii* 29w. (a) aumento em 200x de zona de divisão celular; (b) aumento em 1000x, presença de bactérias nos espaços intercelulares (setas) e células em mitose (estrela).

O isolamento de bactérias a partir dos nódulos induzidos por *Bradyrhizobium* foi capaz de recuperar a estirpe 29w de *B. elkanii* em 87,5% dos nódulos avaliados. Para a estirpe USDA 110 de *B. diazoefficiens* foram recuperados 50% dos nódulos. Nos nódulos coinoculados, apenas a estirpe 29w foi recuperada em um de doze nódulos (8,3%). A estirpe USDA 110 não foi recuperada em nódulos coinoculados. A estirpe CIAT 899 foi recuperada em todos os nódulos coinoculados e em 60% dos nódulos inoculados com ela sozinha.

A análise de redução de acetileno (ARA) mostrou que os *Bradyrhizobium* inoculados sozinhos não reduziram o acetileno nas condições utilizadas, indicando ausência de atividade da nitrogenase. Os nódulos das plantas inoculadas com a estirpe CIAT 899 e das plantas coinoculadas apresentaram resultados positivos para ARA, mostrando que os nódulos estavam ativos.

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram um efeito positivo e mensurável da coinoculação *Rhizobium-Bradyrhizobium* sobre o crescimento e a produtividade do feijoeiro em condições axênicas e em condições não estéreis. A coinoculação, em especial com a estirpe CPAC 7 de *B. diazoefficiens*, resultou em um maior crescimento e nodulação das plantas de feijoeiro em vasos de Leonard quando comparada à inoculação apenas com a estirpe recomendada CIAT 899. A resposta de crescimento se mostrou similar quando a biomassa de parte aérea foi dividida em caule e folhas e a nodulação foi beneficiada de modo que as plantas coinoculadas produziram maior número e maior massa de nódulos que aquelas inoculadas com a CIAT 899 somente. As outras coinoculações (CIAT 899 + 29w e CIAT 899 + USDA 110) também estimularam o acúmulo de biomassa das plantas, porém, com efeitos menos evidentes. O efeito positivo da coinoculação em vasos de Leonard também foi verificado por Bastos (2016). Este autor verificou que o *Bradyrhizobium* estimulava a nodulação, o crescimento da parte aérea e o acúmulo de nitrogênio quando coinoculado na mesma dose que a estirpe eficiente de *R. tropici*.

Em condições não estéreis, também foi possível observar um efeito positivo da coinoculação de rizóbios, porém, em menor magnitude, provavelmente em função da competição das estirpes inoculadas com as estirpes nativas do solo (BRINKMAN et al., 2010; GANO-COHEN et al., 2016). Os resultados positivos foram observados em casa de vegetação para crescimento e acúmulo de N (29w + CIAT 899), em um dos dois experimentos realizados, e em condições de campo no aumento de produtividade (CPAC 7 + CIAT 899).

Em campo, a coinoculação diretamente na semente se sobressaiu à aplicação do inoculante no sulco. É possível que a dose aplicada no sulco de plantio (que correspondeu à dose aplicada na semente, mais a inoculação direta no sulco) tenha sido muito alta, em especial de *Bradyrhizobium*, o que, provavelmente, levou a uma alta competição por nichos na rizosfera, reduzindo o efeito positivo da estirpe eficiente. A dosagem de bactérias na semente é crítica para a resposta da planta à inoculação e pode mesmo ter efeitos negativos, como evidenciado por HUNGRIA et al. (2017). Nesse caso, os autores trabalharam com a inoculação tradicional de *Bradyrhizobium* na soja, mas é possível que o mesmo efeito se aplique à coinoculação aqui discutida. A dosagem também foi crítica para determinar o efeito da coinoculação do feijoeiro com *Rhizobium* e *Azospirillum* (BURDMAN et al., 1997). Esses autores verificaram que o crescimento do feijoeiro foi reduzido quando o *Azospirillum* foi aplicado na dose de 10^8 UFC mL⁻¹ e positivo quando aplicado na dose de 5×10^6 UFC mL⁻¹. No caso da coinoculação *Rhizobium-Bradyrhizobium* já se mostrou que a resposta da planta é dependente da dose aplicada (BASTOS, 2016). Porém, esses resultados foram relatados para condições estéreis e carecem de validação para condições de solo não estéril e de campo. A relação entre a dose e a comunidade nativa pode ser um dos fatores pelos quais a resposta à coinoculação não tenha sido consistente entre os experimentos no solo não estéril.

A literatura mostra que o *Bradyrhizobium* é capaz de induzir a formação de nódulos no feijoeiro, mas esses nódulos são considerados vazios e não apresentam atividade da nitrogenase, ou seja, não contribuem para o crescimento da planta fixando nitrogênio (MICHIELS et al., 1998). Isso indica que os passos iniciais da comunicação rizóbio-planta estão ocorrendo, mas por conta de fatores ainda desconhecidos, o processo de estabelecimento da bactéria dentro do nódulo não ocorre.

A coinoculação entre os rizóbios levanta questões de competição entre as duas estirpes inoculadas, uma vez que as duas são capazes de induzir a nodulação e, em teoria, disputam o mesmo nicho na rizosfera das plantas. À possibilidade de competição pode ser atribuído o reduzido crescimento das plantas inoculadas somente com *Bradyrhizobium* no primeiro experimento de solo, por um efeito da alta dose de bactérias, que foi capaz de superar os

efeitos dos rizóbios nativos do solo. No experimento em campo também pôde ser observado um efeito que pode ser atribuído à dose de inoculação. A combinação CPAC 7 + CIAT 899 inoculada na semente produziu 16% mais que a mesma combinação inoculada na semente e no sulco de plantio. Apesar das doses das duas estirpes terem sido as mesmas, é possível que a dose do *Bradyrhizobium* tenha sido alta o suficiente para reduzir o efeito sinérgico da coinoculação.

O experimento de campo realizado neste trabalho mostrou que é possível alcançar elevada produtividade apenas com a inoculação de rizóbios no feijoeiro. A combinação CPAC 7 + CIAT 899 inoculada na semente alcançou uma produtividade três vezes maior que a produtividade média nacional (CONAB, 2017). Outros autores também encontraram produtividades de feijoeiro inoculado na faixa entre 2000 e 3000 kg ha⁻¹ (MOSTASSO et al., 2002; HUNGRIA et al., 2003; PELEGRIN et al., 2009; BRITO et al., 2015). Esses dados sugerem que a FBN no feijoeiro efetivamente contribui para o bom desempenho da cultura e ajudam a desmistificar que a simbiose rizóbio-feijoeiro é não é eficiente em fixar o nitrogênio atmosférico.

A partir dos experimentos realizados, foi constatado que apenas parte dos nódulos formados por *Bradyrhizobium* no feijoeiro apresentaram isolados das bactérias inoculadas sob condições controladas. Esse resultado variou conforme a estirpe analisada. Considerou-se, então, a hipótese de que havia a comunicação química entre a bactéria e a planta, com a consequente indução à formação do nódulo, mas não havia o desenvolvimento da bactéria dentro do tecido nodular. Essa hipótese foi parcialmente respondida através de técnicas de microscopia e isolamento. Entretanto, ainda não se sabe qual o mecanismo por trás da sinalização entre o *Bradyrhizobium* e o feijoeiro, e porque os nódulos não se desenvolvem, mas que, mesmo assim, por um efeito sinérgico na coinoculação, é capaz de aumentar a nodulação e crescimento da planta.

A nodulação das leguminosas é o resultado de uma interação complexa entre a planta hospedeira e o rizóbio, e requer uma sinalização recíproca de moléculas, primeiramente da planta para a bactéria através de flavonóides e isoflavonóides, presentes nos exudatos das raízes e, depois, da bactéria para a planta através dos lipoquitoligossacarídeos (LCO) produzidos após a ativação dos genes de nodulação, e que levam ao desenvolvimento do nódulo (BROUGHTON et al., 2000; SOULEMANOV et al., 2002; SORIA-DÍAZ et al., 2003). A formação do nódulo requer a reprogramação de células diferenciadas de raiz para formar um primórdio, do qual este se desenvolve. Além disso, a bactéria deve infectar a raiz antes que o nódulo efetivo possa ser formado. Estas etapas na formação de nódulos implicam em mudanças em três tecidos de raiz: a epiderme, o córtex e o periciclo (GEURTS e BISSELING, 2002). Essas moléculas de sinalização, chamadas de fatores de nodulação, são responsáveis por iniciar o encurvamento do pêlo radicular, a formação do cordão de infecção e a ativação da divisão celular das células corticais, resultando na formação dos nódulos (SCHULZE et al., 1998).

A estrutura básica dos fatores de nodulação produzidos por diferentes espécies é muito semelhante. Geralmente, eles consistem de um esqueleto de - 1,4 -N-acetil-D-glucosamina ligados entre si, com 4 ou 5 resíduos dos quais o resíduo não-reduzido terminal é substituído na posição C2 com uma cadeia de acila. Dependendo da espécie, a estrutura da cadeia de acila pode variar, e substituições nos resíduos de glucosamina reduzidos e não reduzidos podem estar presentes (GEURTS e BISSELING, 2002). No entanto, as bactérias podem produzir mais de um fator de nodulação. Soria-Díaz et al. (2003) identificaram 4 tipos de fator de nodulação produzidos por *Rhizobium giadinii* H512, que, inclusive, nodula ineficientemente com o feijoeiro. Dentre diversas espécies que nodulam de forma eficiente e ineficiente com a planta, parece haver características comuns entre os fatores de nodulação, como a presença de um grupamento metil e a presença de ácido *cis*-vacênico (SORIA-DÍAZ et al., 2003).

Em relação ao *Bradyrhizobium*, Sanjuan et al. (1992) avaliaram que *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, quando crescida em meio com isoflavonóides, foi capaz de produzir uma substância (NodBj-V, C: 18, Me-Fuc) que é capaz de induzir os genes de nodulação de soja e siratro a promover uma nodulação precoce em concentrações tão baixas quanto 10 pM. Soulemanov et al. (2002) encontraram o mesmo fator de nodulação em *B. japonicum* 532C, que, por sua vez, tem importância agrônômica.

Os sinais de nodulação não são os únicos sinais emitidos pela bactéria para induzir a nodulação. Como em diversas interações, polissacarídeos de superfície também estão envolvidos na sinalização (SPAINK et al., 2000). Essas moléculas também agem como importantes sinais de iniciação dos processos simbióticos e são, basicamente, encontradas na forma de glucanos, lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares (KPS) e exopolissacarídeos (EPS) (D'HAEZE et al., 2004).

As funções biológicas dos polissacarídeos de superfície têm sido atribuídas também ao processo de reconhecimento inicial e formação dos nódulos. Djordjevic et al. (1987) avaliaram que mutantes de *Rhizobium* sp. NGR234 deficientes na produção de EPS foram incapazes de induzir a formação de nódulos eficientes em leucena e siratro, mas que a habilidade de formar nódulos funcionais foi restaurada após adição de EPS purificado a partir da estirpe selvagem.

O succinoglicano, uma forma de EPS, é a substância identificada que sinaliza a infecção do nódulo de alfafa (*Medicago sativa*). Battisti et al. (1992) identificaram uma das formas de succinoglicano de baixo peso molecular produzido por *Rhizobium meliloti* (hoje, *Ensifer meliloti*) que induz a infecção do nódulo em mutantes deficientes em EPS. Além disso, EPS de baixo peso molecular de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e *Rhizobium* sp. NGR234 não produziram os efeitos de invasão do nódulo.

Em *Bradyrhizobium japonicum*, o EPS desempenha papel na eficiência da simbiose com soja. Mutantes deficientes na produção de EPS apresentaram atraso de 5 dias no início da nodulação e apresentaram competitividade reduzida quando coinoculados com a estirpe selvagem. Neste caso, foi necessária uma diferença de dose entre a estirpe mutante e a selvagem de 100 vezes maior, para a mutante, para alcançar metade da taxa de ocupação nodular que a estirpe selvagem (PARNISKE et al., 1993).

Ainda na relação soja e *Bradyrhizobium*, Parniske et al. (1994) avaliaram que o EPS tem papel na prevenção da resposta de defesa da planta à bactéria. Mutantes para EPS levaram ao maior acúmulo de fitoalexinas (uma substância de defesa da planta contra microrganismos) em níveis 10 vezes maior que na inoculação com a estirpe selvagem. Os autores sugerem que a estrutura intacta do EPS é necessária para a prevenção da resposta de defesa da planta. Apesar dessa resposta, a bactéria mutante foi capaz de induzir a formação de nódulos eficientes. Em *Glycine soja*, o mesmo mutante de *B. japonicum* não foi capaz de formar nódulos eficientes e infectar a planta.

A literatura mostra que há uma miríade de respostas entre o rizóbio e a planta hospedeira. Por vezes, essa resposta é mais específica, seja por parte do microrganismo ou por parte da espécie vegetal. A falta ou alterações de substâncias que participam da comunicação química entre a planta e a bactéria pode levar ao estabelecimento de relações pouco eficientes ou mesmo evitar que essas relações continuem. Por outro lado, também é possível induzir a resposta através da aplicação exógena de substâncias e desenvolver uma resposta específica (ESSELING et al., 2004).

A ideia gerada a partir dos experimentos e dos dados leva a considerar que possa estar ocorrendo uma comunicação química entre o *Bradyrhizobium*, e que, possivelmente, essa comunicação esteja ocorrendo via sinais de nodulação. Essa interação pode estar levando à formação de nódulos e aumento do número de nódulos quando em coinoculação com *Rhizobium* pelo fato de mais nódulos estarem sendo formados. Neste caso, então, um possível

cenário é que o *Rhizobium* esteja entrando como um “oportunista” nos nódulos formados pelo *Bradyrhizobium* e passando a ativamente fixar nitrogênio, então, contribuindo para o crescimento e produção da planta.

A avaliação microscópica dos nódulos formados pelos *Bradyrhizobium* mostrou que os nódulos foram infectados pela bactéria, mas que os eventos de endocitose típicos de uma simbiose eficiente, como ocorreu com os nódulos induzidos pelo *Rhizobium* não estiveram presentes. Entretanto, foi possível encontrar a estirpe 29w habitando os espaços intercelulares, e o isolamento das duas estirpes inoculadas mostrou que foi possível recuperar as bactérias, indicando uma maior evidência de colonização dos nódulos, contrapondo resultados de literatura (MARTÍNEZ et al., 1985; MICHIELS et al., 1998).

A ineficiência dos nódulos induzidos pelo *Bradyrhizobium* pôde ser confirmada pela falta de atividade da nitrogenase e pela morfologia externa e coloração, descartando a possibilidade de FBN no feijoeiro pelo *Bradyrhizobium*. Em relação aos nódulos coinoculados, estes foram considerados bem colonizados e efetivos pela estirpe de *Rhizobium*, e apresentaram a morfologia e coloração similar a dos nódulos induzidos pela estirpe eficiente inoculada sozinha, indicando que o *Rhizobium* foi capaz de competir com o *Bradyrhizobium* pelo nicho de nodulação. Há uma relevância em saber se os nódulos coinoculados estão sendo colonizados apenas pela estirpe eficiente, ou pelas duas estirpes. Há evidências da colonização de nódulos de feijoeiro por outras bactérias que não o rizóbio (VALVERDE et al., 2003; HAN et al., 2005). No caso, a coinfecção com uma estirpe ineficiente pode afetar negativamente a FBN (MICHIELS et al., 1998) deixando de contribuir com o crescimento e produção da planta de feijoeiro.

6. CONCLUSÕES

- A coinoculação com as estirpes 29w de *Bradyrhizobium elkanii* e CIAT 899 de *Rhizobium tropici* favoreceu o crescimento de plantas de feijoeiro em vasos com solo não estéril.
- Em condições de vasos de Leonard, a combinação CPAC 7 de *Bradyrhizobium japonicum* + CIAT 899 *Rhizobium tropici* favoreceu significativamente o crescimento e nodulação das plantas de feijoeiro em comparação com a estirpe eficiente CIAT 899 de *Rhizobium tropici*.
- A combinação CPAC 7 + CIAT 899 levou ao aumento de produtividade na cultura do feijoeiro em experimento de campo quando inoculada na semente ($p \leq 10\%$), alcançando 20 % a mais que a inoculação com a CIAT 899 na semente.
- A microscopia e o isolamento dos nódulos mostraram que as estirpes de *Bradyrhizobium* foram encontradas dentro dos nódulos, ao contrário do que tem sido reportado pela literatura, e que a simbiose do *Bradyrhizobium* com o feijoeiro não é eficiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; SHIBATA, J. K. Effect of water stress of growth and yield of indeterminate dry-bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. **Field Crops Research**, v. 20, p. 81-89, 1989.
- AKTER, Z.; PAGANI, B. B.; LUPWAYI, N. Z.; BALASUBRAMANIAN, P. M. Biological nitrogen fixation and nif H gene expression in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, p. 203-212, 2014.
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M. R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, v. 161, p. 147-156, 1994.
- ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4016-4021, 1995.
- ARNHOLD, E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.50, n.6, p. 488-492, 2013.
- BASTOS, R. A. **Co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal em feijoeiro comum**. 2016. 155f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2016.
- BATTISTI, L.; LARA, J. C.; LEIGH, J. A. Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 5625-5629, 1992.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília, DF: SNTA/DNDV/CLAV, 399p., 2009.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011**, Normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, Brasília, DF, 2011.
- BRINKMAN, E. P.; van der PUTTEN, W. H.; BAKKER, E.-J.; VERHOEVEN, K. J. F. Plant-soil feedback: experimental approaches, statistical analyses and ecological interpretations. **Journal of Ecology**, v. 98, p. 1063-1073, 2010.
- BRITO, L. F.; PACHECO, R. S.; SOUZA FILHO, B. F.; FERREIRA, E. P. B.; STRALIOTTO, R. & ARAÚJO, A. P. Resposta do feijoeiro comum à inoculação com rizóbio e suplementação com nitrogênio mineral em dois biomas brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, n.4, p. 981-992, 2015.
- BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; D'ÁVILA, G. & PALACIOS, R. Narrow and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodule *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1280-1283, 1988.

BROUGHTON, W. J.; JABBOURI, S.; PERRET, X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, v. 18, p. 25641-25652, 2000.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, p. 55-128, 2003.

BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 237–245, 2000.

BURDMAN, S.; VOLPIN H.; KIGEL J.; KAPULNIK Y.; OKON, Y. Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3030–3033, 1996.

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 923–929, 1997.

CARVALHO, M. A. C.; ARF, O.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S.; SANTOS, N. C. B.; BASSAN, D. A. Produtividade e qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob influência de parcelamentos e fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 3, p. 617-624, 2001.

CHAVERRA, M. H.; GRAHAM, P. H. Cultivar variation in traits affecting early nodulation of common bean. **Crop Science**, v. 32, p. 1432–1436, 1992.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 5, n.1, 2017.

DAGUTAT, H.; STEYN, P. L. Taxonomy and distribution of rhizobia indigenous to South African soils. In: TIKONOVICH, I. A.; PROVOPOROV, N. A.; ROMANOV, V. I.; NEWTON, W. E., eds. **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer, 683 p., 1995.

DALL'AGNOL, R. F.; PLOTEGHER, F.; SOUZA, R. C.; MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. *Paraburkholderia nodosa* is the main N-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian 'Cerradão'. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 8, 2016.

DALL'AGNOL, R. F.; BOURNAUD, C.; FARIA, S. M.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 4, 2017.

D'HAEZE, W.; GLUSHKA, J.; DE RYCKE, R.; HOLSTERS, M.; CARLSON, R. W. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 485-500, 2004.

DELAMUTA, J. R.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MELO, I. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3342-3351, 2013.

DE MENDIBURU, F (2009) Una herramienta de analisis estadistico para la investigacion agricola. **Tese**. Universidad Nacional de Ingenieria (UNI-PERU).

DJORDJEVIC S. P.; CHEN, H.; BATLEY, M.; REDMOND, J. W.; ROLFE, B. G. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 53–60, 1987.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**, Embrapa CNPAB: Série Documentos 110, 38 p., 1999.

ESSELING J. J.; LHUISSIER, F. G. P.; EMONS, A. M. C. A nonsymbiotic root hair tip growth phenotype in *NORK*-mutated legumes: implications for nodulation factor–induced signaling and formation of a multifaceted root hair pocket for bacteria. **Plant Cell**, v. 16, n. 4, p. 933-944, 2004.

FAOSTAT - Food And Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (2014). **Production/Crops**. Disponível em < <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acessado em 02 de setembro de 2016.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTÍNEZ, C. R.; CHANWAY, C. P. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, v. 40, p 182-188, 2008.

FUKUHARA, H.; MYNAKAWA, Y.; AKAO, S.; MINAMISAWA, K. The involvement of indolic-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, n. 8, p. 1261-1265, 1994.

GANO-COHEN, K. A.; STOKES, P. J.; BLANTON, M. A.; WENDLANDT, C. E.; HOLLOWELL, A. C.; REGUS, J. U.; KIM, D.; PATEL, S.; PAHUA, V. J.; SACHS, J. L. Nonnodulating *Bradyrhizobium* spp. modulate the benefits of legume-Rhizobium mutualism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 17, p. 5259-5268, 2016.

GERMAN, M. A.; BURDMAN, S.; OKON, Y.; KIGEL, J. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, p. 259-264, 2000.

GEURTS, R.; BISSELING, T. *Rhizobium* nod factor perception and signaling. **The Plant Cell**, v. 14, p. 239-249, 2002.

- GLICK, B. R.; TODOROVIC, B.; CZARNY, J.; CHENG, Z.; DUAN, J.; MCCONKEY, B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 26, p. 227–242, 2007.
- GRAHAM, P. H.; PARKER, C. A. Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. **Plant and Soil**, v. 20, p. 383–396, 1964.
- GRAHAM, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. **Field Crops Research**, v. 4, p. 93–112, 1981.
- GRAHAM, P. H.; RANALLI, R. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, v. 55, p. 131–146, 1997.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia in two Brazilian ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1389–1398, 2004.
- HAN, S. Z.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylotropis* and *Cassia* grown in China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 265–276, 2005.
- HARDARSON, G.; BLISS, F. A.; CIGALES-RIVERO, M. R.; HENSON, R. A.; KIPE-NOLT, J. A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PENACABRIALES, J. J.; PEREIRA, P. A. A.; SANABRIA, C. A.; TSAI, S. M.. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. **Plant and Soil**, v. 152, p. 59–70, 1993.
- HONMA, M.; SHIMOMURA, T. Metabolism of 1-amino-cyclo-propane-1-carboxylic acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 1825–1831, 1978.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos cerrados**, Planaltina, Embrapa-CPAC, p. 189–294, 1997.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research** v. 65, p. 151–164, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility Soils**, v. 39, p. 88–93, 2003.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p. 927–939, 2006.
- HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S.; SILVA JÚNIOR, E. B.; ZILLI, J. E. Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 3, p. 1–7, 2017.

ISOI, T.; YOSHIDA, S. Low nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Science Plant Nutrition**, v. 37, n. 3, p. 559-563, 1991.

KLOEPPER, J. W.; GUTIÉRREZ-ESTRADA, A.; MCLNROY, J. A. Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 159–167, 2007.

LENTH, R. **Emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means**. R package version 0.9.1, 2017. Disponível em <<https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>>. Acessado em 20 de abril de 2018.

MA, W.; PENROSE, D. M.; GLICK, B. R. Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 947-954, 2002.

MARTÍNEZ, E.; PARDO, M. A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M. A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, v. 131, p. 1779-1786, 1985.

MARTINEZ-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.

MICHIELS J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN N.; XI, C.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 193-205, 1998.

MINAMISAWA, K.; FUKAI, K.; Production of indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*: a correlation with genotype grouping and rhizobitoxine production. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, p. 1-9, 1991.

MINAMISAWA, K., KUME N. Determination of rhizobitoxine and dihydrorhizobitoxine in soybean plants by amino acid analyzer. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 33, p. 645-649, 1987.

MNASRI, B. AOUBANI, M. E.; MHANDI, R.; Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1744-1750, 2007.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, Lavras: Editora UFLA, 729p., 2006,

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 3, p. 121-132, 2001.

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

OLIVEIRA, A. P.; SILVA, V. R. F.; ARRUDA, F. P.; NASCIMENTO, I. S.; ALVES, A. U. Rendimentos de feijão caupi em função de doses e formas de aplicação de nitrogênio, **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 77-80, 2003.

PARNISKE, M.; KOSCH, K.; WERNER, D.; MULLER, P. ExoB mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with reduced competitiveness on *Glycine max*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v 6, p. 99-106, 1993.

PARNISKE, M.; SCHMIDT, P. E.; KOSCH, K.; MULLER, P. Plant defense response of host plants with determinate nodules induced by EPS defective exoB mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 7, p. 631-638, 1994.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. M.; MIYUKI, M.; OTSUBO, N.; OTSUBO, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 219-226, 2009.

POHLERT, T. **The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR)**. R package, 2014. Disponível em <<http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>>. Acessado em 15 de abril de 2018.

RAPOSEIRAS, R.; MARRIEL, I. E.; MUZZI, M. R. S.; PAIVA, E.; PEREIRA FILHO, I. A.; CARVALHAIS, L. C.; PASSOS, R. V. M.; PINTO, P. P.; SÁ, N. M. H. *Rhizobium* strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 439-47, 2006.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2017

REMANS, R.; CROONEMBORGHS, A.; GUTIERREZ, R. T.; MICHIELS, J.; VAANDERLEYDES, J. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 341-351, 2007.

REMANS, R.; RAMAEKERS, L.; SCHELKENS, S.; HERNANDEZ, G.; GARCIA, A.; REYES, J. L.; MENDEZ, N.; TOSCANO, V.; MULLING, M.; GALVEZ, L.; VANDERLEYDEN, J. Effect of *Rhizobium*-*Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. **Plant and Soil**, v. 312, p. 25-37, 2008.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. **RStudio**, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>. 2017

SALEEM, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, S.; BHATTI, A. E. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 635-648, 2007.

SANJUAN, J.; CARLSON, R. W.; SPAINK, H. P.; RHAMADAS BHAT, U.; BARBOUR, W. M.; GLUSHKA, J.; STACEY, G. A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 8789-8793, 1992.

SCHULZE, M.; KONDOROSI, E.; RATET, P.; BUIRE, M.; KONDOROSI, A. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interaction. **International Review of Cytology**, v. 156, p. 71-75, 1998.

SILVA, K.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; BRANDT, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F. M. S. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 175-182, 2012.

SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 254, p. 257-288, 2000.

SORIA-DÍAZ, M. E.; TEJERO-MATEO, P.; ESPARTERO, J.; RODRÍGUEZ-CARVANJAL, M. A.; MORÓN, B.; SOUSA, C.; MEGÍAS, M.; AMARGER, N.; THOMAS-OATES, J.; GIL-SERRANO, A. M. Structural determination of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals produced by *Rhizobium giardinii* bv *giardinii* H152. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 237-250, 2003

SOULEMANOV, A.; PRITHIVIRAJ, B.; CARLSON, R. W.; JEYARETNAM, B.; SMITH, D. L. Isolation and characterization of the major nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* strain 532C. **Microbiological Research**, v. 157, p. 25-28, 2002.

STAJKOVIĆ, O.; DELIĆ, D.; JOŠIĆ, D.; KUZMANOVIĆ, D.; RASULIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16, n. 1, p. 5919-5926, 2011.

STANLEY, J. S., BROWN, G. G., VERMA, D. P. S. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. **Journal of Bacteriology**, v. 163, p. 148-154, 1985.

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

TALBI, C.; DELGADO, M. J.; GIRARD, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; BEDMAR, E. J. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4587-4591, 2010.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 19-28, 1991.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. *Herbaspirillum lusitanum* sp. Nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated

with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Response of field grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two Cerrado soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, p. 228-33, 2000.

VASSE, J.; de BILLY, F.; CAMUT, S.; TRUCHET, G. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 8, 4295-4306, 1990.

VERMA, J. P.; YADAV, J.; TIWARI, K. N.; LAVAKUSH; SINGH, V. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. **International Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 11, p. 954-983, 2010.

WANG, L. WEI, G H. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi province. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39, n. 3 p. 211-219, 2016.

WEAVER, R. W.; DANSO, S. K. A. Dinitrogen fixation. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S.; BOTTOMLEY, P. S. **Methods of Soil Analysis, Part 2 – Microbiological and Biochemical Properties**, SSA Book Series 5, Madison, Wisconsin, p. 1019-1045, 1994.

WEIR, B. S. **The current taxonomy of rhizobia**. 2016. <<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>>. Acesso em: 06 março, 2018.

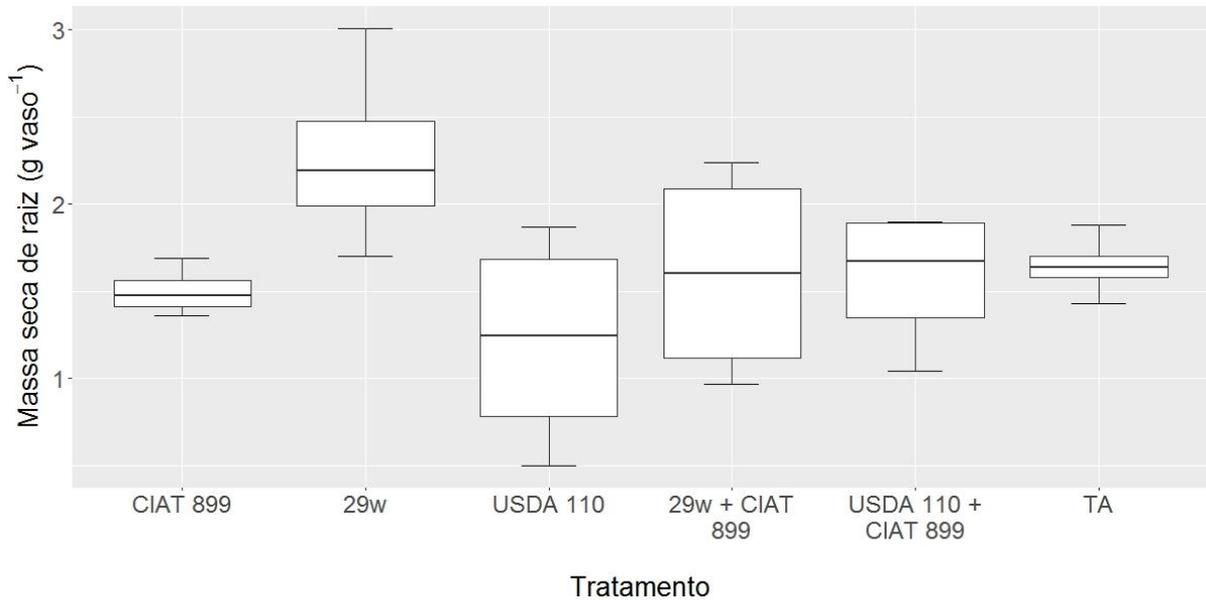
WOOMER, P. L.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Reliability of the Most-Probable-Number technique for enumerating rhizobia in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1494-1497, 1988.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2009.

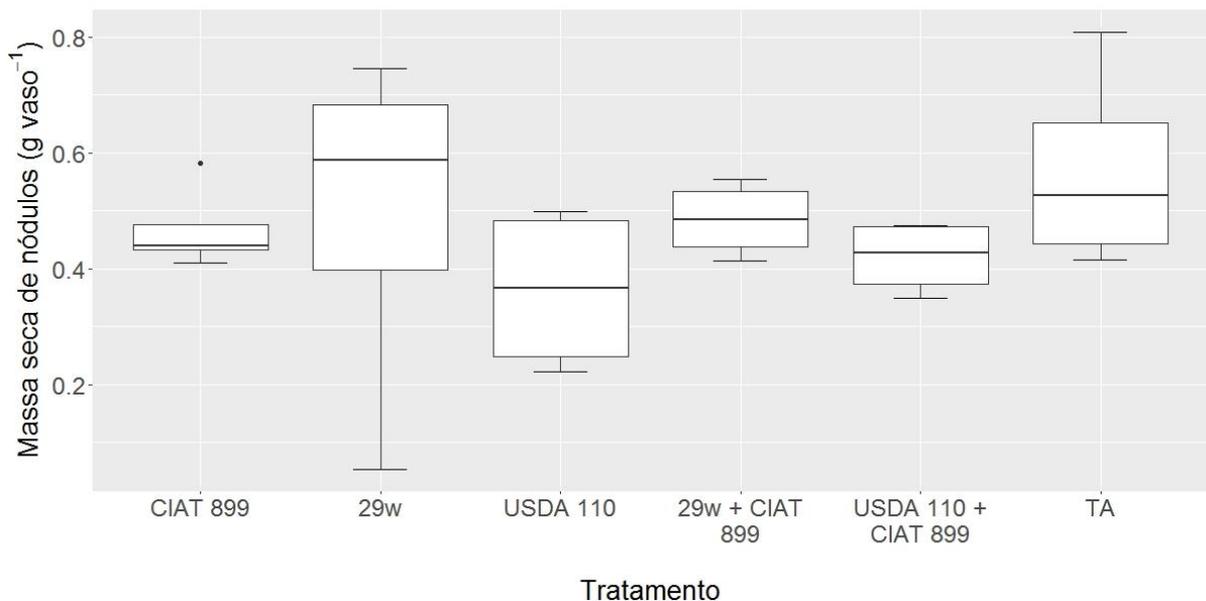
YUHASHI, K.; ICHIKAWA, N.; EZURA, H.; AKAO, S.; MYNAKAWA, Y.; NUKUI, N.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K. Rhizobitoxine production by *Bradyrhizobium elkanii* enhances nodulation and competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2658-2663, 2000.

8. ANEXOS

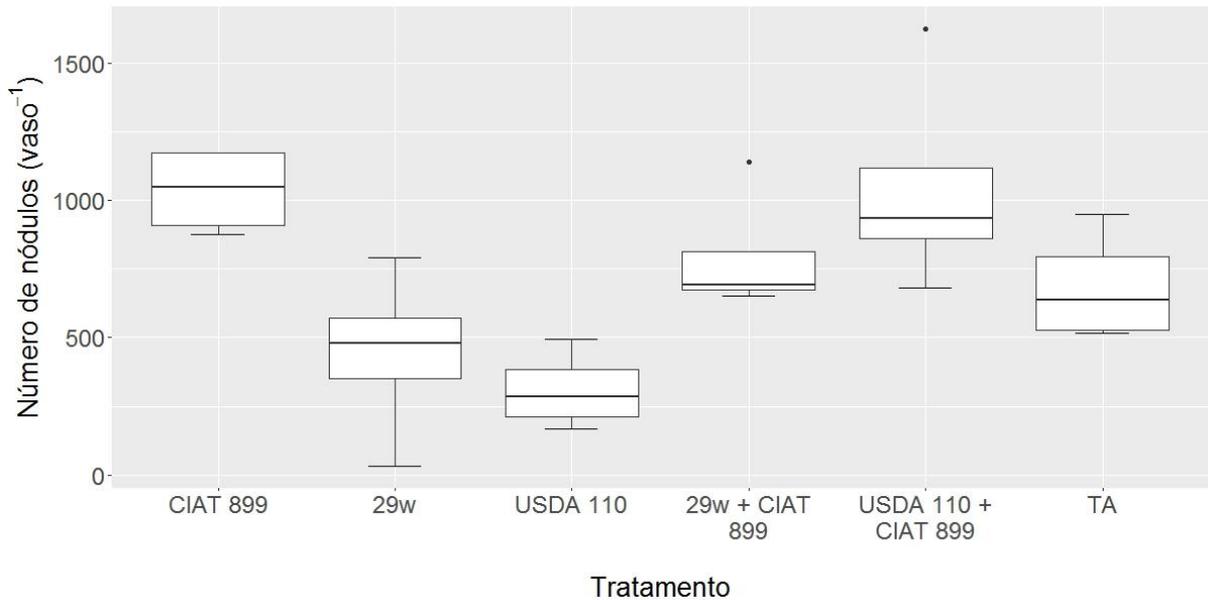
ANEXO A



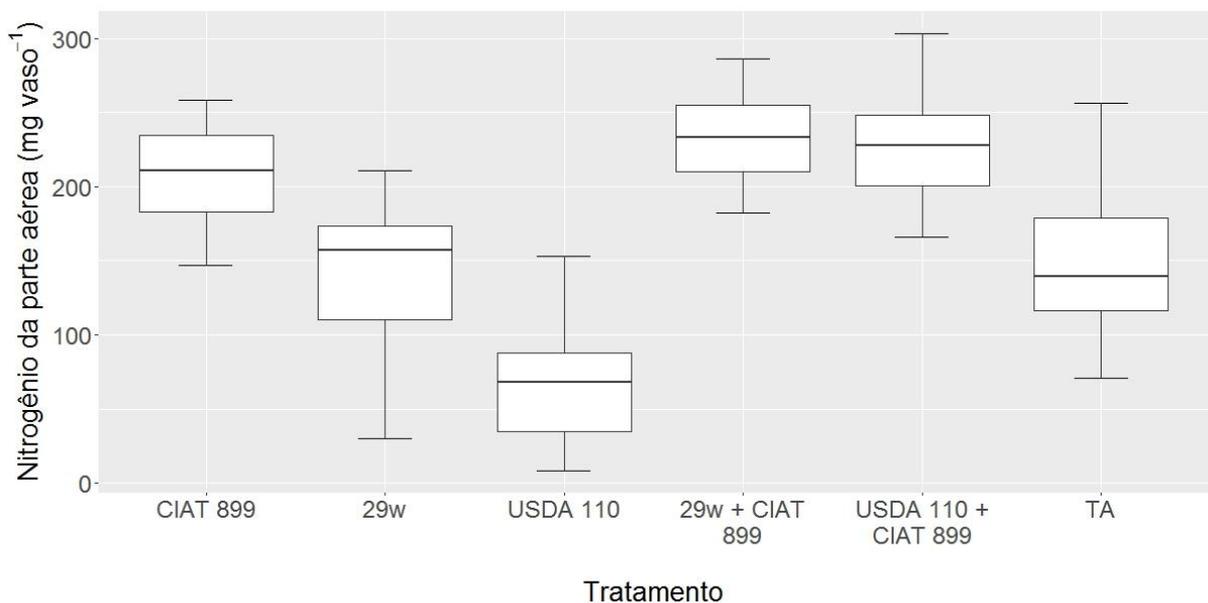
Anexo A1: Gráfico de *boxplot* para massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta.



Anexo A2: Gráfico de *boxplot* para massa seca nódulos (MSNN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta.

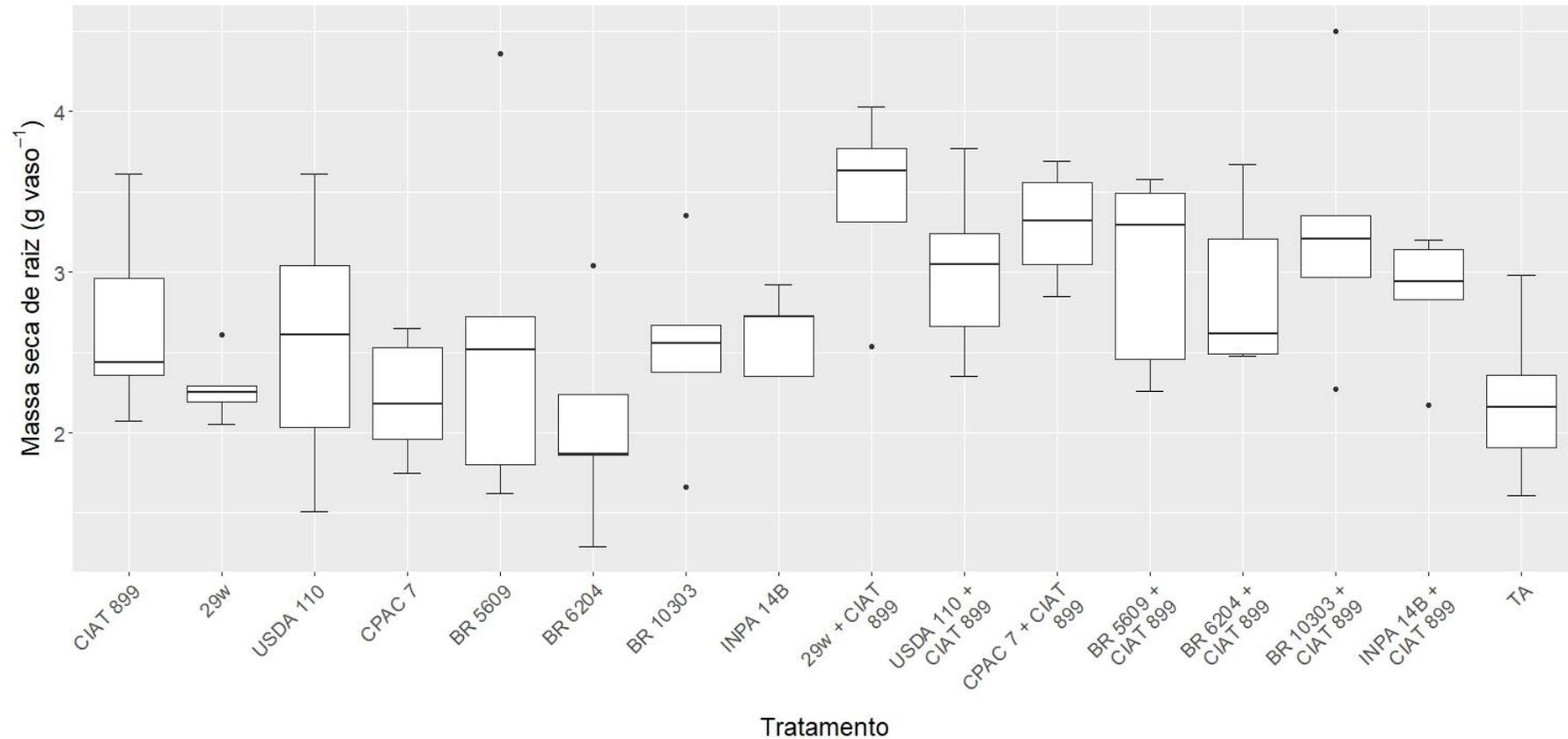


Anexo A3: Gráfico de *boxplot* para número de nódulos (NN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta.



Anexo A4: Gráfico de *boxplot* para nitrogênio acumulado na parte aérea (NPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Bradyrhizobium* (29w e USDA 110) após 44 dias de cultivo, em experimento para avaliação da coinoculação ou inoculação com o *Bradyrhizobium* em vasos com solo. Foram cultivadas duas plantas por vaso. TA = testemunha absoluta.

ANEXO B



Anexo B1: Gráfico de *boxplot* para massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes para coinoculação; TA = testemunha absoluta.

Anexo B2: Tabela de comparações múltiplas pareadas pelo teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) para massa seca de parte aérea (MSPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes. Cultivo de duas plantas por vaso

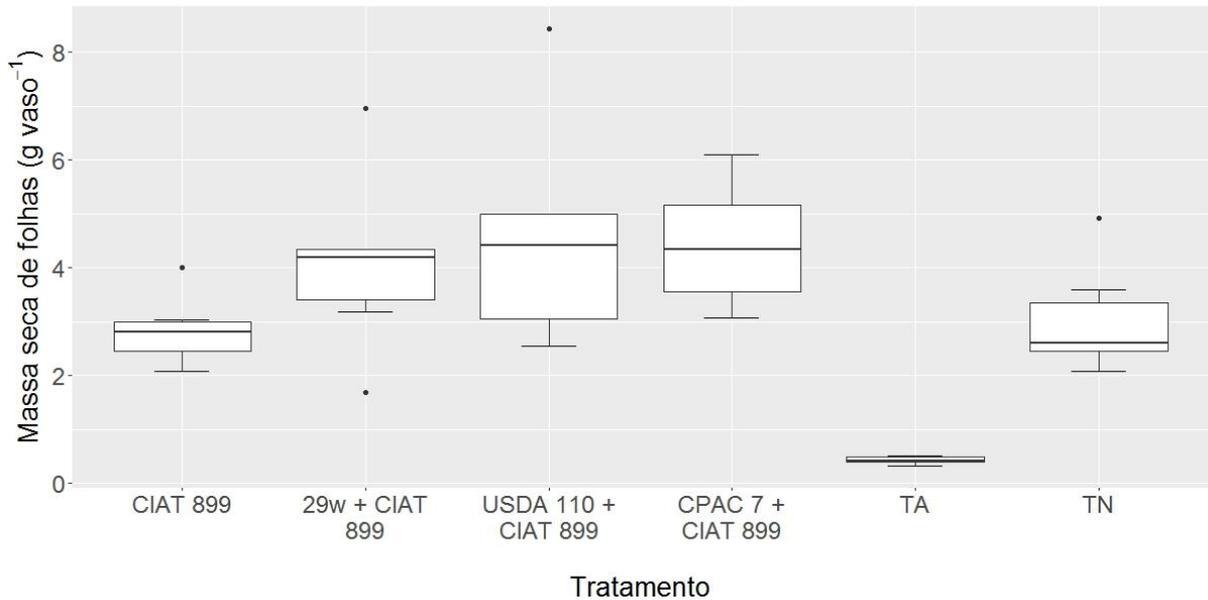
Tratamento	CIAT 899	29w	USDA 110	CPAC 7	BR 5609	BR 6204	BR 10303	INPA 14B
29w	5,30E-06	-	-	-	-	-	-	-
USDA 110	1,40E-05	0,73659	-	-	-	-	-	-
CPAC 7	0,00013	0,29361	0,64659	-	-	-	-	-
BR 5609	5,30E-06	0,98031	0,74185	0,29811	-	-	-	-
BR 6204	4,00E-05	0,5006	0,88693	0,85505	0,50631	-	-	-
BR 10303	0,00016	0,27033	0,60966	0,97518	0,27865	0,84319	-	-
INPA 14B	7,90E-06	0,85505	0,93073	0,50343	0,85746	0,77832	0,4706	-
29w + CIAT 899	0,91151	5,30E-06	6,80E-06	5,80E-05	5,30E-06	1,60E-05	6,80E-05	5,30E-06
USDA 110 + CIAT 899	0,93898	5,30E-06	2,20E-05	0,00021	5,40E-06	6,40E-05	0,00024	1,10E-05
CPAC 7 + CIAT 899	0,93898	5,30E-06	1,00E-05	8,80E-05	5,30E-06	2,60E-05	0,00011	6,40E-06
BR 5609 + CIAT 899	0,88693	6,80E-06	3,90E-05	0,00035	6,80E-06	0,00011	0,00043	2,00E-05
BR 6204 + CIAT 899	0,93073	5,50E-06	2,50E-05	0,00024	5,60E-06	7,20E-05	0,00028	1,30E-05
BR 10303 + CIAT 899	0,941	5,30E-06	2,00E-05	0,00019	5,30E-06	6,00E-05	0,00023	1,10E-05
INPA 14B + CIAT 899	0,37172	8,50E-05	0,00056	0,00573	8,80E-05	0,00168	0,00675	0,00028
TA	5,60E-06	0,93073	0,85505	0,40857	0,93073	0,64659	0,37421	0,93073

continua

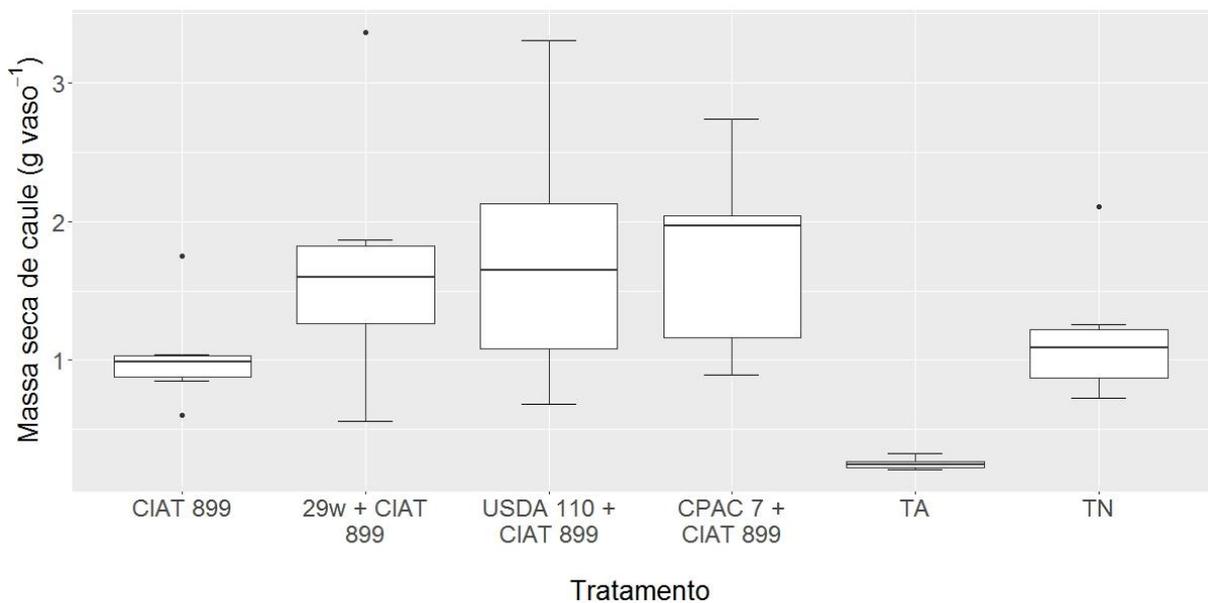
Anexo B2: Tabela de comparações múltiplas pareadas pelo teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) para massa seca de parte aérea (MSPA) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, após 45 dias de cultivo, em experimentação para seleção de estirpes. Cultivo de duas plantas por vaso (continuação)

Tratamento	29w + CIAT 899	USDA 110 + CIAT 899	CPAC 7 + CIAT 899	BR 5609 + CIAT 899	BR 6204 + CIAT 899	BR 10303 + CIAT 899	INPA 14B + CIAT 899
29w	-	-	-	-	-	-	-
USDA 110	-	-	-	-	-	-	-
CPAC 7	-	-	-	-	-	-	-
BR 5609	-	-	-	-	-	-	-
BR 6204	-	-	-	-	-	-	-
BR 10303	-	-	-	-	-	-	-
INPA 14B	-	-	-	-	-	-	-
29w + CIAT 899	-	-	-	-	-	-	-
USDA 110 + CIAT 899	0,85505	-	-	-	-	-	-
CPAC 7 + CIAT 899	0,93898	0,91367	-	-	-	-	-
BR 5609 + CIAT 899	0,73921	0,93073	0,84319	-	-	-	-
BR 6204 + CIAT 899	0,83855	0,97691	0,88693	0,93898	-	-	-
BR 10303 + CIAT 899	0,85505	0,98031	0,92689	0,93073	0,97343	-	-
INPA 14B + CIAT 899	0,23895	0,44756	0,29811	0,54697	0,4706	0,43629	-
TA	5,30E-06	7,20E-06	5,30E-06	1,10E-05	7,90E-06	8,00E-07	0,00017

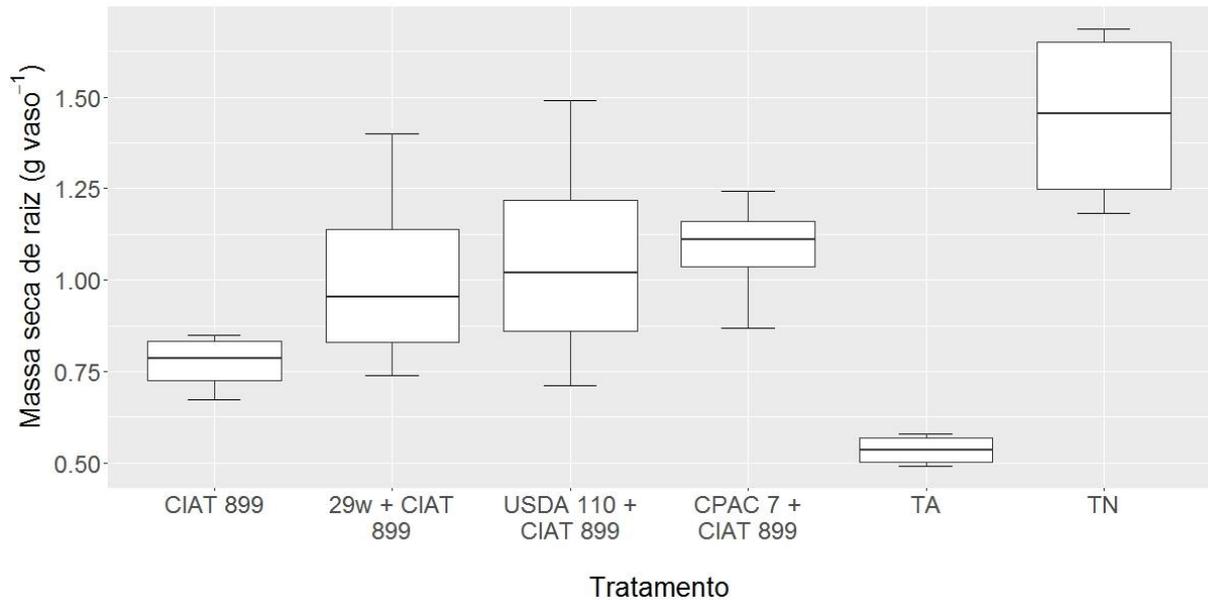
ANEXO C



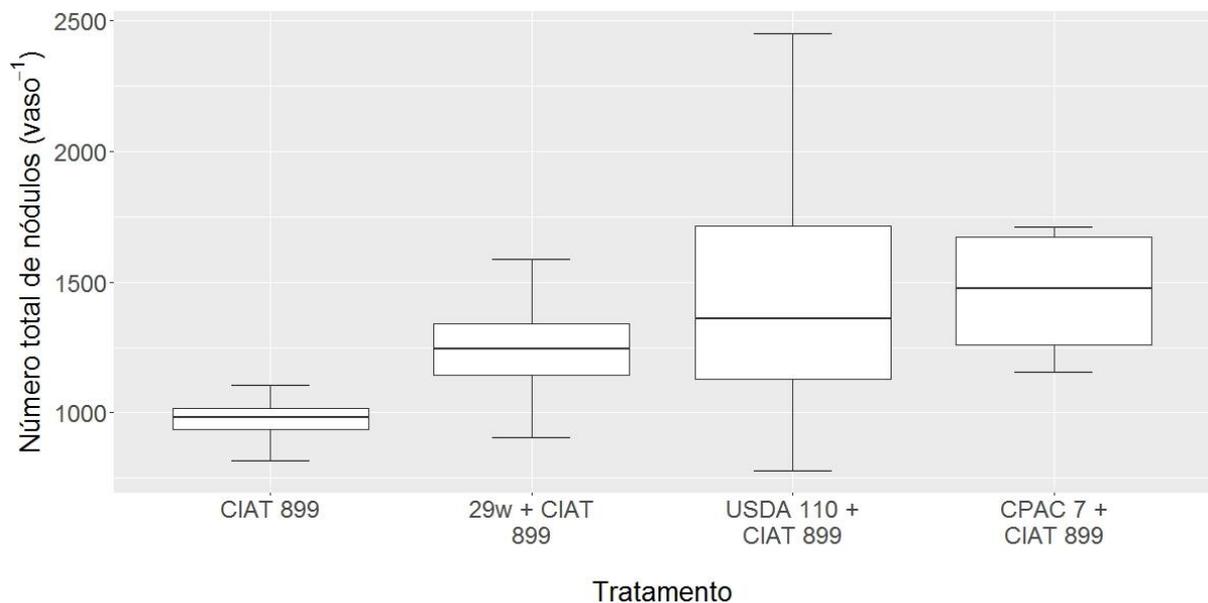
Anexo C1: Gráfico de *boxplot* para massa seca de folhas (MSPAF) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta.



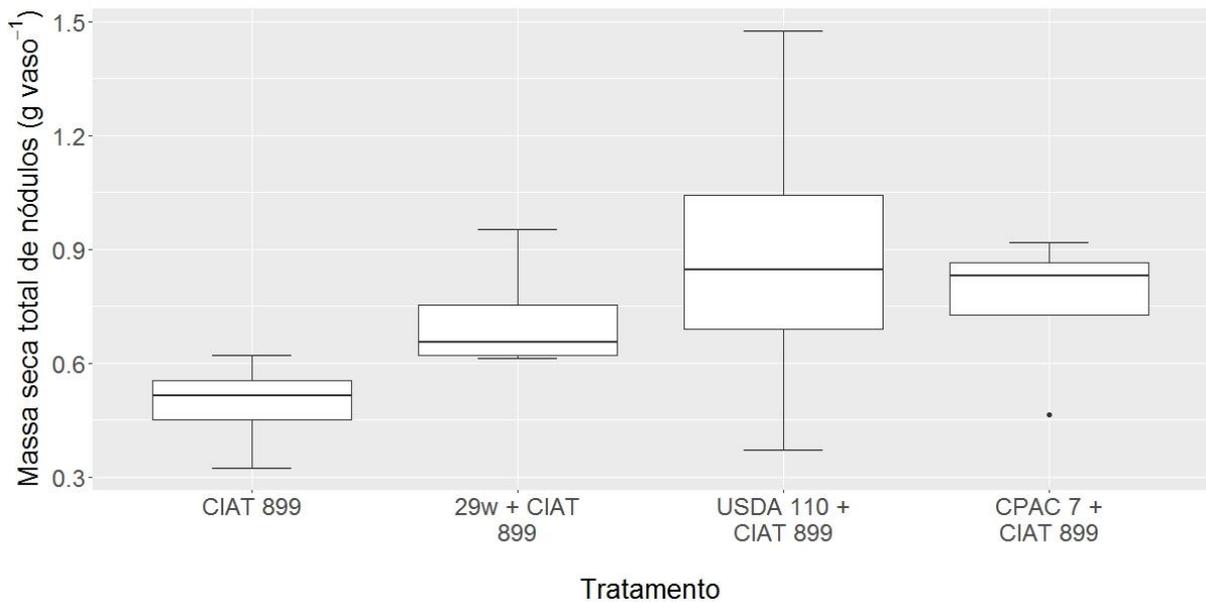
Anexo C2: Gráfico de *boxplot* para massa seca de caule (MSPAC) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta.



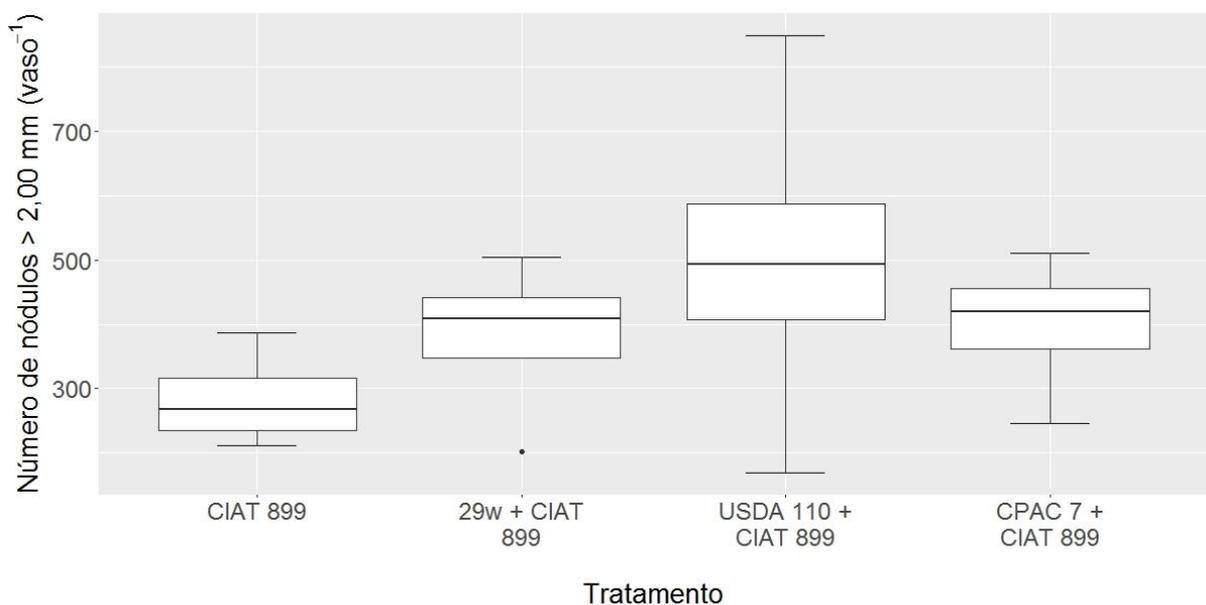
Anexo C3: Gráfico de *boxplot* para massa seca raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta.



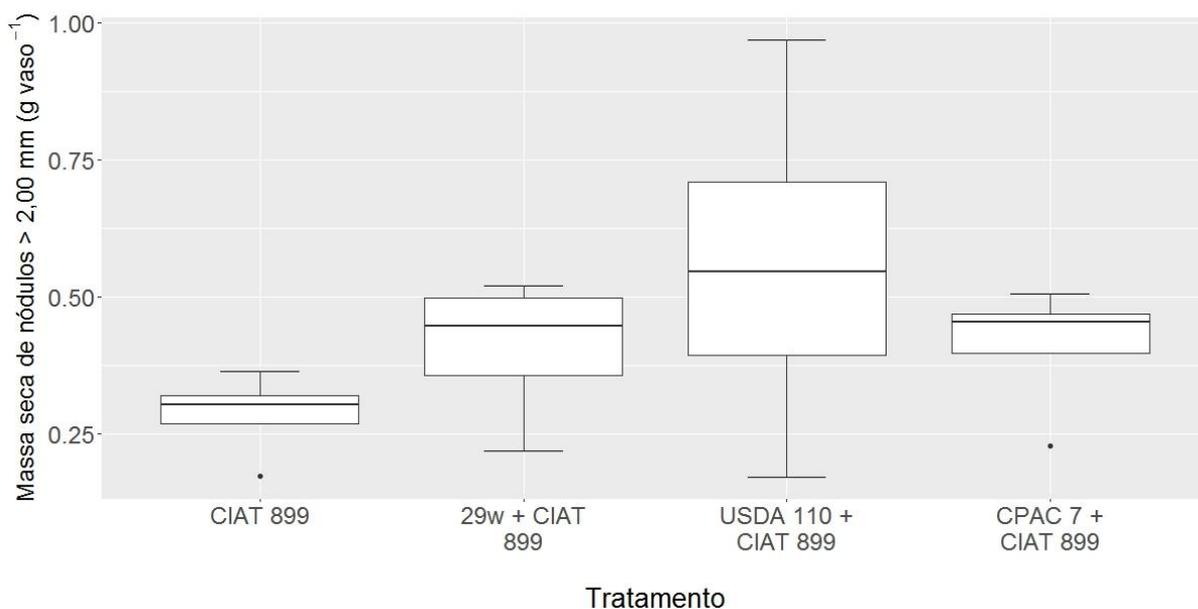
Anexo C4: Gráfico de *boxplot* para número total de nódulos (NNT) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.



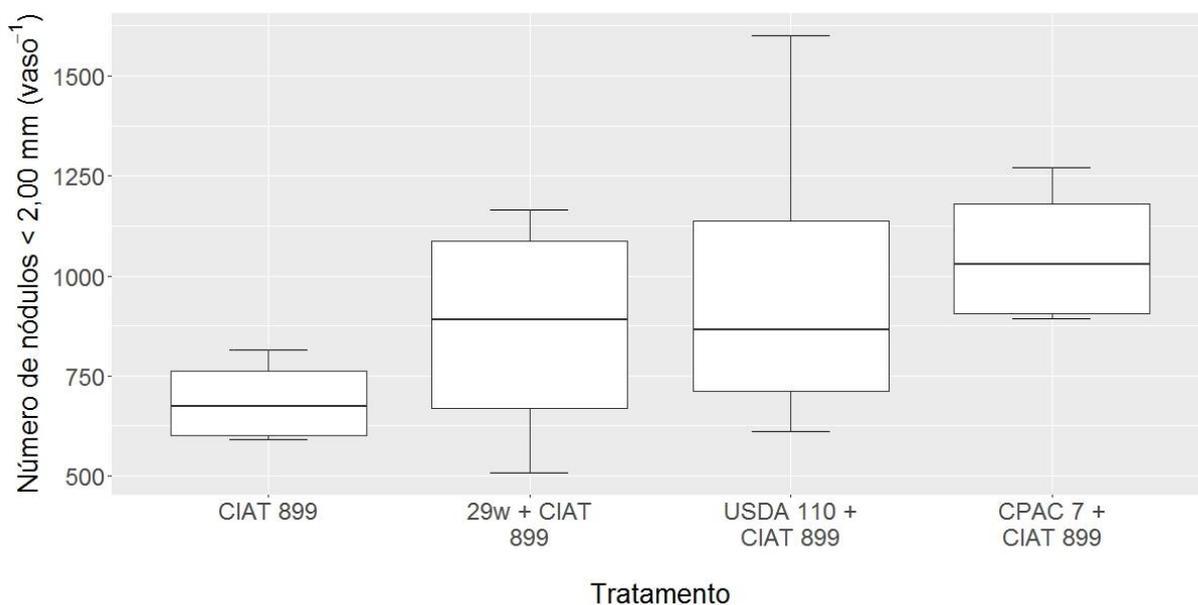
Anexo C5: Gráfico de *boxplot* para massa seca total de nódulos (MSNNT) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.



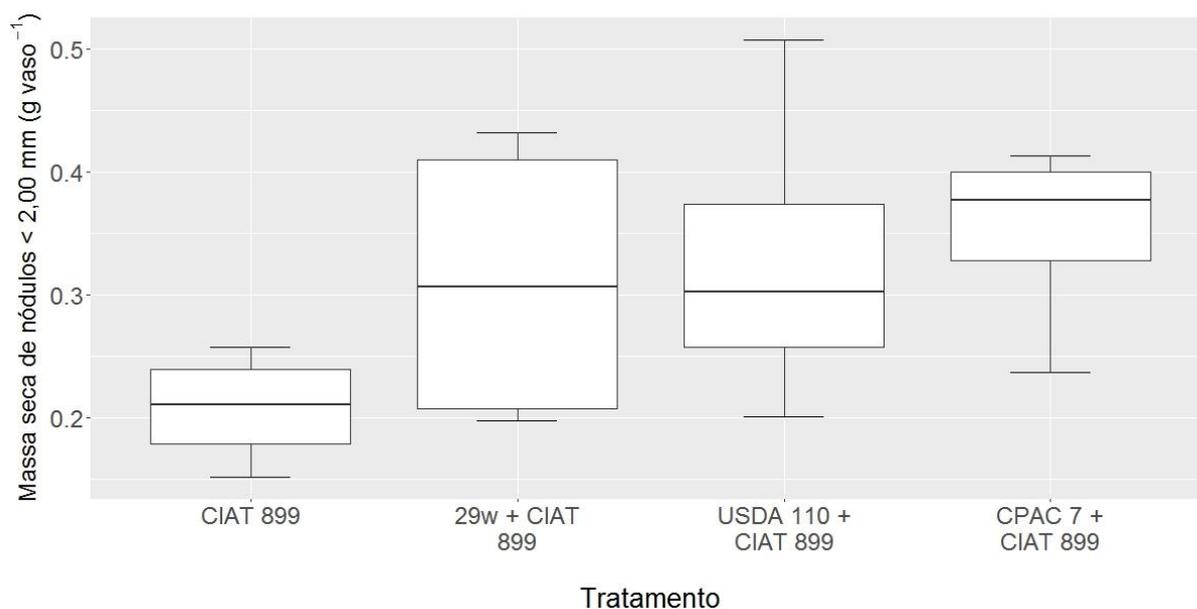
Anexo C6: Gráfico de *boxplot* para número de nódulos > 2,00 mm (NN>2) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.



Anexo C7: Gráfico de *boxplot* para massa seca de nódulos > 2,00 mm (MSNN>2) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.



Anexo C8: Gráfico de *boxplot* para número de nódulos < 2,00 mm (NN<2) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.



Anexo C9: Gráfico de *boxplot* para massa seca de nódulos < 2,00 mm (MSNN<2) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso.

Anexo C10: Tabela de comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) para massa seca de parte aérea total (MSPAT) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta.

Tratamento	CIAT 899	29w + CIAT 899	USDA 110 + CIAT 899	CPAC 7 + CIAT 899	TA
29w + CIAT 899	0,12764	-	-	-	-
USDA 110 + CIAT 899	0,08468	0,78827	-	-	-
CPAC 7 + CIAT 899	0,03317	0,50146	0,68291	-	-
TA	0,02493	0,00035	0,00022	9,60E-05	-
TN	0,78827	0,19306	0,12764	0,05336	0,01582

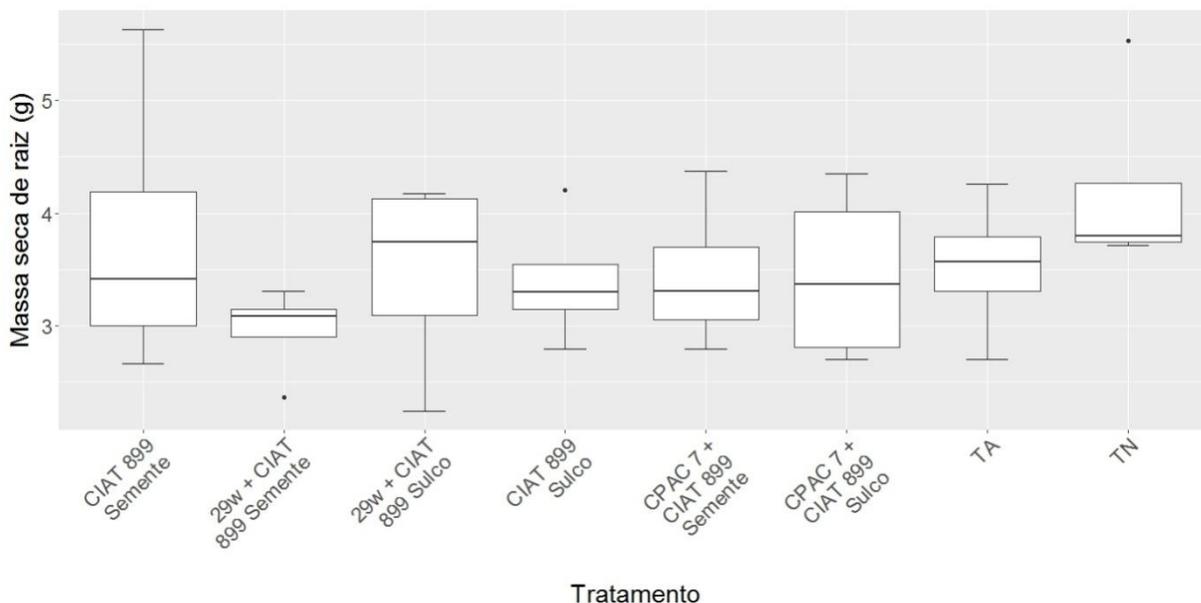
Anexo C11: Tabela de comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) para para massa seca de folha (MSPAF) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta.

Tratamento	CIAT 899	29w + CIAT 899	USDA 110 + CIAT 899	CPAC 7 + CIAT 899	TA
29w + CIAT 899	0,08645	-	-	-	-
USDA 110 + CIAT 899	0,0548	0,78415	-	-	-
CPAC 7 + CIAT 899	0,02417	0,5449	0,73739	-	-
TA	0,02417	0,00022	0,00013	7,00E-05	-
TN	0,78415	0,13623	0,08645	0,03997	0,01652

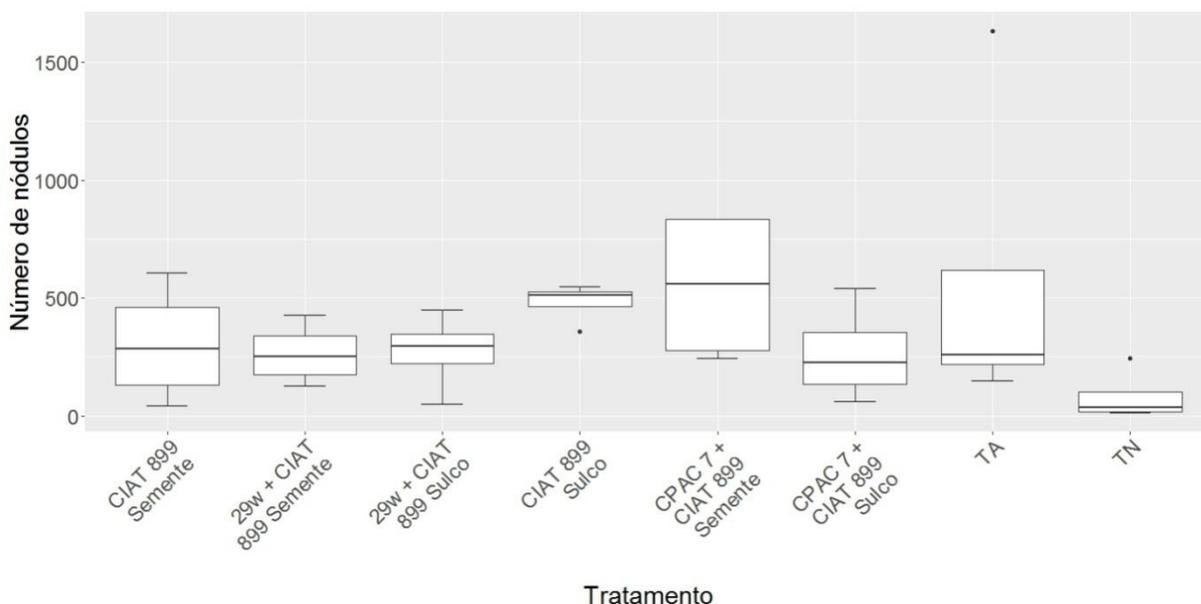
Anexo C12: Tabela de comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Conover ($p \leq 0,05$) para para massa seca de caule (MSPAC) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculado ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium* após 43 dias de cultivo, em experimento para validação dos efeitos das estirpes selecionadas em vasos de Leonard. Cultivo de duas plantas por vaso; TN = testemunha nitrogenada; TA = testemunha absoluta.

Tratamento	CIAT 899	29w + CIAT 899	USDA 110 + CIAT 899	CPAC 7 + CIAT 899	TA
29w + CIAT 899	0,21081	-	-	-	-
USDA 110 + CIAT 899	0,1579	0,8854	-	-	-
CPAC 7 + CIAT 899	0,13692	0,82944	0,8854	-	-
TA	0,03474	0,00078	0,00063	0,00063	-
TN	0,619	0,48038	0,38105	0,33453	0,00761

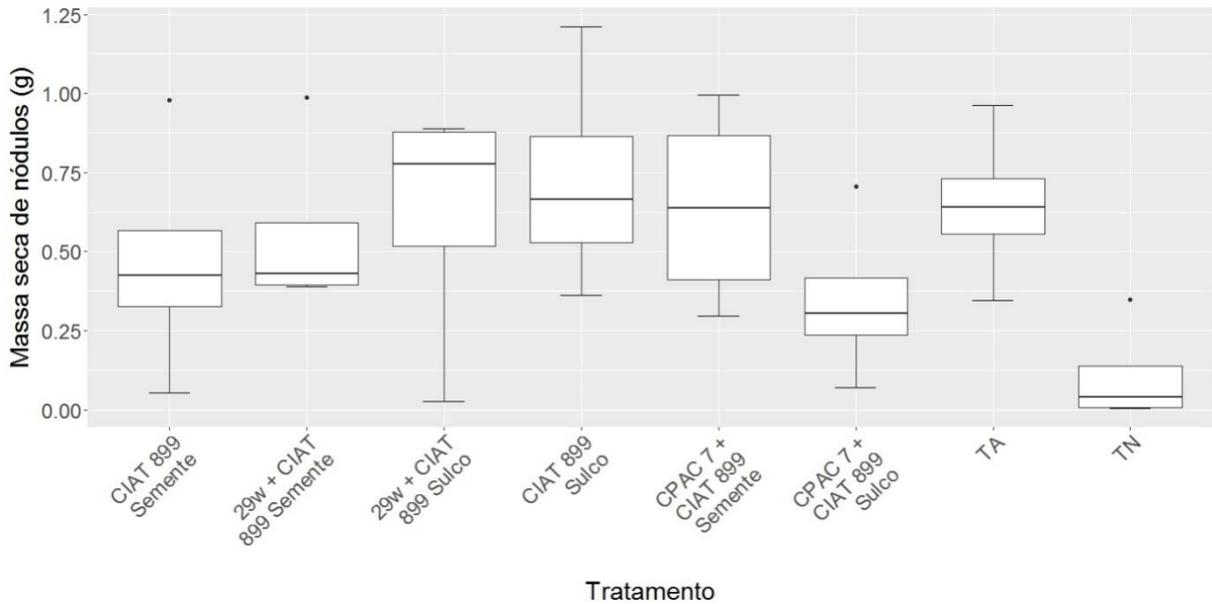
ANEXO D



Anexo D1: Gráfico de *boxplot* para massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. Dados correspondem à soma de 5 plantas coletadas em sequência na parcela.

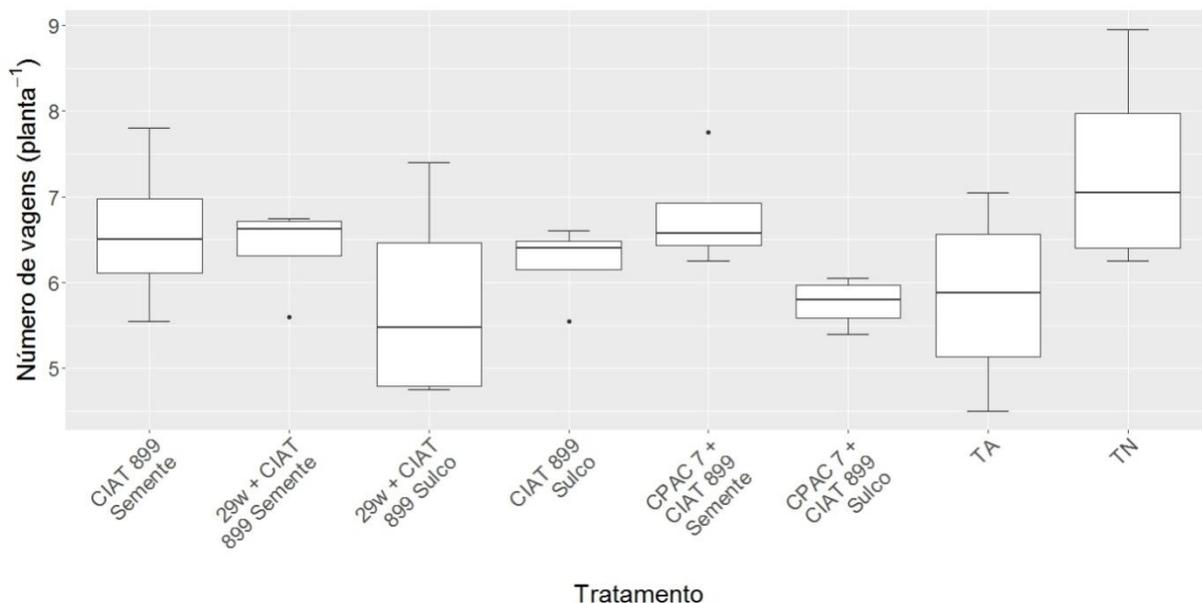


Anexo D2: Gráfico de *boxplot* para número de nódulos (NN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. Dados correspondem à soma de 5 plantas coletadas em sequência na parcela.

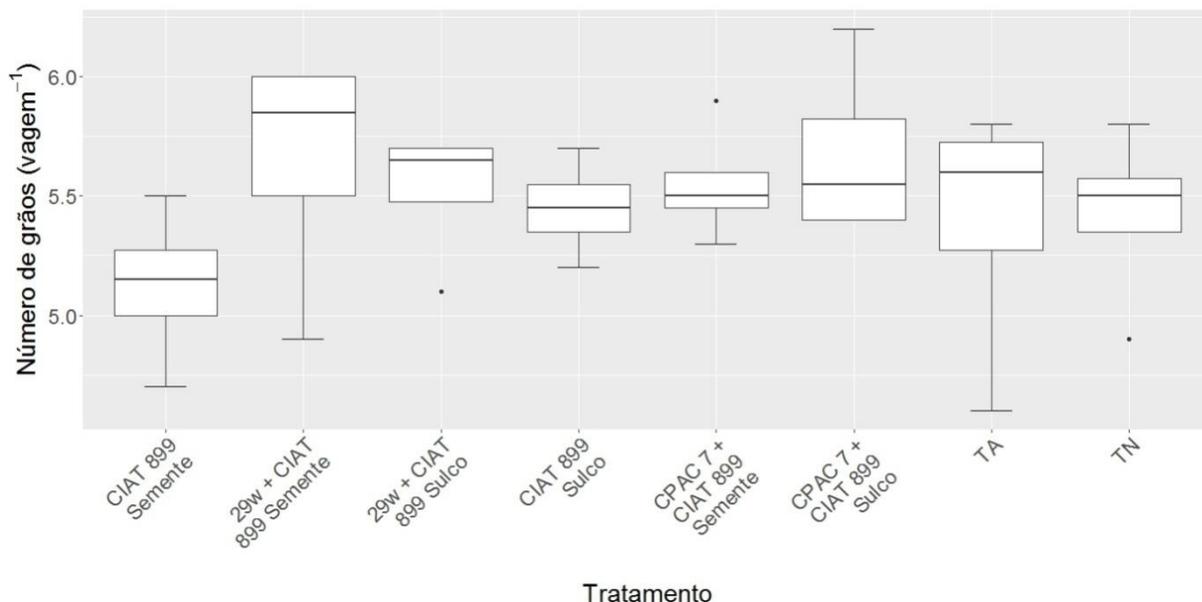


Anexo D3: Gráfico de *boxplot* para massa seca de nódulos (MSNN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 48 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante. Dados correspondem à soma de 5 plantas coletadas em sequência na parcela.

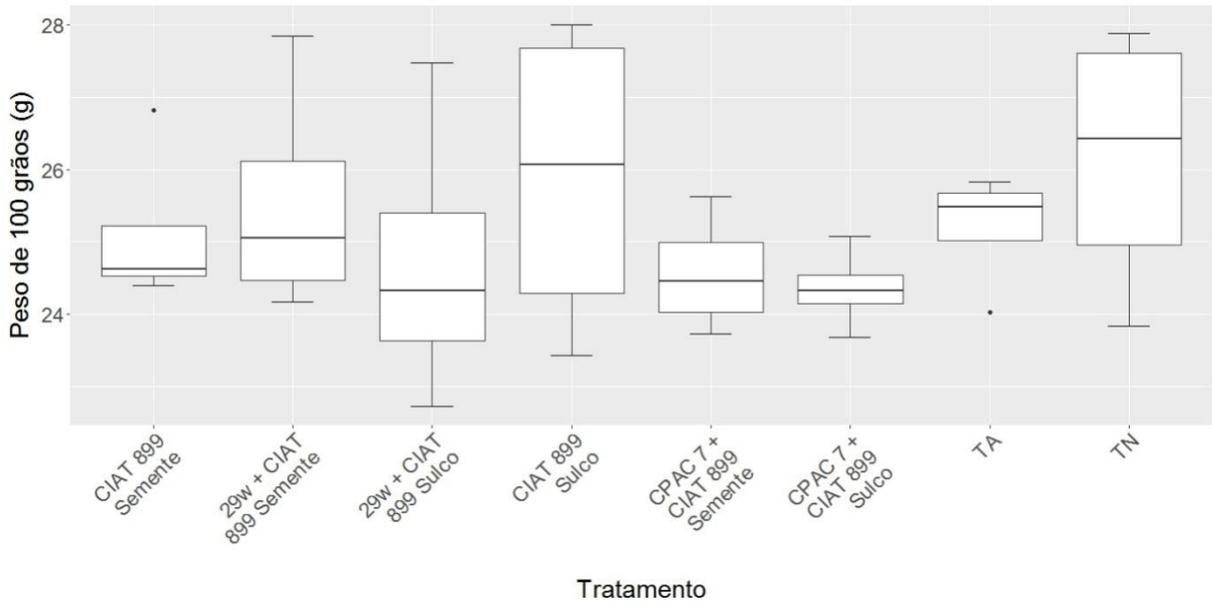
ANEXO E



Anexo E1: Gráfico de *boxplot* para número de vagens por planta (Vagens/planta) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante.



Anexo E2: Gráfico de *boxplot* para número de grãos por vagem (Grãos/vagem) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante.



Anexo E3: Gráfico de *boxplot* para peso de 100 grãos (p100) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, coinoculadas ou não com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Bradyrhizobium*, com inoculação na semente ou na semente e no sulco de plantio após 92 dias de cultivo em campo, em experimento para avaliação dos efeitos das combinações de *Rhizobium-Bradyrhizobium* e as formas de aplicação do inoculante.