

# Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi

Elaine Martins da Costa<sup>(1)</sup>, Rafaela Simão Abrahão Nóbrega<sup>(2)</sup>, Fernanda de Carvalho<sup>(1)</sup>, André Trochmann<sup>(1)</sup>, Linnajara de Vasconcelos Martins Ferreira<sup>(1)</sup> e Fatima Maria de Souza Moreira<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência do Solo, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: elainemartins20@hotmail.com, fernandacarva@hotmail.com, andre\_trochmann@hotmail.com, linnajaravasconcelos@hotmail.com, fmoreira@dcs.ufla.br <sup>(2)</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Rua Rui Barbosa, nº710, Centro, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA. E-mail: rafaela.nobrega@gmail.com

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de promoção do crescimento vegetal e a diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos do Cerrado piauiense. Avaliaram-se 26 estirpes quanto à capacidade de fixar nitrogênio em vida livre, solubilizar fosfatos inorgânicos, produzir ácido-3-indolacético (AIA) na ausência e na presença do aminoácido triptofano (100 mg L<sup>-1</sup>), produzir nódulos e promover o crescimento de feijão-caupi em vasos Leonard. Nenhuma estirpe fixou nitrogênio em vida livre, e 69% foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio in vitro. Na presença de triptofano, todas as estirpes foram capazes de sintetizar o AIA em meio 79, e 80% sintetizaram o AIA em meio DYGS. Apenas quatro estirpes nodularam o feijão-caupi. O sequenciamento do gene 16S rRNA identificou as estirpes nodulíferas como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Bacillus* e *Paenibacillus*. Entre as estirpes não nodulíferas promotoras do crescimento do feijão-caupi, estão os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*.

Termos para indexação: ácido-3-indolacético, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos.

## Plant growth promotion and genetic diversity of bacteria isolated from cowpea nodules

**Abstract** – The objective of this work was to evaluate the potential for plant growth promotion and the genetic diversity of bacteria isolated from nodules of cowpea grown in Cerrado soils in the state of Piauí, Brazil. Twenty-six strains were evaluated as to their ability to fixate free-living nitrogen, solubilize inorganic phosphates, produce indole-3-acetic acid (IAA) in the absence and presence of tryptophan (100 mg L<sup>-1</sup>), produce nodules, and promote cowpea growth in Leonard jars. No strain was able to fixate free-living nitrogen, and 69% were able to solubilize calcium phosphate in vitro. In the presence of tryptophan, all strains were able to synthesize IAA in the 79 medium, and 80% synthesized IAA in the DYGS medium. Only four strains nodulated cowpea. The sequencing of the 16S rRNA gene identified the nodulating strains as belonging to the genera *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, and *Paenibacillus*. Among the non-nodulating strains able to promote cowpea growth are the genera *Bacillus* and *Paenibacillus*.

Index terms: indole-3-acetic acid, biological nitrogen fixation, phosphate solubilization.

### Introdução

No Piauí, o Bioma Cerrado ocupa cerca de 11,5 milhões de hectares e abrange as regiões sul e sudoeste do estado, as quais compõem uma das últimas fronteiras agrícolas do Brasil (Aguiar & Monteiro, 2005). Em razão da ocupação acelerada do Cerrado piauiense para exploração agrícola intensiva, nos últimos anos, a maior preocupação tem sido a interferência dos sistemas de cultivo nos atributos químicos e físicos do solo (Pragana et al., 2012). No entanto, são poucos os trabalhos que avaliam a função e a diversidade dos microrganismos edáficos

que ocorrem nesses agroecossistemas (Zilli et al., 2004; Martins, 2011).

Entre os diversos grupos de microrganismos edáficos, as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) têm papel de destaque, uma vez que contribuem com elevada entrada de nitrogênio no sistema solo-planta, por meio da fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN). Diante disto, têm sido realizados estudos da diversidade dessas bactérias (Zilli et al., 2004; Moreira, 2006; Guimarães et al., 2012), de suas relações ecológicas e da seleção de estirpes eficientes (Lima et al., 2005), com vistas à

produção de inoculantes para culturas de interesse agrônomo e florestal.

O interesse pelo estudo das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) também tem aumentado, em decorrência de sua capacidade de promover o crescimento vegetal por meio da solubilização de fosfatos inorgânicos, da produção de fitohormônio, da fixação de nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em vida livre e da produção de sideróforos, entre outros processos (Kan et al., 2007; Oliveira-Longatti et al., 2013). As RPCPs podem ser de vida livre, associativas ou endofíticas. Estas últimas são capazes de colonizar as raízes das plantas e, no caso das leguminosas, de coabitar com as BFNNL dentro dos nódulos. Vários trabalhos têm relatado o isolamento de bactérias não simbióticas em nódulos desinfestados superficialmente, e os gêneros de ocorrência frequente são: *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Bacillus* e *Paenibacillus* (Kan et al., 2007; Li et al., 2008; Shiraishi et al., 2010; Marra et al., 2012). Possivelmente, essas bactérias penetram no tecido vegetal juntamente com as nodulíferas durante a infecção e a formação dos nódulos (Kan et al., 2007).

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa de grande importância agrícola, por ser uma das principais fontes de proteína vegetal e contribuir de forma significativa para a geração de renda no campo, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Essa espécie é capaz de beneficiar-se amplamente da FBN e tem sido bastante utilizada como planta-isca em estudos de diversidade de BFNNL, em razão da sua capacidade de formar simbiose com diversos gêneros e espécies de bactérias (Moreira, 2006; Guimarães et al., 2012). Além disso, foi relatado o isolamento de bactérias não simbióticas, em nódulos de feijão-caupi, com grande potencial de promoção do crescimento vegetal (Marra et al., 2012).

No Cerrado do sudoeste piauiense, o feijão-caupi tem sido explorado há mais de dez anos, mas há pouca informação sobre a diversidade e a eficiência de BFNNL nativas em simbiose com essa cultura (Zilli et al., 2004; Martins, 2011), e ainda não há conhecimento de pesquisas, nesses agroecossistemas, sobre as RPCPs nativas. Assim, torna-se importante o estudo das BFNNL e das RPCPs da região, para o conhecimento taxonômico e a seleção de estirpes eficientes na FBN ou em outros processos promotores do crescimento vegetal. As estirpes isoladas dessa

região também são adaptadas a condições de estresse, como altas temperaturas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de promoção do crescimento vegetal e a diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos do Cerrado piauiense.

## Material e Métodos

Utilizaram-se 26 estirpes oriundas da Universidade Federal do Piauí (UFPI), as quais foram isoladas por Martins (2011) de nódulos de feijão-caupi ('BR 17-Gurguéia'), utilizado como planta-isca, em experimento com solos do sudoeste piauiense, no polo de produção de Bom Jesus. Destas, 23 foram isoladas de solos de chapadas e três (UFPI B3-9, UFPI B4-9, UFPI B5-1), de solos de várzeas (Martins, 2011). Essas estirpes foram avaliadas quanto à capacidade de: fixar N<sub>2</sub> em vida livre, em meio semissólido (LO) (Dreyfus et al., 1983), tendo-se testado o lactato de sódio e o manitol como fonte de carbono; solubilizar fosfatos de cálcio (P-Ca) em meio NBRIP sólido (Nautiyal, 1999), de alumínio (P-Al) em meio GES sólido e de ferro (P-Fe) em meio GELP sólido (Sylvester-Bradley et al., 1982); e de produzir ácido-3-indolacético (AIA) em meio 79 (Fred & Waksman, 1928), sem corante azul de bromotimol, e em meio DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986).

Para a avaliação da fixação de N<sub>2</sub> em vida livre, as estirpes foram comparadas ao controle positivo BR 5401<sup>T</sup> (*Azorhizobium doebereineriae*) quanto à formação ou não de película na superfície do meio LO.

Na avaliação da capacidade solubilizadora de fosfatos inorgânicos, seguiu-se o mesmo procedimento descrito por Marra et al. (2012). Com base nos índices de solubilização (IS), as estirpes foram classificadas como de baixa (IS < 2 mm), média (2 ≤ IS < 4 mm) e alta (IS > 4 mm) capacidade de solubilização. De acordo com o início da solubilização, as estirpes foram classificadas como: precoces, início da solubilização até o terceiro dia; tardias, início da solubilização a partir do terceiro dia; e não solubilizadoras, não solubilizaram até o décimo quinto dia de avaliação. A estirpe UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.) foi utilizada como controle positivo para solubilização de P-Ca (Marra et al., 2012).

Para a avaliação da produção de AIA, as 26 estirpes e o controle positivo BR 11001<sup>T</sup> (*Azospirillum*

*brasilense*) foram cultivados, em triplicata, por 72 horas, a 28°C, sob agitação de 110 rpm, nos meios DYGS líquido e 79 líquido, sem corante azul de bromotimol. Após o crescimento das estirpes, em ambos os meios de cultura, ajustou-se a densidade ótica (0,5) com acréscimo de solução salina (0,85%). Aliquotas de 500 µL de solução bacteriana foram inoculadas, em triplicata, em frascos que continham 20 mL de cada meio (79 e DYGS), sem triptofano e com 100 mg L<sup>-1</sup> de triptofano. As estirpes foram incubadas por 72 horas, a 28°C, sob agitação de 110 rpm. Após este período, as células foram centrifugadas a 17.792 g por 10 min. Em seguida, foram retirados 3 mL do sobrenadante e adicionados 2 mL do reagente de Salkowski (Sarwar & Kremer, 1995). O material foi reservado por 30 min no escuro, para o desenvolvimento da coloração rósea, indicativa da produção de AIA. A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de AIA foi estimada com uso de curva-padrão previamente obtida com os meios 79 e DYGS esterilizados e com as quantidades conhecidas de AIA (0 a 100 µg mL<sup>-1</sup>). Os experimentos para avaliação da síntese de AIA, na ausência e na presença da suplementação com triptofano, foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, com os tratamentos em arranjo fatorial: 27 estirpes x 2 meios de cultura. Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância, com uso do programa Sisvar, versão 5.3 (Ufla, Lavras, MG). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

De setembro a novembro de 2012, foi conduzido experimento em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Ciência do Solo, da Universidade Federal de Lavras, MG, para avaliação da capacidade das estirpes nodularem e promoverem o crescimento do feijão-caupi ('BR 17-Gurguéia') cultivado em vasos Leonard. Nesse experimento, utilizaram-se: 25 estirpes da UFPI; três controles positivos, constituídos de estirpes atualmente autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como inoculantes para feijão-caupi – INPA 03-11B (*Bradyrhizobium elkani*), UFLA 03-84 (*Bradyrhizobium* sp.) e BR 3267 (*B. japonicum*) –; e dois controles negativos sem inoculação, um com alta concentração de N mineral e o outro com baixa concentração de N mineral. Utilizou-se o delineamento

experimental inteiramente casualizado, com três repetições.

Na parte superior dos vasos Leonard, foi adicionada uma mistura 1:2 de areia (150 cm<sup>3</sup>) e vermiculita (300 cm<sup>3</sup>), e, na inferior, solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) diluída quatro vezes. Nos tratamentos com inoculação e no controle sem inoculação e com baixa concentração de N mineral, utilizou-se solução nutritiva com 5,25 mg L<sup>-1</sup> de N; já no controle sem inoculação e com alta concentração de N mineral foi utilizada solução nutritiva com 52,5 mg L<sup>-1</sup> de N. Após o preparo dos vasos e da solução nutritiva, estes foram autoclavados por 1 hora, à pressão de 1,5 kg cm<sup>-2</sup>, a 121°C.

Antes da semeadura, as sementes de feijão-caupi foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 98% (30 s), hipoclorito de sódio a 2% (2 min) e, em seguida, lavadas em água destilada estéril. Após a desinfestação, quatro sementes pré-germinadas foram adicionadas em cada vaso. Cinco dias após a emergência, realizou-se o desbaste, tendo-se deixado duas plantas por vaso.

Para o preparo dos inoculantes, as estirpes bacterianas foram cultivadas em meio de cultura 79 líquido, sob agitação de 110 rpm, a 28°C. Em seguida, em cada tratamento com inoculação, foi adicionado 1 mL do inoculante na concentração de 1x10<sup>8</sup> células bacterianas mL<sup>-1</sup> sobre as sementes pré-germinadas.

As plantas foram coletadas aos 60 dias após a semeadura, por ocasião do florescimento, para as seguintes avaliações: número de nódulos (NN); produções de massa de matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST); acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA); e eficiência em relação ao controle com alta concentração de N mineral (EFCN). Para a determinação da MSN, da MSPA e da MSR, os nódulos, a parte aérea e as raízes foram acondicionados em sacos de papel e colocados para secar em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C, até atingirem peso constante. O ANPA foi calculado por meio da multiplicação da MSPA (mg) pelo teor de N (%)/100. O teor de N na parte aérea foi determinado pelo método semimicrokjedahl (Sarruge & Haag, 1979). A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada pela seguinte fórmula: EFCN = (MSPA tratamento × 100)/MSPA do tratamento com alta concentração de N mineral. Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância com uso do programa

Sisvar, versão 5.3 (Ufla, Lavras, MG). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade. Os dados de NN e MSN foram transformados em raiz quadrada de  $Y + 0,5$ .

Para o sequenciamento do gene 16S rRNA, foram selecionadas 15 estirpes, das quais 12 se destacaram na promoção do crescimento de feijão-caupi e três estão entre as que produziram maiores quantidades de AIA. A extração de DNA foi realizada com kit de extração do DNA genômico bacteriano "ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep", (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, EUA) após o crescimento das bactérias em meio 79 líquido, a 28°C. A amplificação parcial do gene 16S rRNA foi realizada com volume final da reação de 50 µL. As concentrações usadas foram: 5 µL DNA, 5 µL dNTP (2 mmol L<sup>-1</sup>), 5 µL tampão 10x, 4 µL MgCl<sub>2</sub> (2,5 mmol L<sup>-1</sup>), 1 µL de cada iniciador (10 µmol L<sup>-1</sup>) – 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 0,4 µL Taq DNA polimerase (5U µL<sup>-1</sup>) e água milli-Q estéril. A reação foi realizada em aparelho Eppendorf Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), tendo-se utilizado os seguintes ciclos: desnaturação inicial (94°C por 5 min), 40 ciclos de desnaturação (94°C por 40 s), anelamento (55°C por 40 s), extensão (72°C por 1,5 min) e extensão final (72°C por 7 min). Os produtos de PCR foram enviados ao laboratório da Macrogen Inc. (Macrogen Inc., Seul, Coreia), para sequenciamento e purificação. Avaliou-se a qualidade das seq ncias com uso do programa BioNumerics, versão 7.1 (Applied Maths, Austin, TX, EUA), que, posteriormente, foram submetidas ao programa BLASTn (Bethesda, MD, EUA) (Altschul et al., 1997), para comparação com seq ncias similares depositadas no banco de dados do GenBank, do National Center for Biotechnology Information, sob os números de acesso KF738115 a KF738129.

## Resultados e Discussão

A avaliação da FBN em vida livre evidenciou que nenhuma das 26 estirpes formou película sobre a superfície do meio LO. A estirpe BR 5401<sup>T</sup> (*A. doebereinae*) formou película até o sétimo dia após a inoculação no meio LO com lactato de sódio, indicando condições adequadas para fixa o de N<sub>2</sub> nesse meio.

Nos testes de solubiliza o de fosfatos inorgânicos, observou-se que: 18 estirpes (69%) foram capazes de solubilizar P-Ca in vitro; nenhuma das estirpes foi capaz de solubilizar P-Fe, apesar de todas terem crescido em meio GELP; nenhuma estirpe solubilizou P-Al; e duas estirpes (UFPI CB-6 e UFPI CB10-9) cresceram no meio GES (Tabela 1).

A maioria das estirpes (94%) promoveu baixo  ndice de solubiliza o final em meio NBRIP (Tabela 1). A estirpe UFPI CB1-8 destacou-se das demais, pois foi a única a apresentar média capacidade solubilizadora de P-Ca, semelhantemente   estirpe controle positivo (UFPLA 03-09). Entre as estirpes que solubilizaram o P-Ca, 61% iniciaram a solubiliza o até o terceiro dia

**Tabela 1.** Crescimento e solubiliza o de CaHPO<sub>4</sub>, Al(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> e FePO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O por estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos sob cultivo de feijão-caupi, no sudoeste piauiense.

| Estirpe                    | IS <sup>(1)</sup> do CaHPO <sub>4</sub> |       | CS <sup>(2)</sup> | IS do  |                                      |
|----------------------------|---|-------|-------------------|--|--------------------------------------|
|                            | Inicial                                 | Final |                   | Al(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> | FePO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O |
| UFPI CB-5                  | 1,17 (3)                                | 1,45  | Baixa             | NC <sup>(3)</sup>                                | CNS <sup>(4)</sup>                   |
| UFPI CB-6                  | 1,26 (3)                                | 1,31  | Baixa             | CNS  | CNS                                  |
| UFPI CB1-3                 | CNS                                     | CNS   | -                 | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB1-8                 | 1,25 (6)                                | 2,02  | M dia             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB2-9                 | CNS                                     | CNS   | -                 | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB4-1                 | 1,16 (9)                                | 1,23  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB4-1A                | 1,24 (6)                                | 1,54  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB7-1                 | 1,32 (6)                                | 1,35  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB7-8                 | CNS                                     | CNS   | -                 | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB8-1                 | 1,24 (6)                                | 1,25  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB8-4                 | 1,18 (3)                                | 1,34  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB9-2                 | CNS                                     | CNS   | -                 | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB9-6                 | 1,26 (3)                                | 1,56  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB10-1                | 1,14 (3)                                | 1,44  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB10-2                | 1,11 (6)                                | 1,21  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB10-6B               | CNS                                     | CNS   | -                 | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB10-7                | 1,14 (3)                                | 1,35  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB10-9                | 1,49 (3)                                | 1,66  | Baixa             | CNS  | CNS                                  |
| UFPI CB113-3B              | CNS                                     | CNS   | -                 | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB11-4                | 1,20 (3)                                | 1,42  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB11-6B               | 1,24 (3)                                | 1,42  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB11-7B               | 1,22 (3)                                | 1,41  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI CB11-9A               | 1,25 (3)                                | 1,45  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPI B3-9                  | CNS                                     | CNS   | -                 | NC   | CNS                                  |
| UFPI B4-9                  | CNS                                     | CNS   | -                 | NC   | CNS                                  |
| UFPI B5-1                  | 1,40 (9)                                | 1,48  | Baixa             | NC   | CNS                                  |
| UFPLA 03-09 <sup>(5)</sup> | 2,00 (3)                                | 2,23  | M dia             | NC   | CNS                                  |

<sup>(1)</sup>IS,  ndice de solubiliza o =  $\emptyset$  halo (mm) /  $\emptyset$  colônia (mm); Inicial, leitura feita no dia inicial da solubiliza o; Final, leitura feita após 15 dias de incubac o. <sup>(2)</sup>CS, capacidade de solubiliza o. <sup>(3)</sup>NC, não cresceu. <sup>(4)</sup>CNS, cresceu e não solubilizou. <sup>(5)</sup>*Acinetobacter* sp., controle positivo de solubiliza o de CaHPO<sub>4</sub>.



após a inoculação e, portanto, podem ser consideradas precoces.

Uma parcela relevante da comunidade microbiana do solo, inclusive bactérias e fungos, apresenta capacidade de solubilizar fontes de fósforo de baixa solubilidade (Souchie et al., 2005; Marra et al., 2012), o que acarreta aumento no fornecimento de fósforo disponível para absorção pelas plantas. No presente trabalho, a capacidade solubilizadora de P-Ca das estirpes avaliadas está de acordo com os resultados obtidos em outros estudos com bactérias de nódulos de leguminosas, em que a maioria promoveu baixo índice de solubilização (Hara & Oliveira, 2005; Marra et al., 2012). No entanto, Oliveira-Longatti et al. (2013) relataram a ocorrência de bactérias de nódulos de leguminosas com alta capacidade para solubilização de P-Ca, embora em menor proporção do que a das bactérias com capacidade média e baixa.

Em relação ao P-Fe, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os encontrados por Marra et al. (2012) em meio GELP sólido, mas diferem dos encontrados em meio GELP líquido, o que indica que a capacidade solubilizadora de P-Fe por bactérias pode ser subestimada, a depender do estado físico do meio de cultura. Segundo Marra et al. (2012), o meio líquido favorece maior difusão dos ácidos orgânicos, o que resulta em maior solubilização. Porém, no meio sólido, pode ocorrer menor solubilização sem formação do halo ao redor da colônia (Perez et al., 2007), o que pode ter sido o caso, no presente trabalho, para algumas bactérias.

Quanto ao P-Al, há relatos na literatura da ocorrência de bactérias com capacidade para solubilizar esse tipo de fosfato (Hara & Oliveira, 2005; Oliveira-Longatti et al., 2013). Contudo, no presente trabalho, nenhuma das estirpes avaliadas foi capaz de solubilizar o P-Al.

Em relação à capacidade de síntese de AIA pelas bactérias, houve interação significativa entre as estirpes e os meios de cultivo (79 e DYGS), sem e com triptofano (Tabela 2). Sem triptofano, 20 estirpes (77%) e o controle positivo (BR 11001<sup>T</sup>) apresentaram habilidade para sintetizar o AIA quando inoculados no meio DYGS. No meio 79 sem triptofano, apenas quatro estirpes (UFPI CB1-3, UFPI CB9-2, UFPI B3-9 e UFPI B4-9) e a BR 11001<sup>T</sup> apresentaram essa capacidade, mas produziram quantidades significativamente inferiores do que as obtidas no meio DYGS. Com a adição de triptofano, no meio 79, todas

as estirpes foram capazes de sintetizar o AIA, e 21 estirpes (80%) o sintetizaram no meio DYGS.

No meio 79 com triptofano, todas as estirpes sintetizaram maiores quantidades de AIA do que as obtidas nesse meio sem triptofano (Tabela 2), o que corrobora outros estudos (Anjum et al., 2011; Patil et al., 2011). A maior síntese de AIA com adição de triptofano pode estar relacionada ao fato de esse aminoácido ser um dos precursores mais conhecidos para as vias de biossíntese de AIA em bactérias, apesar da existência de outras vias, cujo precursor ainda é desconhecido (Spaepen et al., 2007).

Entretanto, no meio DYGS, houve pouco efeito da adição de triptofano na síntese de AIA pela maioria das estirpes avaliadas (Tabela 2). Além disso,

**Tabela 2.** Produção de ácido-3-indolacético por estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos sob cultivo de feijão-caupi, no sudoeste piauiense, e cultivadas em meios 79 e DYGS sem e com adição de triptofano<sup>(1)</sup>.

| Estirpes                 | Sem triptofano (µg mL <sup>-1</sup> ) |           | Com triptofano (µg mL <sup>-1</sup> ) |           |
|--------------------------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|
|                          | Meio 79                               | Meio DYGS | Meio 79                               | Meio DYGS |
| UFPI CB-5                | 0,00cB                                | 2,44fA    | 1,90mA                                | 1,96gA    |
| UFPI CB-6                | 0,00cB                                | 3,59dA    | 18,06eA                               | 0,54lB    |
| UFPI CB1-3               | 0,27cB                                | 2,82eA    | 0,68nB                                | 3,73eA    |
| UFPI CB1-8               | 0,00cB                                | 5,80cA    | 2,23lB                                | 9,49bA    |
| UFPI CB2-9               | 0,00cB                                | 12,70aA   | 0,14oB                                | 8,70cA    |
| UFPI CB4-1               | 0,00cB                                | 0,63lA    | 27,03dA                               | 1,73hB    |
| UFPI CB4-1A              | 0,00cB                                | 2,33fA    | 1,82mA                                | 1,35iB    |
| UFPI CB7-1               | 0,00cB                                | 2,80eA    | 2,60jB                                | 3,87eA    |
| UFPI CB7-8               | 0,00cA                                | 0,00mA    | 47,68aA                               | 2,16gB    |
| UFPI CB8-1               | 0,00cB                                | 2,09gA    | 3,31iA                                | 0,28lB    |
| UFPI CB8-4               | 0,00cB                                | 1,59iA    | 3,70iA                                | 0,27lB    |
| UFPI CB9-2               | 0,41bB                                | 1,73hA    | 28,64cA                               | 0,98jB    |
| UFPI CB9-6               | 0,00cB                                | 1,78hA    | 6,95gA                                | 0,89jB    |
| UFPI CB10-1              | 0,00cA                                | 0,00mA    | 3,59iA                                | 0,00mB    |
| UFPI CB10-2              | 0,00cB                                | 1,45iA    | 2,19lA                                | 0,50lB    |
| UFPI CB10-6B             | 0,00cA                                | 0,00mA    | 4,86hA                                | 0,00mB    |
| UFPI CB10-7              | 0,00cB                                | 1,49iA    | 3,88iA                                | 0,00mB    |
| UFPI CB10-9              | 0,00cB                                | 2,31fA    | 35,00bA                               | 2,94fB    |
| UFPI CB113-3B            | 0,00cA                                | 0,00mA    | 0,21oB                                | 1,65hA    |
| UFPI CB11-4              | 0,00cA                                | 0,00mA    | 3,55iA                                | 0,07mB    |
| UFPI CB11-6B             | 0,00cA                                | 0,00mA    | 3,39iA                                | 2,12gB    |
| UFPI CB11-7B             | 0,00cB                                | 1,18jA    | 0,16oA                                | 0,30lA    |
| UFPI CB11-9A             | 0,00cB                                | 1,05jA    | 2,76jB                                | 4,19dA    |
| UFPI B3-9                | 0,60bB                                | 1,35iA    | 3,75iA                                | 3,22eB    |
| UFPI B4-9                | 0,47bB                                | 0,82lA    | 10,21fA                               | 0,00mB    |
| UFPI B5-1                | 0,00cB                                | 1,15jA    | 0,06oA                                | 0,00mA    |
| BR 11001 <sup>T(2)</sup> | 0,86aB                                | 6,14bA    | 5,06hB                                | 14,24aA   |
| CV (%)                   |                                       | 9,09      |                                       | 3,0       |

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>(2)</sup>*Azospirillum brasilense*, controle positivo.

17 estirpes sintetizaram quantidades de AIA, no meio DYGS com triptofano, significativamente inferiores às obtidas no meio 79 com triptofano. Com esses resultados evidenciou-se que, além da concentração de triptofano, as composições dos meios de cultivos utilizados interferem na capacidade de síntese de AIA pelas bactérias avaliadas. De acordo com Patil et al. (2011), vários fatores, como concentração de triptofano, pH e fontes de nutrientes, podem interferir tanto na capacidade de síntese, como na quantidade de AIA produzido em meio de cultura. Assim, é importante a utilização de meios de cultura com diferentes composições para se obter informações mais concretas sobre a capacidade de síntese do AIA,

que poderão estimular (Pedrinho et al., 2010), inibir (Sarwar & Kremer, 1995) ou não exercer nenhum efeito (Li et al., 2008) sobre o crescimento vegetal, a depender das concentrações sintetizadas. Porém, não existe uma faixa de concentração benéfica ou tóxica comum a todas as espécies vegetais. No presente trabalho, as concentrações de AIA sintetizadas foram bastante variáveis entre as estirpes avaliadas, o que pode beneficiar culturas com diferentes exigências.

No experimento conduzido em vasos Leonard, houve efeito significativo dos tratamentos em todas as variáveis avaliadas (Tabela 3). Não se constatou ocorrência de nodulação no controle com baixa concentração de N mineral, o que indica que não

**Tabela 3.** Número de nódulos (NN), massa de matéria seca dos nódulos (MSN) da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência em relação ao controle nitrogenado (EFCN) obtidos em plantas de feijão-caupi, em vasos de Leonard, com inoculação de estirpes isoladas de solos do sudoeste piauiense<sup>(1)</sup>.

| Tratamentos             | NN    | MSN  | ----- (mg por planta) ----- |        |        |       | ANPA | EFCN (%) |
|-------------------------|-------|------|-----------------------------|--------|--------|-------|------|----------|
|                         |       |      | MSPA                        | MSR    | MST    |       |      |          |
| UFPI CB-5               | 0c    | 0e   | 160h                        | 150h   | 310i   | 2f    | 6i   |          |
| UFPI CB-6               | 0c    | 0e   | 157h                        | 202g   | 359i   | 2f    | 6i   |          |
| UFPI CB1-8              | 0c    | 0e   | 235g                        | 243f   | 478h   | 3f    | 9h   |          |
| UFPI CB2-9              | 0c    | 0e   | 163h                        | 195g   | 358i   | 2f    | 6i   |          |
| UFPI CB4-1              | 0c    | 0e   | 245g                        | 211g   | 456h   | 4f    | 9h   |          |
| UFPI CB4-1A             | 0c    | 0e   | 224g                        | 228f   | 452h   | 5f    | 8h   |          |
| UFPI CB7-1              | 0c    | 0e   | 245g                        | 221f   | 466h   | 4f    | 9h   |          |
| UFPI CB7-8              | 0c    | 0e   | 134h                        | 125h   | 259i   | 3f    | 5j   |          |
| UFPI CB8-1              | 0c    | 0e   | 237g                        | 240f   | 477h   | 3f    | 9h   |          |
| UFPI CB8-4              | 0c    | 0e   | 153h                        | 150h   | 303i   | 3f    | 6i   |          |
| UFPI CB9-6              | 0c    | 0e   | 228g                        | 272e   | 500h   | 3f    | 8h   |          |
| UFPI CB10-1             | 0c    | 0e   | 160h                        | 157h   | 317i   | 2f    | 6i   |          |
| UFPI CB10-2             | 0c    | 0e   | 132h                        | 121h   | 253i   | 3f    | 5j   |          |
| UFPI CB10-6B            | 0c    | 0e   | 200g                        | 268e   | 468h   | 4f    | 7h   |          |
| UFPI CB10-7             | 0c    | 0e   | 165h                        | 200g   | 365i   | 4f    | 6i   |          |
| UFPI CB10-9             | 0c    | 0e   | 116h                        | 120h   | 236i   | 3f    | 4j   |          |
| UFPI CB11-3B            | 0c    | 0e   | 210g                        | 281e   | 491h   | 6f    | 8h   |          |
| UFPI CB11-4             | 0c    | 0e   | 226g                        | 222f   | 448h   | 6f    | 8h   |          |
| UFPI CB11-6B            | 0c    | 0e   | 216g                        | 201g   | 417h   | 3f    | 8h   |          |
| UFPI CB11-7B            | 0c    | 0e   | 262g                        | 251f   | 513h   | 4f    | 10h  |          |
| UFPI CB11-9A            | 0c    | 0e   | 151h                        | 170g   | 321i   | 3f    | 6i   |          |
| UFPI CB9-2              | 114b  | 26d  | 219g                        | 201g   | 420h   | 7f    | 8h   |          |
| UFPI CB1-3              | 156a  | 238a | 941d                        | 530d   | 1.471e | 37d   | 36d  |          |
| UFPI B5-1               | 130b  | 180b | 585f                        | 302e   | 887g   | 26e   | 22f  |          |
| UFPI B4-9               | 137b  | 90c  | 748e                        | 291e   | 1.039f | 33d   | 28e  |          |
| UFPI B3-9               | 0c    | 0e   | 328g                        | 303e   | 631h   | 9f    | 12g  |          |
| BR 3267                 | 171a  | 258a | 1.263c                      | 632c   | 1.895c | 54c   | 48c  |          |
| UFLA 03-84              | 118b  | 146b | 1.167c                      | 520d   | 1.687d | 38d   | 44c  |          |
| INPA 03-11B             | 193a  | 180b | 1.841b                      | 744b   | 2.585b | 76b   | 70b  |          |
| Alta concentração de N  | 0c    | 0e   | 2.660a                      | 1.601a | 4.261a | 105a  | 100a |          |
| Baixa concentração de N | 0c    | 0e   | 123h                        | 130h   | 253i   | 2f    | 5j   |          |
| CV (%)                  | 35,16 | 1,41 | 13,20                       | 11,65  | 11,33  | 19,43 | 5,19 |          |

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

houve contaminação no experimento. Entre as 26 estirpes avaliadas, somente quatro nodularam o feijão-caupi (UFPI CB1-3, UFPI CB9-2, UFPI B5-1 e UFPI B4-9). A estirpe UFPI CB1-3 promoveu número de nódulos semelhante aos obtidos com as estirpes inoculantes INPA 03-11B e BR 3267, mas significativamente superior aos das demais estirpes. As estirpes UFPI CB9-2, UFPI B5-1 e UFPI B4-9 proporcionaram número de nódulos semelhantes aos da estirpe inoculante UFLA 03-84.

Quanto à massa de matéria seca de nódulos, as maiores produções foram obtidas com uso das estirpes UFPI CB1-3 e BR 3267, as quais diferiram significativamente das demais (Tabela 3). A estirpe UFPI B5-1 agrupou-se com UFLA 03-84 e INPA 03-11B, e promoveu produção de massa de matéria seca de nódulos superior ao das estirpes UFPI CB9-2 e UFPI B4-9.

Em relação à produção de massa de matéria seca da parte aérea, da raiz e total e ao acúmulo de N na parte aérea, nenhuma estirpe, inclusive as inoculantes do feijão-caupi, foi semelhante ou superior ao controle com alta concentração de N mineral (Tabela 3). A INPA 03-11B destacou-se das outras estirpes inoculantes e das demais avaliadas. As estirpes UFLA 03-84 e BR 3267 promoveram massa de matéria seca da parte aérea semelhantes entre si e superiores às das outras estirpes avaliadas; entretanto, quanto à massa de matéria seca da raiz e total e ao acúmulo de N na parte aérea, a BR 3267 destacou-se em relação à UFLA 03-84. Entre as quatro estirpes nodulíferas, a UFPI CB1-3 promoveu maiores produções de massa de matéria seca da parte aérea, da raiz e total, e o seu comportamento foi semelhante ao da estirpe UFLA 03-84 para massa de matéria seca da raiz.

Quanto ao acúmulo de N na parte aérea, a estirpe UFPI CB1-3 foi semelhante às estirpes UFPI B4-9 e UFLA 03-84 (Tabela 3). A estirpe UFPI CB9-2 proporcionou acúmulo de N na parte aérea semelhante ao das estirpes que não nodularam e ao controle com baixa concentração de N, o que indica simbiose ineficiente dessa estirpe com feijão-caupi.

A nodulação, a produção de massa de matéria seca da parte aérea e o acúmulo de N na parte aérea constituem importantes parâmetros no processo de seleção de estirpes e na recomendação de inoculantes. No presente trabalho, verificou-se que, entre as estirpes avaliadas, a UFPI CB1-3 foi a que apresentou melhor desempenho, com nodulação semelhante à das estirpes BR 3267

e INPA 03-11B, e com acúmulo de N na parte aérea semelhante ao da estirpe UFLA 03-84. No entanto, em relação à produção de massa da matéria seca da parte aérea, a estirpe UFPI CB1-3 apresentou menor desempenho do que as estirpes inoculantes (Tabela 3).

Entre as estirpes não nodulíferas, 12 se destacaram na produção de massa de matéria seca da parte aérea e total, e 16 promoveram massa de matéria seca da raiz superior ao controle com baixa concentração de N (Tabela 3). Porém, quanto ao acúmulo de N na parte aérea, todas as estirpes não nodulíferas apresentaram comportamentos semelhantes ao controle com baixa concentração de N.

Em relação à eficiência, todas as estirpes apresentaram-se inferiores ao controle com alta concentração de N (Tabela 3). A estirpe INPA 03-11B apresentou eficiência superior a dos tratamentos com inoculação, e as estirpes BR 3267 e UFLA 03-84 apresentaram eficiência semelhante entre si e superior a das 26 estirpes avaliadas. Contudo, a maioria das estirpes (88%), tanto simbióticas quanto não simbióticas, apresentou eficiência superior ao controle com baixa concentração de N, mas com desempenhos variáveis.

As estirpes não nodulíferas, assim como a estirpe nodulífera UFPI CB9-2, que promoveram o crescimento do feijão-caupi, possivelmente atuaram em outros processos biológicos diferentes da FBN, uma vez que o acúmulo de N na parte aérea, nos tratamentos de inoculação com essas estirpes, foi semelhante ao controle sem inoculação e com baixa concentração de N. Portanto, se não houvesse limitação de N, o efeito dessas estirpes no crescimento vegetal poderia ter sido maior. Todas essas estirpes mostraram-se positivas quanto à capacidade de síntese de AIA (Tabela 2), o que pode ter contribuído para a promoção do crescimento das plantas, conforme observado por outros autores (Anjum et al., 2011; Patil et al., 2011). Entretanto, as concentrações de AIA sintetizadas pelas estirpes foram bastante variáveis, de 0,30 (UFPI CB11-7B) a 27,03  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (UFPI B4-1), o que é indicação de que algumas estirpes também podem ter atuado em outros processos, os quais não foram avaliados no presente trabalho.

Entre as 15 estirpes selecionadas para o sequenciamento do gene 16S rRNA estão as quatro que nodularam o feijão-caupi. Estas foram identificadas, com 99% de similaridade, como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* (UFPI B5-1), *Rhizobium* (UFPI CB9-2), *Paenibacillus* (UFPI B4-9) e *Bacillus* (UFPI CB1-3) (Tabela 4). Vários trabalhos têm relatado

**Tabela 4.** Identificação das estirpes, simbióticas e não simbióticas, isoladas de nódulos de feijão-caupi, em solos do sudoeste piauiense, com base nas sequências mais similares encontradas no GenBank.

| Estirpe      | Características culturais em meio 79 <sup>(1)</sup> |          |                |                       | NPB   | Sequência mais similar encontrada no GenBank |        |                  |
|--------------|---|----------|----------------|-----------------------|-------|--|--------|------------------|
|              | TC  | pH       | Cor da colônia | Ø <sup>(2)</sup> (mm) |       | Espécie                                      | SI (%) | Número de acesso |
| UFPI CB1-8   | IT  | neutro   | creme          | 1                     | 764   | <i>Bacillus</i> sp.                          | 99     | JX094297.1       |
| UFPI CB2-9   | RP  | neutro   | creme          | <1                    | 963   | <i>Brevibacillus</i> sp.                     | 99     | HQ143578.1       |
| UFPI CB4-1   | RP  | neutro   | creme          | <1                    | 938   | <i>Paenibacillus</i> sp.                     | 98     | EU939688.1       |
| UFPI CB4-1A  | RP  | ácido    | creme          | 1                     | 796   | <i>Bacillus</i> sp.                          | 99     | JQ7266251        |
| UFPI CB7-1   | RP  | alcalino | creme          | <1                    | 901   | <i>Bacillus</i> sp.                          | 99     | JX094297.1       |
| UFPI CB7-8   | RP  | neutro   | creme          | <1                    | 880   | <i>Paenibacillus</i> sp.                     | 98     | EU939688.1       |
| UFPI CB10-9  | RP  | ácido    | amarela        | <1                    | 947   | <i>Enterobacter</i> sp.                      | 100    | HQ122932.1       |
| UFPI CB11-4  | RP  | ácido    | amarela        | 1                     | 648   | <i>Paenibacillus</i> sp.                     | 99     | GU328695.1       |
| UFPI CB11-6B | RP  | ácido    | amarela        | 1                     | 866   | <i>Paenibacillus</i> sp.                     | 99     | GU328695.1       |
| UFPI CB11-7B | RP  | ácido    | amarela        | 2                     | 745   | <i>Paenibacillus</i> sp.                     | 87     | GU328690.1       |
| UFPI B3-9    | RP  | ácido    | amarela        | 1                     | 287   | <i>Paenibacillus</i> sp.                     | 99     | HE577054.1       |
| UFPI CB1-3   | RP  | neutro   | creme          | <1                    | 641   | <i>Bacillus</i> sp.                          | 99     | JQ3085801        |
| UFPI CB9-2   | IT  | neutro   | creme          | <1                    | 1.180 | <i>Rhizobium</i> sp.                         | 99     | AF510383.1       |
| UFPI B4-9    | RP  | alcalino | amarela        | 4                     | 969   | <i>Paenibacillus</i> sp.                     | 99     | GU328690.1       |
| UFPI B5-1    | LT  | alcalino | creme          | 4                     | 939   | <i>Bradyrhizobium</i> sp.                    | 99     | AB220164.1       |

<sup>(1)</sup>Caracterização cultural de acordo com Martins (2011). TC, tempo de crescimento; RP, rápido; IT, intermediário; LT, lento. <sup>(2)</sup>Diâmetro da colônia (mm). NPB, número de pares de bases; SI (%), porcentagem de similaridade no GeneBank.

a identificação de estirpes pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, provenientes de nódulos de feijão-caupi (Guimarães et al., 2012; Jaramillo et al., 2013). Contudo, os gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* geralmente são endofíticos de nódulos, mas não nodulíferos, embora haja relatos da nodulação em feijão-caupi por esses dois gêneros (Marra et al., 2012; Jaramillo et al., 2013). Alguns autores têm sugerido que algumas bactérias endofíticas de nódulos poderão evoluir para bactérias simbióticas por meio da transferência horizontal de genes simbióticos (Li et al., 2008; Shiraishi et al., 2010). Shiraishi et al. (2010) detectaram a ocorrência de nodulação em *Robinia pseudoacacia* por *Pseudomonas* sp. e a presença de genes simbióticos (*NodA*, *nifH* e *nifHD*) nesse gênero. Esses autores constataram, ainda, que o gene *NodA* apresentava alta relação genética entre estirpes de *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium* sp., *Burkholderia* sp. e *Mesorhizobium loti* isoladas do mesmo solo, o que indica uma possível ocorrência de transferência lateral de genes.

Entre as estirpes não nodulíferas, UFPI CB1-8, UFPI CB4-1A e UFPI CB7-1, identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, e UFPI CB4-1, UFPI CB11-4, UFPI CB11-6B, UFPI CB11-7B e UFPI B3-9, pertencentes ao gênero *Paenibacillus* (Tabela 4), apresentaram maior destaque na promoção do crescimento de feijão-caupi. Esses dois gêneros já

foram descritos como promotores do crescimento de plantas (Pedrinho et al., 2010; Rodrigues et al., 2012).

As estirpes não nodulíferas UFPI CB7-8 (*Paenibacillus* sp.), UFPI CB10-9 (*Enterobacter* sp.) e UFPI CB2-9 (*Brevibacillus* sp.) (Tabela 4), apesar de não terem exercido nenhum efeito na produção de massa de matéria seca da parte aérea do feijão-caupi, se destacaram na síntese de AIA e podem ser avaliadas em outras culturas que requeiram maiores concentrações de AIA para estimulação do seu crescimento, conforme verificado por Pedrinho et al. (2010) na cultura do milho.

De maneira geral, observou-se que, nos solos sob cultivo de feijão-caupi, no Cerrado do sudoeste piauiense, há ocorrência de bactérias capazes de realizar um ou mais processos promotores do crescimento vegetal e que apresentam potencial para serem utilizadas como inoculantes em cultivos agrícolas.

## Conclusões

1. A maioria das estirpes avaliadas solubiliza fosfato de cálcio, e, na presença de triptofano, todas sintetizam o ácido-3-indolacético em meio 79.

2. As estirpes UFPI B5-1 (*Bradyrhizobium* sp.), UFPI CB9-2 (*Rhizobium* sp.), UFPI B4-9 (*Paenibacillus* sp.) e UFPI CB1-3 (*Bacillus* sp.) fixam nitrogênio simbioticamente e formam nódulos em feijão-caupi.



3. Doze estirpes não nodulíferas proporcionam aumento da produção de massa de matéria seca da parte aérea do feijão-caupi, e destas, três pertencem ao gênero *Bacillus* e cinco ao gênero *Paenibacillus*.

### Agradecimentos

Ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsas.

### Referências

- AGUIAR, T. de J.A.; MONTEIRO, M. do S.L. Modelo agrícola e desenvolvimento sustentável: a ocupação do Cerrado piauiense. **Ambiente e Sociedade**, v.8, p.1-18, 2005. DOI: 10.1590/S1414-753X2005000200009.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.
- ANJUM, M.A.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; ASHRAF, M. Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings under axenic conditions. **Soil and Environment**, v.30, p.18-26, 2011.
- DREYFUS, B.L.; ELMERICH, C.; DOMMERGUES, Y.R. Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N<sub>2</sub> as the sole nitrogen source. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.711-713, 1983.
- FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 143p.
- GUIMARÃES, A.A.; JARAMILLO, P.M.D.; NÓBREGA, R.S.A.; FLORESTINO, L.A.; SILVA, K.B.; MOREIRA, F.M.S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.6726-6733, 2012. DOI: 10.1128/AEM.01303-12.
- HARA, F.A. dos S.; OLIVEIRA, L.A. de. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.667-672, 2005. DOI: 10.1590/S0100-204X2005000700007.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (California Agricultural Experiment Station. Circular, 347).
- JARAMILLO, P.M.D.; GUIMARÃES, A.A.; FLORESTINO, L.A.; SILVA, K.B.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, v.70, p.397-404, 2013.
- KAN, F.L.; CHEN, Z.Y.; WANG, E.T.; TIAN, C.F.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, v.188, p.103-115, 2007. DOI: 10.1007/s00203-007-0211-3.
- LI, J.H.; WANG, E.T.; CHENA, W.F.; CHENA, W.X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.238-246, 2008. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.08.014.
- LIMA, A.S.; PEREIRA, J.P.A.R.; MOREIRA, F.M. de S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1095-1104, 2005. DOI: 10.1590/S0100-204X2005001100007.
- LONGATTI, S.M. de; MARRA, L.M.; MOREIRA, F.M. de S. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, p.948-959, 2013. DOI: 10.5897/AJMR12.1055.
- MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M. de; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R. de F.; LIMA, J.M. de; MOREIRA, F.M. de S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012. DOI: 10.1007/s11104-012-1157-z.
- MARTINS, R.N.L. **Bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio em solos sob cultivo de feijão-caupi no pólo de produção Bom Jesus – PI**. 2011. 67p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus.
- MOREIRA, F.M.S. Nitrogen-fixing leguminosae-nodulating bacteria. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI Publishing, 2006. p.237-270. DOI: 10.1079/9781845930325.0237.
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999. DOI: 10.1016/S0378-1097(98)00555-2.
- PATIL, N.B.; GAJBHIYE, M.; AHIWALE, S.S.; GUNJAL, A.B.; KAPADNIS, B.P. Optimization of indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from sugarcane. **International Journal of Environmental Sciences**, v.2, p.295-302, 2011.
- PEDRINHO, E.A.N.; GALDIANO JÚNIOR, R.F.; CAMPANHARO, J.C.; ALVES, L.M.C.; LEMOS, E.G. de M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v.69, p.905-911, 2010. DOI: 10.1590/S0006-87052010000400017.
- PEREZ, E.; SULBARÁN, M.; BALL, M.M.; YARZÁBAL, L.A. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing

- bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.2905-2914, 2007. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.06.017.
- PRAGANA, R.B.; RIBEIRO, M.R.; NÓBREGA, J.C.A.; RIBEIRO FILHO, M.R.; COSTA, J.A. da. Qualidade física de Latossolos Amarelos sob plantio direto na região do Cerrado piauiense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, p.1591-1600, 2012. DOI: 10.1590/S0100-06832012000500023.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, v.12, p.16, 1986.
- RODRIGUES, A.C.; ANTUNES, J.E.L.; MEDEIROS, V.V. de; BARROS, B.G. de F.; FIGUEIREDO, M. do V.B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, v.28, p.196-202, 2012.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: Esalq, 1979. 27p.
- SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.172, p.261-269, 1995. DOI: 10.1007/BF00011328.
- SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, p.269-274, 2010. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.04.005.
- SOUCHIE, E.L.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. da. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1149-1152, 2005. DOI: 10.1590/S0100-204X2005001100015.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, v.31, p.425-448, 2007. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. Quantitative survey of phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of grasses and legumes in the Amazon. **Acta Amazonica**, v.12, p.15-22, 1982.
- ZILLI, J.E.; VALISHESKI, R.R.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Assessment of cowpea *Rhizobium* diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.281-287, 2004. DOI:10.1590/S1517-83822004000300002.

---

Recebido em 12 de julho de 2013 e aprovado em 28 de agosto de 2013