



**LINNAJARA DE VASCONCELOS MARTINS FERREIRA**

**COINOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO EM FEIJÃO-FAVA E FEIJÃO-COMUM**

**LAVRAS - MG**

**2017**

**LINNAJARA DE VASCONCELOS MARTINS FERREIRA**

**COINOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM  
FEIJÃO-FAVA E FEIJÃO-COMUM**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos biológicos do Solo, para a obtenção do título de Doutora.

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Orientadora

Dra. Fernanda de Carvalho

Dr. Fernando Monteiro

Coorientadores

**LAVRAS - MG**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Ferreira, Linnajara de Vasconcelos Martins.

Coinoculação de bactérias promotoras de crescimento em feijão-fava e feijão-comum / Linnajara de Vasconcelos Martins Ferreira. – Lavras : UFLA, 2016.

94 p. : il.

Orientadora: Fatima Maria de Souza Moreira.

Coorientadores: Fernanda de Carvalho; Fernando Monteiro.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Bibliografia.

1. *Phaseolus lunatus*. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. *Endophytic bactéria*. I. Moreira, Fatima Maria de Souza. II. Carvalho, Fernanda de. III. Monteiro, Fernando. IV. Título.

**LINNAJARA DE VASCONCELOS MARTINS FERREIRA**

**COINOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM  
FEIJÃO-FAVA E FEIJÃO-COMUM**

***CO-INOCULATION OF GROWTH PROMOTING BACTERIA IN COMMON BEAN  
AND LIMA BEAN***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos biológicos do Solo, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 18 de Novembro de 2016.

Dra. Dâmiany Pádua Oliveira	UFLA
Prof. Dr. Flávio Henrique de Vasconcelos Medeiros	UFLA
Profa. Dra. Rafaela Simão Abraão de Nóbrega	UFRB
Prof. Dr. Sami J. Michereff	UFRPE

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2017**

Aos meus pais, Luiz Martins da Luz e Amélia Leite de Vasconcelos Martins e a meu amado esposo, Flávio Ferreira, pelo apoio incondicional, amor e confiança.

**DEDICO.**

A Deus, pelo seu infinito amor, proteção e por permitir que eu concluísse mais uma etapa da  
minha vida.

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial, ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa e concessão de bolsas de estudo.

À Dra. Fatima Maria de Souza Moreira, por aceitar-me como sua orientanda e pelo ensinamento e paciência.

À Dra. Fernanda de Carvalho, pela orientação e incentivo durante todo o trabalho.

Aos professores, Dr. Fernando Pereira Monteiro e Dr. Flávio Henrique de Vasconcelos Medeiros, pela parceria e orientação.

Aos membros da banca examinadora pela participação e sugestões apresentadas.

A todos os professores, funcionários, amigos e colegas do Departamento de Ciências do Solo pelo apoio, disponibilidade e convivência.

À Marlene e ao Manuel pela paciência e contribuição na execução do trabalho.

Ao laboratório do departamento de fitopatologia pela realização de parte do trabalho.

À bolsista Julia Colombo, obrigada por toda colaboração, pelos momentos compartilhados e pela amizade.

A todos os amigos e colegas do Setor de Microbiologia e Processos Biológicos do Solo pelo apoio e convivência.

Aos meus amigos que, estando longe ou perto, sempre torceram por mim e me apoiaram em todos os momentos.

A toda minha família pelo carinho e incentivo.

Muito Obrigada!

## RESUMO GERAL

Um número significativo de espécies bacterianas, principalmente, aquelas presentes na rizosfera, pode exercer um efeito benéfico sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas. Este grupo de bactérias é conhecido como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs). Foram realizados dois estudos de inoculação e coinoculação de RPCPs nas culturas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-fava (*Phaseolus lunatus*). O primeiro teve como objetivos identificar, geneticamente, isolados de nódulos de feijão-comum, oriundos de solos de pastagem da Amazônia e verificar sua capacidade de nodular e de promover o crescimento do feijoeiro quando inoculadas ou coinoculadas com a CIAT 899 (*Rhizobium tropici*). Foram conduzidos dois experimentos, em casa de vegetação, em condições axênicas, utilizando a cultivar de feijão-comum Talismã. O sequenciamento do gene 16S rRNA mostrou predominância do gênero *Pseudomonas* em 35% das estirpes sequenciadas. Outros gêneros como: *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Xanthomonas* e *Bacillus*, também, foram identificados, demonstrando a elevada diversidade genética de estirpes bacterianas sob sistema de pastagem, com estirpes dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* com potencial para uso como promotoras do crescimento vegetal. A inoculação das sete estirpes com a CIAT 899 promoveu crescimento variado, nas diferentes formas de fornecimento de N. O segundo objetivou-se avaliar o efeito da inoculação por estirpes de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, e *Pseudomonas*, individualmente e em combinação com *Rhizobium tropici*, quanto ao potencial de biocontrole da rizootoniose e de promoção de crescimento em plantas de feijão-comum e feijão-fava. Para isso, foram conduzidos experimentos, em casa de vegetação em condições axênicas, utilizando o feijão-comum cultivar Perola e sementes crioulas de feijão-fava. A primeira etapa se constituiu de experimentos, em que se avaliou o potencial de 14 estirpes no controle da *R. solani* inoculadas, individualmente e em conjunto, com estirpe CIAT 899; a segunda etapa, em experimentos, para avaliação a capacidade dessas 14 estirpes, em prover crescimento vegetal, em três formas de fornecimento de nitrogênio. Os resultados demonstraram que uso de rizobactérias combinadas com *R. tropici* contribuem de forma sinérgica para a promoção de crescimento e controle da rizootoniose em feijão-fava e feijão-comum. O fornecimento de N na forma mineral pode ser substituído pela coinoculação da CIAT 899 com as estirpes promotoras do crescimento vegetal UFLA 02-281, UFLA 02-286, UFLA 02-293 na cultura do feijão-comum. Há incremento na biomassa do feijão-fava quando coinoculada com as estirpes UFLA 02-286, UFLA 02-293, UFLA 04-195, UFLA 02-281 e UFPI B3-9.

**Palavras-chave:** *Phaseolus lunatus*. *Phaseolus vulgaris*. *Rhizoctonia solani*. Bactérias endofíticas. Rizóbio.



## GENERAL ABSTRACT

A great number of bacterial species, especially those present in the rhizosphere, plays an important role on the growth and development of plants. This group of bacteria is often referred to as plant growth promoting rhizobacteria (RPCPs). Herein, two studies of inoculation and co-inoculation of RPCPs in common bean (*Phaseolus vulgaris*) and lima bean (*Phaseolus lunatus*) were carried out. The first study aimed to genetically identify isolates of common bean nodules from Amazonian pasture soils, verifying their ability to nodulate as well as to promote bean growth when inoculated or co-inoculated with CIAT 899 (*Rhizobium tropici*). Two experiments were carried out under axenic conditions at the greenhouse using the Talisman common bean cultivar. The sequencing of the 16S rRNA gene showed predominance of the *Pseudomonas* genus in 35% of the sequenced strains. Other genera such as *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Xanthomonas* and *Bacillus* were also identified, which demonstrates the great genetic diversity of bacterial strains under pasture systems with strains of the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. Those strains have great potential as plant growth promoters. The inoculation of the seven strains with CIAT 899 promoted a wide growth range in the different forms of nitrogen supply. The second study aimed at evaluating the effect of inoculation by strains of *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* – either individually or in combination with *Rhizobium tropici* – considering the potential for rhizoctoniosis biocontrol as well as the growth promotion in common bean and lima bean. Greenhouse experiments were carried out in axenic conditions using the Pérola common bean cultivar and creole seeds of lima bean. In the first stage of the experiment the potential of 14 strains in the control of *R. solani* that was both individually inoculated and inoculated in conjunction with the CIAT 899 was assessed. For the second stage, strains were assessed for their ability to improve plant development in plants growing in three different nitrogen supply media. The results demonstrated that the use of rhizobacteria combined with *R. tropici* synergistically contributes to growth development and control of rhizoctoniosis in lima bean and common bean. The mineral form of nitrogen can be replaced by the co-inoculation of CIAT 899 with the following plant growth promoting strains: UFLA 02-281, UFLA 02-286, UFLA 02-293 in the common bean culture. There was an increase in lima bean biomass when media was co-inoculated with the following strains: UFLA 02-286, UFLA 02-293, UFLA 04-195, UFLA 02-281 and UFPI B3-9.

**Keywords:** *Phaseolus lunatus*. *Phaseolus vulgaris*. *Rhizoctonia solani*. *Endophytic bacteria*. *Rhizobia*.

## LISTA DE FIGURAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 2

- Figura 1 - Influência da densidade do inoculo (DI) de *Rhizoctonia solani* no índice de doença em feijoeiro, em condições de casa-de-vegetação. .... 85
- Figura 2 - Influência da densidade do inoculo (DI) de *Rhizoctonia solani* no índice de doença (ID) em feijão-fava, em condições de casa-de-vegetação..... 86

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

#### ARTIGO 1

- Table 1.** Identification of strains isolated from nodules of common bean grown in soil of pasture land from Amazon based on the most similar sequences found in GenBank (NCBI). ..... 51
- Table 2.** Number of nodules (NN), nodules dry matter (NDM), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), and total dry matter (TDM) of bean plants inoculated with strains isolated from the Amazon pasture land. .... 52
- Table 3.** Number of nodules, nodules dry matter, shoot dry matter, root dry matter, and total dry matter of bean plants inoculated with strains isolated from Amazon pasture land in different forms of N supply. .... 53
- Table 4.** Nodules dry matter (NDM) of bean plants inoculated with strains isolated from Amazon pasture land in different forms of N supply. .... 54
- Table 5.** Genetic identification of Re-isolated strains from nodules of common bean obtained from co-inoculation experiment based on the most similar sequences found in GenBank (NCBI). .... 55

#### ARTIGO 2

- Tabela 1 - Valores médios de altura (H), germinação (GERM), matéria seca da parte aérea (MSPA) da raiz (MSR) e total (MST), índice de doença (ID) e área abaixo da curva da progressão da doença (AACPD) de plantas de feijoeiro cultivadas em vasos com solo autoclavado em casa de vegetação. .... 82
- Tabela 2 - Valores médios de altura (H), germinação (GERM), matéria seca da parte aérea (MSPA) da raiz (MSR) e total (MST), índice de doença (ID) e área abaixo da curva da progressão da doença (AACPD) de plantas de feijão-fava cultivadas em vasos com solo autoclavado em casa de vegetação. .... 83
- Tabela 3 - Valores médios de altura (H) de plantas de feijão-fava cultivadas em vasos com solo autoclavado em casa de vegetação. .... 84
- Tabela 4 - Diâmetro do halo de inibição de *Rhizoctonia solani in vitro* por estirpes bacterianas inoculadas individualmente ou em combinação com *Rhizobium tropici*. .... 87

Tabela 5 - Matéria seca da parte aérea, e total e acúmulo de nitrogênio da parte aérea de feijão-fava inoculadas com estirpes bacterianas em diferentes formas de fornecimento de N cultivado em vaso Leonard.....	88
Tabela 6 - Matéria seca da raiz de feijão-comum inoculadas com estirpes bacterianas em diferentes formas de fornecimento de N cultivado em vaso Leonard. ....	89
Tabela 7 - Número de nódulo, matéria seca de nódulo, da parte aérea, raiz e total e de feijão-comum inoculadas com estirpes bacterianas em diferentes formas de fornecimento de N cultivado em vaso Leonard.....	90
Tabela 8 - Acúmulo de nitrogênio na parte aérea de feijão-comum inoculadas com estirpes bacterianas em diferentes formas de fornecimento de N cultivado em vaso Leonard. ....	92

## ANEXOS

Tabela 1 - Resumo da análise de variância conjunta (Quadrados Médios) referentes a altura (H), germinação (GERM), matéria seca da parte aérea (MSPA) da raiz (MSR) e total (MST), índice de doença (ID) e área abaixo da curva da progressão da doença (AACPD) em plantas de feijão-comum.....	93
Tabela 2. Resumo da análise de variância conjunta (Quadrados Médios) referentes a germinação (GERM), altura (H), matéria seca da parte aérea (MSPA) da raiz (MSR) e total (MST), índice de doença (ID) e área abaixo da curva da progressão da doença (AACPD) em plantas de feijão-fava.....	93
Tabela 3. Resumo da análise de variância (grau de liberdade –GL, soma de quadrado – SQ, quadrado médio – QM) referente a influência da densidade do inoculo de <i>Rhizoctonia solani</i> na severidade rizoctoniose em feijão-comum e feijão-fava, em condições de casa-de-vegetação.....	94

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	14
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1 Fixação biológica de nitrogênio pela simbiose rizóbio – leguminosa .....	16
2.2 Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijoeiro.....	17
2.3 Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão-fava.....	20
2.4 Uso de agentes de rizobactérias para o manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo: o caso da <i>Rhizoctonia solani</i> .....	21
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>SEGUNDA PARTE-ARTIGOS</b> .....	31
<b>ARTIGO 1 - GROWTH PROMOTION OF COMMON BEAN AND GENETIC DIVERSITY OF BACTERIA FROM THE AMAZON PASTURE LAND</b> .....	31
<b>ARTIGO 2 - ESTIRPES BACTERIANAS CONTROLAM RIZOCTONIOSE E PROMOVEM CRESCIMENTO EM FEIJÃO-FAVA E FEIJÃO-COMUM EM COINOCULAÇÃO COM <i>Rhizobium tropici</i></b> .....	56

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A importância social e econômica da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), no Brasil, é evidenciada, principalmente, por representar uma importante fonte proteica, na dieta alimentar da população e pelo contingente de pequenos produtores envolvidos na sua produção. Porém, tem-se observado, nos últimos anos, um crescente interesse de produtores de outras classes do agronegócio, adotando técnicas avançadas, incluindo a irrigação e a colheita mecanizada.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015), na safra 2015/16, o rendimento médio, para cultura do feijoeiro, foi de 1.079 kg ha<sup>-1</sup>. Essa produtividade é considerada, relativamente baixa, quando comparada a dados de experimentos com inoculação em campo (VIEIRA et al., 2005; FERREIRA et al., 2009; RUFINI et al., 2012; FONSECA et al., 2013; OLIVEIRA, 2013).

Norte e Nordeste são as principais regiões produtoras de feijão-fava do Brasil, tendo o Estado da Paraíba maior área cultivada e de melhor produtividade, conforme dados do IBGE (2015). Verifica-se que, nas safras 2010 e 2012, houve uma sensível redução nesses índices, a ponto de comprometer a oferta do produto no mercado e promover a elevação no preço do produto no varejo que atingiu até R\$ 25,00 kg<sup>-1</sup> nas feiras livres, tornando-se inacessível ao consumo da população de baixa renda (BARREIRO NETO et al., 2015).

As baixas produtividades verificadas para essas culturas, no Brasil, têm sido relacionadas ao baixo nível tecnológico empregado pela maioria dos produtores, ataque de pragas e doenças e ao cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em Nitrogênio - N (MERCANTE et al., 1999). O N é o nutriente absorvido em maior quantidade pelas plantas e as suas principais formas assimiláveis são os íons amônio e nitrato, resultantes da decomposição da matéria orgânica do solo e dos fertilizantes nitrogenados, além do N<sub>2</sub> atmosférico. Observa-se que os adubos nitrogenados têm alto custo econômico, variável frequência e magnitude de resposta, além de um custo ambiental adicional nos solos tropicais (PELEGRIN et al., 2009), em que as suas perdas, por lixiviação de nitrato e escoamento superficial, são estimadas em torno de 50% das quantidades aplicadas (STRALIOTTO; TEIXEIRA; MERCANTE, 2002).

A fixação biológica de nitrogênio – FBN, que é mediada por microrganismos chamados coletivamente de rizóbios, é considerada um dos mais importantes processos microbianos no ambiente e um dos principais contribuintes para a disponibilidade de

nitrogênio em culturas agrícolas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No Brasil há três estirpes de *Rhizobium tropici* autorizadas como inoculantes comerciais para cultura do feijoeiro: CIAT 899 (= BR 322 = SEMIA 4077), PRF 81 (=BR 520 = SEMIA 4080) e H12 (= SEMIA 4088), ao passo que, para o feijão-fava, ainda, não se tem inoculantes aprovados para essa cultura.

O feijoeiro e feijão-fava são consideradas culturas suscetíveis a numerosas doenças, dentre elas, aquelas provocadas pelos fungos habitantes de solo. Muitas dessas doenças causam prejuízos consideráveis e são de difícil manejo (BARBOSA; GONZAGA 2014). Nesse sentido, têm sido propostos métodos alternativos, com o uso de microrganismos como agentes de controle biológico e têm sido alvo de estudo (SENTHILKUMAR; GOVINDASAMY, 2007; STAJKOVIC et al., 2011; MARTINS, 2013). Dentre os microrganismos, estão as rizobactérias, conhecidas como PGPR -Plant Growth Promoting Rhizobacteria. As PGPRs podem atuar não só estabelecendo mecanismos, no controle a patógenos, como também podem promover aumento da nodulação (EGAMBERDIEVA et al., 2010; VALVERDE et al., 2006; YADEGARI et al., 2008).

Na busca de isolados promissores, quanto à promoção de crescimento vegetal, a região Amazônica mostra-se de grande interesse por ser conhecida em todo o mundo pela sua alta diversidade de espécies vegetais e animais. Esta região, ainda, destaca-se pela alta diversidade de organismos que habitam o solo incluindo os microrganismos. Estudos têm demonstrado que estirpes de bactérias isoladas dessa região apresentam potencial, para atuarem como promotoras do crescimento vegetal, seja pelo processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; FERREIRA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010; FONSECA et al., 2013) quanto por outros, tais como: inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos, FBN de vida livre, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácidos indolacético (SILVA et al., 2012; OLIVEIRA-LONGATTI; MARRA; MOREIRA, 2013; OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014) e indução de tolerância à acidez do solo e outros estresses abióticos (SOARES et al., 2014; FERREIRA et al., 2012).

Com isso, estudos que possibilitem o controle de doenças e, ao mesmo tempo, promovam crescimento da planta, por meio da inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio ou a combinação com PGPRs, torna-se de extrema importância para o aumento do rendimento de grão do feijoeiro e feijão-fava.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fixação biológica de nitrogênio pela simbiose rizóbio – leguminosa

Os organismos com habilidade para reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia são considerados diazotróficos. As bactérias que formam associações simbióticas com hospedeiros específicos e fixam N, formando estruturas especializadas nos hospedeiros, são chamadas diazotróficos simbióticos. Entretanto, as bactérias que podem fixar nitrogênio sem formação de estruturas específicas e utilizar esse N fixado apenas para o próprio crescimento, ou fornecer parte do N fixado para as plantas, são chamadas diazotróficos de vida livre e associativas, respectivamente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SAWADA; KWYKENDALL; YOUNG, 2003).

A FBN, no feijoeiro e no feijão-fava, assim como em outras leguminosas da família *Leguminosae*, é um processo diazotrófico simbiótico complexo que envolve várias etapas, incluindo modificações fisiológicas e morfológicas, tanto na planta hospedeira como na bactéria. A simbiose bactéria-planta começa pela produção de alguns compostos exsudados pela planta hospedeira, como aminoácidos, açúcares, flavonoides, isoflavonoides e betaínas, cuja função é promover a quimiotaxia, atraindo o rizóbio e favorecendo a adesão da bactéria à superfície dos pelos radiculares, desencadeando a expressão coordenada, por meio de genes conhecidos como *nod*, que são essenciais para a infecção da raiz do hospedeiro e ao estabelecimento do nódulo (TAÍZ; ZIEGER, 2004; DARDANELL et al., 2008).

As bactérias diferenciam-se em bacteroides nos nódulos da planta hospedeira, atuando por meio de um complexo enzimático da nitrogenase, formado por duas unidades proteicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), as quais são responsáveis pela redução do nitrogênio atmosférico à amônia (NH<sub>3</sub>) à custa de energia da planta (MOREIRA; SIQUEIRA 2006).

No último passo do estabelecimento da simbiose, proteínas vegetais mais conhecidas como leg-hemoglobina e enzimas são envolvidas no processo de assimilação do nitrogênio fixado como a glutamina sintase e glutamato sintase (MOREIRA; SIQUEIRA 2006). A leg-hemoglobina tem a capacidade de suprir as bactérias com baixas concentrações de oxigênio, para geração de ATP, necessários ao processo de FBN, visto, que, em concentrações elevadas inativa a enzima nitrogenase.

O processo da FBN, por meio da simbiose bactéria-planta, traz diversos benefícios para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Suas principais vantagens são o aumento da



produção vegetal, a recuperação de áreas degradadas, o incremento da fertilidade e da matéria orgânica do solo (HOEFSLOOT et al., 2005; SOARES et al., 2006; ZILLI et al., 2006). O principal benefício desse processo está associado à redução no uso de fertilizantes nitrogenados industrializados.

O uso de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio, previamente selecionadas em leguminosas de grãos, tem sido responsável por expressivas economias, no custo de produção agrícola, por meio da redução do uso de adubos nitrogenados. No Brasil, o melhor exemplo de utilização desse processo é a cultura da soja, na qual a adubação química nitrogenada é, totalmente, substituída pela utilização de inoculantes, contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Segundo Moreira (2010), o uso de inoculantes, para essa cultura, em 2006, gerou para o país uma economia de cerca de US\$ 3,3 bilhões, considerando uma área de 21 milhões de hectares, na qual se produziram 57 milhões de toneladas de grãos.

Apesar da maior parte dos inoculantes comercializados serem para cultura da soja, existem outras culturas de importância econômica que são capazes de se beneficiarem desse processo como *Vigna unguiculata* (SOARES et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; FERREIRA et al., 2013), *Phaseolus vulgaris* (VIEIRA et al., 2005; FONSECA et al., 2013; OLIVEIRA, 2013), *Phaseolus lunatus* L. (ANTUNES et al., 2011), *Cajanus cajan* (RUFINE; OLIVEIRA, 2014; FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003), o que torna imprescindível a difusão dessa biotecnologia para outras culturas não só pela seleção de estirpes eficientes, mas também de atividades que levem esse conhecimento para os técnicos, produtores e escolas.

Nesse sentido, Vilas Bôas, Nascimento Junior e Moreira (2014) elaboraram um curso de formação continuada, para professores de biologia do ensino Médio, da rede pública de Lavras e região, por meio do Laboratório de Microbiologia e processos Biológicos do Solo da Universidade Federal de Lavras. Esse curso teve como objetivo a formação de professores para trabalharem o conteúdo específico de Microbiologia de Solo. No Ensino Médio, adotou-se uma metodologia que englobava diferentes tipos de atividades práticas. Trabalhos nessa área, ainda, são pouco desenvolvidos, mas são necessários para que a tecnologia da inoculação seja efetivada.

## **2.2 Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijoeiro**

Atualmente, as estirpes autorizadas como inoculantes comerciais para o feijoeiro, no Brasil, contêm três isolados de *R. tropici*: CIAT 899T (= BR 322 = SEMIA 4077), PRF 81 (=BR 520 = SEMIA 4080) e H12 (= SEMIA 4088). No entanto, essa cultura é considerada

uma planta promíscua, com capacidade de estabelecer simbiose com vários gêneros de bactérias. Apesar de sua alta capacidade de nodulação, nem todos os gêneros são capazes de fornecer nitrogênio de forma satisfatória à cultura (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

São descritos, atualmente, vários gêneros e espécies de bactérias nodulíferas para a cultura do feijoeiro: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (JORDAN, 1984), *R. tropici* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991), *R. etli* bvs. *mimosae* e *phaseoli* (SEGOVIA; YOUNG; MARTINEZ-ROMERO, 1993; WANG et al., 1999), *R. gallicum* bvs. *gallicum* e *phaseoli* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997), *R. giardinii* bvs. *giardinii* e *phaseoli* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997), *R. mongolense* (BERKUN et al., 1998), *R. yanglingense* (TAN et al., 2001), *R. (Sinorhizobium) fredii* (SCHOLLA; ELKAN, 1984), *Sinorhizobium americanum* (TOLEDO; LLORET; MARTINEZ-ROMERO, 2003) *R. (Mesorhizobium) loti* (JORDAN, 1984) e *R. (Mesorhizobium) huahuii* (CHEN et al., 1991), *Azorhizobium doebereineriae* (MOREIRA et al., 2006) e *Burkholderia* sp. (FERREIRA et al., 2012)

Apesar dos trabalhos apontarem melhores respostas entre as bactérias nodulíferas do gênero *Rhizobium*, existem irregularidades, quanto à resposta da inoculação, em virtude da instabilidade genética do simbionte. Essa instabilidade genética é decorrente de frequências elevadas de rearranjos genômicos e/ou deleções plasmidiais, em razão dos genes que controlam a nodulação, à especificidade hospedeira e à FBN estarem localizados num plasmídio (BANFALVI et al., 1981; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Em *Bradyrhizobium*, a informação genética para a simbiose encontra-se no cromossomo, o que torna as espécies desse gênero mais estáveis, podendo explicar, dentre outros fatores, o êxito da inoculação em soja.

No entanto, as estirpes de rizóbios, para poder expressar sua capacidade de fixação de N nas plantas, dependem tanto de fatores intrínsecos do processo de simbiose bactéria-leguminosa quanto de fatores ambientais os quais afetam a sobrevivência da planta e da bactéria (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; FONSECA et al., 2013; MORAES et al., 2010). Dentre os fatores mais relevantes, destacam-se a competição do rizóbio com estirpes nativas do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; ARAÚJO et al., 2007) e condições ambientais adversas, como alta temperatura (THIES; SINGLETON; BOHLOOL, 1991; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SILVA et al., 2007) e acidez do solo (ALI et al., 2009; RODRIGUES; LARANJO; OLIVEIRA, 2006; RUFINI et al., 2012; SOARES et al., 2014).

Pode-se verificar que o cultivo do feijoeiro, no Brasil, é, frequentemente, realizado em solos ácidos e de baixa fertilidade, condições que agem, negativamente, sobre a capacidade do

feijoeiro de fixar nitrogênio atmosférico quando associado com BFNNL. Verifica-se que a toxicidade por alumínio (RUFINI et al., 2012) e a deficiência de potássio (GUALTER et al., 2008), fósforo (SILVA et al., 2010) e micronutrientes (KUSDRA, 2003; GUALTER et al., 2008; LEITE et al., 2009) estão entre os principais fatores edáficos que influenciam a FBN.

Vários trabalhos têm sido realizados, avaliando novas estirpes, para a cultura do feijoeiro (HUNGRIA et al., 2000; MELLONI et al., 2006; SOARES et al., 2006; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007). No entanto, a procura por estirpes eficientes, na FBN e mais competitivas que as estirpes nativas do solo, continua sendo objeto de pesquisa. Nesse sentido, analisando a diversidade à eficiência de bactérias que nodulam leguminosas (BNL), em diferentes usos da terra (Capoeira nova, capoeira velha, floresta primária, pastagem, agricultura e agrofloresta), na região da Amazonia Ocidental, usando como planta isca o feijoeiro, verificou-se que o feijoeiro capturou BNL em 58% das unidades amostradas (BARBERI, 2007). Neste estudo, o único sistema de uso da terra que se diferenciou dos demais, em relação as variáveis biológicas, foi a pastagem, provavelmente, sua diferença entre os atributos edáficos. No total, encontraram-se 930 isolados, que foram agrupados em 40 grupos culturais diferenciados por suas características fenotípicas. Verificou-se, também, a predominância de isolados de crescimento rápido e que acidificam o meio em todos os sistemas de uso da terra. Foram autenticados 260 isolados e 80% apresentaram nodulação. Ocorreu predominância de isolados com alta similaridade genética com espécies dos gêneros *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus*.

Realizando-se seleção de estirpes de rizóbios, nas condições dos Cerrados, em plantas de feijão-comum, submetendo a condições de temperaturas ótimas (27/21°C, dia/noite) e elevadas (37/21°C, dia/noite), em casa de vegetação, verificaram-se que as sequências 16S rRNA das estirpes mais eficientes e competitivas foram, geneticamente semelhantes à *Rhizobium tropici*. (MOSTASSO et al., 2002). Este estudo sugere que espécies deveriam ser apuradas, em condições de solos ácidos e, nas temperaturas elevadas do Brasil e da África, destacando a estirpe H12 com potencialidades para ser incluída nos inoculantes. Hungria, Campo e Mendes (2003), avaliando essa mesma estirpe, em um Latossolo do Estado do Paraná, concluíram que ela mostrou-se eficiente e competitiva, com elevado potencial de rendimento.

Fonseca et al. (2013), com o objetivo de verificar a resposta de cultivares de feijoeiro à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio, conduziram dois experimentos de campo, na safra de inverno 2010, em Patos de Minas e Uberaba, MG. Os autores observaram que a estirpe CIAT 899 proporciona maior número de vagens e maior massa de grãos que a

estirpe UFLA 04-173, e, em Uberaba, também, proporciona maior rendimento de grãos. Quando a inoculação é realizada com a estirpe UFLA 04-173, as cultivares diferem quanto ao teor foliar de N. As cultivares Madrepérola, Ouro Negro e Ouro Vermelho apresentam maior número de nódulos e maior massa seca de parte aérea, além de maior produtividade em Patos de Minas.

Ferreira et al. (2009), ao avaliarem a resposta da cultura do feijoeiro cultivar ‘Talismã’ à inoculação com quatro estirpes isoladas da região da Amazônia, UFLA 02-100, UFLA 02-127, UFLA 02-86 e UFLA 02-68, comparadas à estirpe CIAT-899, autorizada pelo MAPA como inoculante, para cultura do feijoeiro, verificaram que a estirpe UFLA 02-68 se destacou e promoveu rendimento de grãos semelhantes ao da testemunha com 80 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, superando as demais estirpes, inclusive, a CIAT 889. Soares et al. (2006), testando as mesmas estirpes, na região de Perdões, MG, encontraram resultados de rendimento de grãos, para as estirpes UFLA 02-100 e UFLA 02-127, equivalentes à testemunha nitrogenada, enquanto a estirpe UFLA 02-68 não diferiu da testemunha sem adubação nitrogenada. Segundo o trabalho de Oliveira (2013), no que diz respeito ao teor e acúmulo de N nos grãos e ao rendimento de grãos, as estirpes inoculadas UFLA 02-127, UFLA 04-173 e CIAT 899<sup>T</sup> mostraram desempenho equivalente ao da adubação com 80 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Rufini et al. (2012), avaliando a eficiência simbiótica de estirpes de *Rhizobium*, em solo com e sem calagem, verificaram que as estirpes testadas em campo (UFLA 02-100, UFLA 02-68, UFLA 04-195, UFLA 04-202 e CIAT 899) e as populações nativas de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas foram eficientes em fornecer nitrogênio para a cultura do feijoeiro.

Todos esses resultados deixam claro que a fixação de nitrogênio pode ser uma alternativa viável, para substituição total de fertilizantes nitrogenados, na cultura do feijoeiro.

### **2.3 Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão-fava**

O feijão-fava é uma importante espécie, do gênero *Phaseolus*, para consumo humano, nas regiões tropicais e suas sementes são importantes fontes de proteínas para as populações da América do Sul, África e México. Além disso, como pertencente à família das leguminosas, o feijão-fava apresenta a capacidade de participar do processo de FBN. Entretanto, os estudos sobre a simbiose e a bactéria associada ao feijão-fava são escassos.

O centro de diversidade do feijão-fava é o Peru e, neste país, são encontrados alguns estudos de caracterização da diversidade dos rizóbios moduladores de feijão-fava (ORMENÕ-ORRILLO et al., 2006).

Os estudos existentes indicam que o feijão-fava é nodulado por uma grande diversidade como os gêneros de bactérias: *Rhizobium*, (TRIPLETT et al., 1981; ORMENÕ et al., 2007; SANTOS, 2008), *Bradyrhizobium* (THIES; SINGLETON; BOHLOOL, 1991; ORMENÕ-ORRILLO et al. 2006) e *Mesorhizobium* (SANTOS, 2008).

Do ponto de vista da FBN, no Brasil, alguns estudos encontraram isolados com alta eficiência simbiótica e capacidade fixadora em feijão-fava o que indica que há perspectivas de seleção de bactérias eficientes para uso em inoculantes. Por outro lado, há necessidade de ampliar os estudos sobre diversidade, caracterização e avaliação agrônômica das bactérias fixadoras associadas ao feijão-fava, principalmente, no Brasil.

Utilizando os métodos morfológicos e fisiológicos, para a caracterização dos isolados, obtiveram-se 79 isolados de rizóbios com diferentes características fenotípicas, indicando que há uma diversidade morfológica entre rizóbios nativos noduladores de feijão-fava nos solos da região meio norte (SANTOS, 2008).

Avaliando a eficiência simbiótica de rizóbios nativos de duas regiões do Piauí produtoras de feijão-fava, foi possível discriminar e selecionar isolados eficientes na nodulação em feijão-fava. Oito isolados apresentaram bom desempenho, no fornecimento de N às plantas, podendo ser recomendados para testes de eficiência agrônômica (ANTUNES et al., 2011).

Estirpes de *Bradyrhizobium* INPA 54B e INPA 86A se destacaram, na produção de matéria seca da parte aérea de feijão-fava (COSTA, 2016) e apresentam grande potencial para serem utilizadas como inoculantes. Os autores identificaram que a estirpe INPA 54B pertence a uma nova espécie, para qual o nome, *Bradyrhizobium forestalis*, foi proposto.

#### **2.4 Uso de agentes de rizobactérias para o manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo: o caso da *Rhizoctonia solani***

A cultura do feijoeiro e do feijão-fava é suscetível a numerosas doenças, podendo ser uns dos fatores que levam à diminuição da produtividade do feijão no Brasil (CUNHA; TEXEIRA; VIEIRA, 2005). Entre elas estão as causadas pelo fungo *R. solani*, capaz de causar distintas doenças dependendo da região de cultivo (GHINI; ZARONI, 2001; SOUZA; RAMALHO; NUNES, 2005). Entre as doenças, causadas pela *R. solani*, destaca-se o tombamento de plântulas, também, conhecido como *damping-off* e a mela ou murcha-da-teia-micélica.

Os métodos tradicionais de controle, como uso de variedades com resistentes, fungicidas e cobertura morta não garantem controle satisfatório da doença e outros métodos

devem ser combinados aos existentes para manter a doença abaixo do limiar de dano econômico. Segundo alguns autores (SINGH et al., 2007; ASSUNÇÃO et al., 2011) a seleção de genótipos de feijoeiro e do feijão-fava, visando à busca de fontes de resistência genética, para o controle do tombamento e mela, ainda, constitui um desafio, não havendo ainda cultivares comerciais brasileiras disponíveis no mercado com esse atributo. Deve-se levar em consideração, também, que o aumento com preocupações ambientais e com a saúde, em decorrência da utilização de fungicidas, faz com que se busquem formas alternativas de controle.

Por conta disso, a busca por métodos alternativos com o uso de bactérias como agentes de controle biológico torna-se essencial, para a o aumento do rendimento de grão, para essas culturas. O controle biológico de doenças de plantas tem sido usado desde a mais remota antiguidade, ainda que de forma empírica, conforme Cook e Baker (1983).

Ao se usar um microrganismo como agente de biocontrole, em algumas situações, é possível que ocorra o controle biológico (TUZUN; KLOEPPER, 1995), por antagonismo direto exercido pelo agente de biocontrole sobre o fitopatógeno, com envolvimento dos conhecidos mecanismos de antagonismo: produção de substâncias antimicrobianas, parasitismo direto, competição por nutrientes e por nichos ecológicos (KLOEPPER et al., 1993). Dentre os organismos capazes de interagir com plantas e agir como agentes de biocontrole, estão as rizobactérias, conhecidas como PGPR. Estas, também, podem atuar, em antagonismo direto e estabelecendo mecanismos de indução de resistência na planta a patógenos. (ROMEIRO, 2007).

Alguns isolados de PGPRs aumentam a nodulação e fixação de nitrogênio, por afetar a interação entre a leguminosa e rizóbio. Na literatura, são relatados alguns trabalhos que indicam aumento de produção, nodulação e resistência a doenças da planta, quando inoculados com PGPRs em comparação somente à inoculação com estirpes de BFN (EGAMBERDIEVA et al., 2010; VALVERDE et al., 2006; YADEGARI et al., 2008).

Estudo realizado, na cultura do feijoeiro com inoculação de isolados de *Bacillus* em associação com *Rhizobium*, demonstrou influência positiva, no peso seco de nódulos e, ainda, promoveu o dobro de número de nódulo, quando comparado ao *Rhizobium*, exclusivamente (STAJKOVIC et al., 2011). Realizada a inoculação, também, na cultura do feijoeiro com *Rhizobium leguminosarum* combinado a dois isolados de *Bacillus* spp., Elkoca, Turan e Donmez (2010) verificaram incremento de 6,6% na produção de grãos.

Com o objetivo de avaliar dois isolados de *Bacillus* (629 e UFLA 285), que estão em processo de formulação e testar sua eficiência de controle de tombamento e mela, causados

por *R. solani*, em condições de campo no estado de Minas Gerais e Roraima, Martins (2013) verificou que os tratamentos inoculados com a UFLA 285, combinados ou não ao fungicida, proporcionaram aumentos no peso seco de nódulos equivalente a 296% e 270%, respectivamente, quando comparado com a testemunha. O tratamento inoculado com o isolado 629 garantiu redução na severidade da doença até os 40 DAP (dias após o plantio), enquanto UFLA 285 garantiu controle apenas na primeira avaliação, aos 25 DAP. A inoculação com a 629, sem o tratamento com fungicida, garantiu o controle da doença e não interferiu na nodulação, representando, portanto, uma importante ferramenta, para aumentar a produção do feijoeiro.

No entanto, na literatura, não é relatada introdução de PGPR, no controle da rizoctoniose, para a cultura do feijão-fava. Trabalhos com a seleção de genótipos vêm sendo desenvolvidos em feijão-fava, mas poucos avanços foram relatados na identificação de fontes de resistência a este patógeno (INFANTINO et al., 2006).

## REFERÊNCIAS

- ALI, S. F. et al. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. **Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Nottinghamshire, v. 40, n. 1, p. 13-18, Jan. 2009.
- ALMEIDA, A. L. G. et al. Produtividade do feijão-caupi cv. BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 364-336, 2010.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp.nov. and *Rhizobium giardinii* sp.nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, n. 4, p. 996-1006, Oct. 1997.
- ANTUNES, J. E. L. et al. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, p. 751-757, 2011.
- ARAÚJO, F. F. et al. Fixação biológica de N<sub>2</sub> no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 4, p. 535-540, 2007.
- ASSUNÇÃO, I. P. et al. Reaction of faba bean genotypes to *Rhizoctonia solani* and resistance stability. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 492-497, 2011.
- BANFALVI, Z. et al. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 184, n. 2, p. 318-325, 1981.
- BARBERI, A. **Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental**. 2007. 121 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. (Ed.). **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2014. (Documentos, 272).
- BARREIRO NETO, M. et al. Características morfológicas e produtivas em acessos de feijão-fava consorciados. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 9, n. 3, p. 23-27, jun. 2015.
- BERKUN, P. VAN. et al. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and from nitrogen fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) ledebour. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, n. 1, p. 13-22, Jan. 1998.
- CHEN, W. X. et al. *Rhizobium huahuii* sp.nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 275-280, Apr. 1991.



COOK, R. J.; BAKER, K. F. E. **The nature and practice of biological control of plant diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1983.

COSTA, E. M. da. **New *Bradyrhizobium* species from soils of different Brazilian regions: taxonomy and symbiotic efficiency**. 2016. 224 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

COSTA, E. M. et al. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 2011.

CUNHA, J. P. A. R. da; TEXEIRA, M. M.; VIEIRA, R. F. Avaliação de pontas de pulverização hidráulicas na aplicação de fungicida em feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1069-1074, set./out. 2005.

DARDANELL, M. S. et al. Effect of *Azospirillum* brasilense coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 11, p. 2713–2721, Nov. 2008.

EGAMBERDIEVA, D. et al. Coinoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). **European Journal of Soil Biology**, Mountroge, v. 46, n. 3, p. 269-272, May 2010.

ELKOCA, E.; TURAN, M.; DONMEZ, M. F. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* on nodulation, nutrient uptake, yield and parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 33, n. 14, p. 2104-2119, Oct. 2010.

FERNANDES, F. M.; FERNANDES, R. P. P.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 835-842, jul. 2003.

FERREIRA, L. V. M. F. et al. Biological nitrogen fixation in production of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, family farming in Piauí, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 5, n. 4, p. 153-160, 2013.

FERREIRA, P. A. A. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, v. 1, p. 85-95, jan. 2012.

FERREIRA, P. A. A. et al. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, out. 2009.

FONSECA, G. G. et al. Growth and accumulation of n in bean plant cultivars inoculated with rhizobium strains. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 56, n. 56, p. 83-84, 2013.

GHINI, R.; ZARONI, M. M. H. Relação entre coberturas vegetais e supressividade de solos a *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 10-15, 2001.

GUALTER, R. M. R. et al. Inoculação e adubação mineral em feijão-caupi: efeitos na nodulação, crescimento e produtividade. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 4, p. 469-474, 2008.

HOEFSLOOT, G. et al. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown south african sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, The Hague, v. 277, n. 1/2, p. 85-96, Dec. 2005.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 88-93, Dec. 2003.

HUNGRIA, M. et al. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11/12, p. 1515-1528, Oct. 2000.

INFANTINO, A. et al. Screening techniques and sources of resistance to root diseases in cool season food legumes. **Euphytica**, London, v. 147, n. 1/2, p. 201-221, Jan. 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agropecuária**. Rio de Janeiro, 2015. v. 18, n. 1, p. 6.

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiaceae. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 234-244.

KLOEPPER J. W. Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. In: METTING, F. B. J.; DEKKER, M. (Ed.). **Soil microbial ecology applications in agricultural and environmental management**. New York: Wiley, 1993. p. 255-274.

KUSDRA, J. F. Nodulação do feijoeiro e fixação biológica do nitrogênio em resposta à microbiolização das sementes e à aplicação de micronutrientes. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 4, n. 1/2, p. 81-96, 2003.

LACERDA, A. M. et al. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.

LEITE, L. F. C. et al. Nodulação e produtividade de grãos do feijão-caupi em resposta ao molibdênio. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 40, n. 4, p. 492-497, 2009.

MARTINEZ-ROMERO, E. et al. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 41, n. 3, p. 417-426, July 1991.

MARTINS, S. A. **Desenvolvimento do feijão-comum tratado com *Bacillus subtilis***. 2013. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

- MELLONI, R. et al. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.
- MERCANTE, F. M. et al. Avanços biotecnológicos na cultura do feijoeiro sob condições simbióticas. R. UFRRJ: Seropédica-RJ. **Ciências da Vida**, Seropédica, v. 21, p. 127-146, 1999.
- MORAES, W. B. et al. Avaliação da fixação biológica do nitrogênio em genótipos de feijoeiros tolerantes a seca. **Idesia**, Arica, v. 28, n. 1, p. 61-68, 2010.
- MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Ed.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010. p. 279-312.
- MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 197-206, Apr. 2006.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.
- MOSTASSO, L. et al. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 121-132, 2002.
- OLIVEIRA, D. P. **Adubação nitrogenada, inoculação com estirpes de rizóbio e tratamentos fungicidas de sementes em feijoeiro-comum cv. Madreperóla**. 2013. 180 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. et al. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 30, p. 1239-1250, Nov. 2014.
- OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M. MOREIRA, F. M. S. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 7, n. 11, p. 948-959, Mar. 2013.
- ORMEÑO, E. et al. *Phaseolus lunatus* is nodulated by a Phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian. **Developments in Plant and Soil Sciences**, New York, v. 102, p. 143-147, 2007.
- ORMENÕ-ÓRRILLO, E. et al. Molecular diversity of native Bradyrhizobia isolated from (*Phaseolus lunatus*) in Peru. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 3, p. 253-226, Apr. 2006.
- PELEGRIN, R. et al. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 219-226, jan./fev. 2009.

- PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 8, p. 1851-1864, Aug. 2007.
- RODRIGUES, C. S.; LARANJO, M.; OLIVEIRA, S. Effect of heat and Ph stress in the growth of chickpea mesorhizobia. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 1, p. 1-7, July 2006.
- ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2007. 296 p.
- RUFINI, M. et al. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 81-88, jan. 2012.
- RUFINI, M. et al. Estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com guandu-anão em casa de vegetação e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 3, p. 197-206, mar. 2014.
- SANTOS, J. O. **Variabilidade genética em genótipos de fava (*Phaseolus Lunatus*) com base na composição química e nodulação por *Rhizobium***. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.
- SAWADA, H.; KWYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the Systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, Washington, v. 49, n. 3, p. 155-179, June 2003.
- SCHOLLA, L.; ELKAN, G. H. *Rhizobium fredii* sp.nov, a fast-growing species that effectively nodulates soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 34, n. 4, p. 484-486, Oct. 1984.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, n. 2, p. 374-377, Apr. 1993.
- SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, K. Annapurna role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, New York, v. 55, n. 1, p. 25-29, July 2007.
- SILVA, E. F. L. et al. Fixação biológica do N<sub>2</sub> em feijão-caupi sob diferentes doses e fontes de fósforo solúvel. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 394-402, maio/jun. 2010.
- SILVA, K. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 35, n. 4, p. 253-262, June 2012.
- SILVA, V. N. et al. Caracterização e seleção de populações nativas 35 de rizóbios de solo da região semiárida de Pernambuco. Goiania-GO, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 1, p. 16-21, mar. 2007.

SINGH, P. et al. Seventy-five years of breeding dry bean of the western USA. **Crop Science**, Madison, v. 47, n. 3, p. 981-989, May 2007.

SOARES, A. L. L. et al. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II- Feijoeirocomum. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 803-811, set./out. 2006.

SOARES, B. L. et al. Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 71, n. 3, p. 171-180, May/June 2014.

SOUZA, F. F.; RAMALHO, A. R.; NUNES, A. M. L. **Cultivo do feijão comum em Rondônia**. Embrapa. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

STAJKOVIC, O. et al. Improvement of common bean growth by coinoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucarest, v. 16, n. 1, p. 5919-5926, 2011.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G.; MERCANTE, F. M. Fixação simbiótica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. **Produção de feijoeiro-comum em várzeas tropicais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p. 122-153.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 449-484.

TAN, Z. Y. et al. *Rhizobium yanglingense* sp. nov. isolated from arid and semiarid regions in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 3, p. 901-914, May 2001.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 1, p. 19-28, Jan. 1991.

TOLEDO, I.; LLORET, L.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 26, n. 1, p. 54- 64, Mar. 2003.

TRIPLETT, E.W. et al. Increase in internode length of *Phaseolus lunatus* caused by inoculation with a nitrate reductase-deficient strain of *Rhizobium* sp. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 67, n. 1, p. 1-4, Jan. 1981.

TUZUN, S.; KLOEPPER, J. W. Potential applications of plant growth-promoting Rhizobacteria to induced systemic disease resistance, In: REUVENI, R. (Ed.). **Novel approaches to integrated pest management**. Boca Raton: Lewis, 1995. Chap. 6, p. 115-127. VALVERDE, A. et al. Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. **Plant Soil**, The Hague, v. 287, n. 1-2, p. 43-50, Mar. 2006.

- VIEIRA, N. M B. et al. Comportamento dos genótipos de feijoeiro em relação à adubação com nitrogênio mineral e inoculação com rizóbio. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 18, n.1, p. 57-61, maio 2005.
- VILAS BÔAS, R. C.; NASCIMENTO JUNIOR, A. F.; MOREIRA, F. M. S. Microbiologia do solo em curso de formação continuada de professores de biologia do ensino médio. **Revista Ciências & Idéias**, Nilópolis, v. 5, n. 1, p. 1-17, jan./abr. 2014.
- YADEGARI, M. et al. Evaluation of bean [*Phaseolus vulgaris*] seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 9, p. 792-799, 2010.
- WANG, E. T. et al. *Rhizobium etli* *bv. mimosae*, a móvel biovar isolated from mimosae affinis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 49, n. 4, p. 1479-1491, Oct. 1999.
- ZILLI, J. E. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solos do Cerrado em feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 811-818, maio 2006.

**SEGUNDA PARTE-ARTIGOS****ARTIGO 1 - GROWTH PROMOTION OF COMMON BEAN AND GENETIC DIVERSITY OF BACTERIA FROM THE AMAZON PASTURE LAND****FORMATADO DE ACORDO COM AS NORMAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA SCIENTIA AGRÍCOLA**

**Running title:** Diversity of bacteria from the Amazon

**Manuscript category:** Agricultural Microbiology

**Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from the Amazon pasture land**

Linajara de Vasconcelos Martins Ferreira<sup>1,2</sup>, Fernanda de Carvalho<sup>2</sup>, Júlia Fonseca Colombo Andrade<sup>2</sup>, Fatima Maria de Souza Moreira<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Federal Institute of Pará/IFPA –Campus Marabá Rural, C.P. 041 – 68508-979- Marabá, PA- Brazil

<sup>2</sup>Federal University of Lavras- Department of Soil Science, Sector of Biology, Microbiology and Biological Processes, C.P. 3037 - 37200-000 - Lavras, MG - Brazil.

\*Corresponding author <fmoreira@dcs.ufla.br>

## Abstract

A significant number of bacterial species, particularly those present in the rhizosphere, may result in beneficial effect on plant growth and development. This group of bacteria is known as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR).

The aim of this study was to genetically identify isolates of common bean nodules from the Amazon pasture land, and to verify their capacity of nodulating and promoting growth of common bean when inoculated or co-inoculated with CIAT 899.

Two experiments were carried out in greenhouse, in axenic conditions, using the common bean cultivar Talismã. In the first experiment, 56 plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strains were individually evaluated regarding growth promotion and nodulation. In the second experiment, the inoculation of seven PGPR strains previously selected in the first experiment was evaluated in three forms of N supply: Co-inoculation with CIAT 899 strain (*Rhizobium tropici*) in the presence of low N-mineral concentration; individual inoculation in the presence of high N-mineral concentration; and individual inoculation in the presence of low N-mineral concentration.

16S rRNA gene sequencing showed the predominance of *Pseudomonas* genus, which was identified in 35% of the sequenced strains. Other genera were identified: *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacillus*. Inoculation of the seven strains with CIAT 899 promoted distinct plant growth in the different forms of N supply. Also, N-mineral supply can be replaced by co-inoculation of CIAT 899 with the growth-promoting strains UFLA 02-281, UFLA 02-298 and UFLA 02-293.

**Keywords:** co-inoculation; endophytic bacteria; *Phaseolus vulgaris*; rhizobia.



## Introduction

In the search for promising isolates for plant growth promotion, the Amazon region stands out for its high diversity of organisms that inhabit the soil, including micro-organisms. This fact was observed in the diversity of rhizobia genera and strains found in western Amazon (Guimarães et al., 2012; Jaramillo et al., 2013). Besides, in the Amazon region, great part of the soil is intended for pastureland, where recent studies have found a significant bacterial diversity (Jesus et al., 2009; Soares et al., 2016).

Studies have demonstrated that bacterial strains isolated from this region have the potential to act as plant growth promoters in the biological nitrogen fixing (BNF) process (Almeida et al., 2010; Fonseca et al., 2013), or in other processes, such as: Inhibition of phytopathogenic fungal growth, fixation of free-living nitrogen, solubilization of calcium phosphate, production of indole-3-acetic acid (IAA) (Silva et al., 2012; Oliveira-Longatti et al., 2013; Oliveira-Longatti et al., 2014); and induction of soil acidity tolerance and other abiotic stresses (Medeiros et al., 2011; Soares et al., 2014).

The co-inoculation of *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with legume species has increasingly received attention in recent years. This may be due to the positive effects of this combination on the cultivation of legume species, since it provides: growth and nutrient absorption, as it happens in lentil plants with the co-inoculation of *Pseudomonas* sp. with *Rhizobium leguminosarum* (Mishra et al., 2011.); increase of nodulation in some crops, such as in *Cajanus cajan*, with the co-inoculation of *Pseudomonas putida* with *Rhizobium* (Tilak et al., 2006); and positive effects on grain yield, as it happens in bean crop, with the co-inoculation of *Pseudomonas* and *Rhizobium* (Samavat et al., 2012).

In Brazil, there are three *Rhizobium* strains authorized as inoculants for this crop: CIAT 899, PRF 81, and H 12. Results show that bean plants can benefit by BNF in the field, with no need for nitrogen fertilizers application (Fonseca et al., 2013), and the great challenge would

be the appropriate management of this symbiosis in order to increase its efficiency. The co-inoculation of *Rhizobium* and PGPR may be a strategy to be adopted to improve the efficiency of these strains.

The objective of this study was to genetically identify isolates from nodules of common bean inoculated with Amazon pasture land soil, and to verify their ability to nodulate and promote growth of bean plants when co-inoculated or not with CIAT 899.

## **Material and methods**

### **Strains origin**

The 56 strains used in this study were isolated from nodules of common bean cultivated in soils from the Amazon region under pasture systems (Moreira et al., 2009). The strains belong to the collection of the laboratory of Soil Microbiology of the Federal University of Lavras (UFLA).

### **16S rRNA gene sequencing of bacterial strains**

DNA of the 56 bacterial strains was extracted by the alkaline lysis method (Niemann et al., 1997). The 16S rRNA gene was partially amplified using cultures at log stage in medium 79. For 50  $\mu\text{L}$  PCR reaction, 10  $\mu\text{L}$  aliquot of DNAs' template extracted from strains were used. The final concentration of reagents per reaction was of 5  $\mu\text{L}$  10X buffer for each PCR, 5  $\mu\text{L}$  dNTP Mix (0.2 mM of each dNTP), 4  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (2.5 mM), 1  $\mu\text{L}$  of each primer (10 mmol L<sup>-1</sup>) (27F primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R primer (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991), 0.4  $\mu\text{L}$  Taq DNA polymerase (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) and sterile milli-Q water. Amplification reaction occurred following initial denaturation (94 °C for 5 min), 40 denaturation cycles (94 °C for 40 s), annealing (55 °C for 40 s), extension (72 °C for 1.5 min) and final extension (72 °C for 7 min). Reaction was performed in

thermocycler Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup>. PCR products were separated in 1% agarose gel and visualized under UV light.

PCR products were sent to the Macrogen Laboratory (Korea) for purification and sequencing, which was performed using the oligonucleotide primer 27F. Sequence quality was evaluated using the BioNumerics software (version 7.1). Additionally, the sequences were subjected to BLASTn for comparison with similar sequences deposited in the GenBank database (National Center for Biotechnology Information - NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and were deposited under the accession numbers KU613374 to KU613408.

### **Experiment 1: Authentication and promotion of vegetative growth of bean plants**

The experiment was carried out in a greenhouse from June to July 2014. Plants were cultivated in 500 mL longneck bottles. The experimental design was completely randomized, with three replications and 59 treatments. Treatments consisted of inoculations with 56 bacterial strains isolated from bean nodules (Table 1); one reference strain approved by MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Brazilian Ministry of Livestock Agriculture and Supply) as inoculum for bean crops; and two negative controls without inoculation, with high and low N-mineral concentrations. The experiment used the following N-mineral sources:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{KNO}_3$  and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . In the inoculated treatments, and in the control without inoculation and with low N concentration, Hoagland nutrient solution with low nitrogen concentration ( $5.25 \text{ mg L}^{-1}$ ) was applied. In the control without inoculation and with high N-mineral concentrations, complete Hoagland solution was used, with  $52.5 \text{ mg L}^{-1}$  nitrogen. Subsequently, all bottles were autoclaved for 60 minutes at a pressure of  $1.5 \text{ kg cm}^2$ , at  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Longneck bottles containing Hoagland nutrient solution (Hoagland and Arnon 1950) were covered with aluminum foil, and two filter paper strips were placed in each bottle, with 2 cm in width and length equal to the bottle's height, to support the roots, and to promote contact of the plant with the nutrient solution. Before sowing, bean seeds were surface sterilized using 98% ethanol (30 seconds), 2% sodium hypochlorite (2 minutes), and then subjected to successive rinses in sterile distilled water. After disinfection, seeds were placed in sterile petri dishes containing moistened filter paper and cotton, where they remained for 48 hours in a growth chamber at 28 °C, for the emission of rootlets.

For inoculum preparation, bacterial strains were cultivated in liquid culture medium 79 (Fred and Waksman, 1928), stirred at 110 rpm, at 28 °C, for 3 days. At sowing, 1 ml of the inoculant ( $10^9$  Cells mL<sup>-1</sup>) was added to the pre-germinated seeds in the inoculated treatments. In the controls without inoculation, 1 mL of the culture medium without inoculum was applied.

Thirty-five days (pre-flowering stage) after the beginning of the experiment, plants were harvested for the determination of the following traits: number of nodules (NN); nodule dry matter (NDM); shoot dry matter (SDM); root dry matter (RDM); and total dry matter (TDM). To determine NN, nodules were detached from roots and counted. To determine NDM, SDM and RDM, nodules, shoot and roots were placed in paper bags and allowed to dry in forced air circulation oven at 60 °C until constant weight. Data were subjected to analysis of variance, using the statistical analysis software SISVAR (SISVAR, version 5.3). Treatments were compared by the Scott-Knott test at 5 % probability. NN and NDM values had been previously transformed into square root of  $Y + 0.5$ .

## **Experiment 2: Inoculation and co-inoculation of bean with plant growth-promoting bacteria**

In order to evaluate the plant growth promotion potential when subjected to inoculation and co-inoculation with bean inoculant rhizobia strain (CIAT 899), seven strains were selected (UFLA 02-274, UFLA 02-276, UFLA 02-281, UFLA 02-282, UFLA 02-298, UFLA 02-290, UFLA 02-293), which stood out in relation to shoot and root dry matter, as observed in experiment 1.

The experiment was carried out in October and November, 2014, in Leonard jars (Vincent, 1970), containing Hoagland solution (Hoagland and Arnon, 1950). The experimental design was completely randomized in a factorial design (8 x 3) with three replications. Factor 1 was the individual inoculation of seven strains, and without inoculation; factor 2 was three forms of N supply: low (5.25 mg L<sup>-1</sup>) and high (52.5 mg L<sup>-1</sup>) N-mineral concentration in the nutrient solution and co-inoculation with CIAT899 with low N-mineral concentration.

Bean seeds were surface sterilized as described above. In each jar, four seeds were sown and inoculated with 1 ml of the culture in liquid medium 79 (Fred and Waksman, 1928), with strains at the log growth stage (10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup>). In the treatments without inoculation, only 1 ml sterilized liquid culture medium 79 was added.

After sowing and inoculation, jars were covered with a layer of sand paraffin (10 kg sand, 1 L chloroform, and 10 g paraffin) in order to prevent possible contamination. Thinning was carried out five days after emergence, leaving one plant per jar. During the experiment, the nutrient solution was prepared, autoclaved, and periodically replaced in the jars, according to the plant absorption rate.

At Forty-five days after sowing, corresponding to the flowering stage plants were harvested in order to determine the following traits: number of nodules (NN); nodules dry matter (NDM); shoot dry matter (SDM); root dry matter (RDM); total dry matter (TDM); and

nitrogen accumulation in the shoots (NAS). For the determination of NDM and SDM, the same procedures described for the authentication experiment were used. After weighing, nitrogen accumulated in the shoots (NAS) was calculated by multiplying the weight of dry shoots by the nitrogen content, and measured by the semi micro-Kjeldahl method described by Liao (1991).

Data were subjected to analysis of variance, using the statistical analysis program SISVAR, (SISVAR, version 5.3). Treatments were compared by the Scott-Knott test at 5% probability. NDM and NN values had been previously transformed into square root of  $Y + 0.5$ .

In order to confirm the cultural and genetic characteristics of the inoculated strains, 10 nodules were selected from the co-inoculation treatment for re-isolation. For surface disinfection, nodules were first immersed in 95 % ethanol, then in  $H_2O_2$  for 3 minutes, and after that, they were rinsed ten times with sterile distilled water. Subsequently, nodules were macerated in plates containing culture medium 79 (Fred and Waksman, 1928), and the material was spread in order to obtain isolated colonies. Afterwards, sequencing was carried out as described above.

## **Results**

Of a total of 56 strains studied, 35 were successfully amplified. A comparison of the 16S rRNA gene partial sequencing of the strains evaluated with the sequences deposited in the GenBank showed presented strains belonging to *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Brevibacillus*, and *Bacillus* genera, with predominance of *Pseudomonas* (Table 1).

In the individual inoculation experiment (experiment 1), treatments influenced all the evaluated parameters ( $p \leq 0.05$ ) (Table 2). There was no nodulation in the uninoculated controls, indicating no contamination in the experiment.

Of the 56 strains that were inoculated, only the strains UFLA 02-09, UFLA 02-287, UFLA 02-279, UFLA 02-280 and UFLA 02-285 nodulated bean plants, and they belonged to the *Rhizobium* genus (Table 2). All strains showed SDM production lower ( $p \geq 0.05$ ) than that of the control with high N-mineral concentration (Table 2). Among the evaluated strains, 17 stood out for presenting SDM production superior to that of the control with low N concentration ( $p \leq 0.05$ ) (Table 2). Of these strains, only three are nodulating strains (UFLA 02-09, 02-279 and UFLA 02-285).

In relation to RDM, 59 % of the strains had better performance, with gains similar ( $p \leq 0.05$ ) to that of the control with high N concentration (Table 2), and 50% of the strains were superior ( $p \geq 0.05$ ) to the control with low N concentration. (Table 2).

The seven strains studied in the inoculation and co-inoculation tests (experiment 2) are non-nodulating species. However, they showed good results for plant growth promotion, as observed in experiment 1. These strains belong to the genera: *Pseudomonas* (UFLA 02-276, UFLA 02-281, UFLA 02-282, UFLA 02-293), *Bacillus* (UFLA 02-290 and UFLA 02-298) and *Xanthomonas* (UFLA 02-274) (Table 2).

Significant interaction between inoculation of the seven strains and the forms of N supply for all the studied variables was observed, except for NDM (Tables 3 and 4), since only the forms of N supply presented effects.

Bean inoculant strain (CIAT 899) efficiently nodulated, and the uninoculated controls showed no nodulation, indicating that the experiment was not contaminated, and that the experimental conditions were favorable to nodulation. In the treatments individually inoculated with the seven previously selected strains, no bean nodulation was observed in the presence of low and high N-mineral concentration in the nutrient solution, as expected.

Co-inoculation of UFLA 02-293 (*Pseudomonas entomophila*), UFLA 02-290 and UFLA 02-298 (*Bacillus* sp.) with CIAT 899 resulted in higher NN (176, 120 and 187 nodules plant<sup>-1</sup>,

respectively) in relation ( $p \leq 0.05$ ) to individual inoculation with CIAT 899 (86 nodules plant<sup>-1</sup>) (Table 3). Co-inoculation of CIAT 899 with UFLA 02-276 and UFLA 02-282 reduced NN (Table 3).

For NDM, effects were observed only for the forms of N supply ( $p \geq 0.05$ ) (Table 4). Co-inoculation of the seven strains with CIAT 899 provided the best results for this variable.

The best results for SDM production ( $p \leq 0.05$ ) were observed in the treatments inoculated with the UFLA 02-293, UFLA 02-298 and UFLA 02-282 in the presence of high N-mineral concentration (52.5 mg L<sup>-1</sup> N) (Table 3); in the co-inoculation of CIAT 899 with these strains, together with the UFLA 02-281; and in the individual inoculation of UFLA 02-298 in the presence of low N concentration (Table 3). No differences in SDM production ( $p \geq 0.05$ ) were observed between the forms N supply when bean plants were inoculated with UFLA 02-276, demonstrating the potential of plant growth promotion (Table 3). The co-inoculation of CIAT 899 with UFLA 02-281 and UFLA 02-293 showed that the production of shoot dry matter was higher than that of the treatments cultivated in the presence of low N concentration (5.25 mg L<sup>-1</sup>) ( $p \leq 0.05$ ), and similar to that of the treatments cultivated in high N concentration (52.5 mg L<sup>-1</sup>) ( $p \geq 0.05$ ) (Table 3).

Inoculation of the seven strains in the presence of low N concentration (5.25 mg L<sup>-1</sup>) and co-inoculation of these strains with CIAT 899 did not affect root dry matter production ( $p \geq 0.05$ ) (Table 3). However, in the presence of high N concentration (52.5 mg L<sup>-1</sup>), inoculation with UFLA 02-282, UFLA 02-281, UFLA 02-298 and UFLA 02-293 promoted higher RDM production ( $p \leq 0.05$ ), and these strains were allocated in groups superior to that of the control that was not inoculated with any strain (Table 3). Forms of N supply in the treatments inoculated with UFLA 02-276 and 02-290 UFLA did not influence RDM production. Higher RDM production was observed for the other strains inoculated in the presence of high N concentration (Table 3).



Co-inoculation of UFLA 02-281, UFLA 02-298 and UFLA 02-293 strains with CIAT 899 provided the highest TDM production ( $p \leq 0.05$ ) (Table 3). However, in the presence of high N concentration, only UFLA 02-282 stood out ( $p \leq 0.05$ ) (Table 3). The same form of N supply showed inhibitory effect ( $p \leq 0.05$ ) (Table 3) for inoculation of UFLA 02-276 and UFLA 02-290 strains. The highest TDM production in the presence of low N concentration was verified by the inoculation with UFLA 02-290 and UFLA 02-298 ( $p \leq 0.05$ ) (Table 3). For SDM and RDM, inoculation of UFLA 02-276 strain provided similar TDM in all of the three forms of N supply (Table 3). Treatments inoculated with high N concentration were superior to the other forms of N supply, except for the treatments with co-inoculation of CIAT 899 with UFLA 02-276, UFLA 02-290 and UFLA 02-293, with no difference between them ( $p \leq 0.05$ ) (Table 3). Therefore, when inoculated with CIAT 899, these strains were effective in promoting bean growth, since inoculation with only CIAT 899 promoted TDN similar to that of the control, i.e., 5.25 mg N-mineral L<sup>-1</sup>.

Treatments with low N concentration showed that inoculation of the seven strains did not influence NAS. However, NAS increased when plants were cultivated in high N concentrations inoculated with UFLA 02-282, UFLA 02-290, UFLA 02-281, UFLA 02-298 UFLA 02-274 and UFLA 02-293, or with the co-inoculation of CIAT 899 with UFLA 02-298 and UFLA 02-293. Treatments inoculated in the presence of high N concentration promoted higher NAS. Co-inoculation results were superior to those found in the treatments with low N concentration (Table 3).

Results of the sequencing of the re-isolated strains confirmed that four of them are nodules endophytes, except for UFLA 02-274 (*Xanthomonas* sp.) and UFLA 02-290 (*Bacillus* sp.) (Table 5). However, UFLA 02-298 was not successfully amplified, and was only confirmed by phenotypic characterization in culture medium. CIAT 899 was also observed, confirming that nodulation was promoted by the bean inoculant strain.

## Discussion

The 16S rRNA gene sequencing, with the possible identification of six distinct genera, demonstrate high genetic diversity of bacterial strains in pasture areas in the western Amazon, and a high incidence of possible nodules endophytes, since most of these genera are not recognized as legume symbiont.

Genetic diversity study of strains from western Amazon pasture lands, using siratro (*Macroptilium atropurpureum*) as trap plant, identified strains of *R. tropici*, *Rhizobium* sp., *R. miluonense* and *Burkholderia fungorum* (Lima et al., 2009). In the present study, four other genera were also identified (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus* and *Brevibacillus*). These results illustrate the need to use more than one species of trap plant to evaluate the diversity of native bacterial strains.

Bacteria of the genus *Rhizobium* were the only ones to nodulate bean plants. Other studies report nodulation of this bean species by *R. tropici* (Martínez-Romero et al. 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993; Wang et al., 1999), *R. gallicum* (Amarger et al., 1997), *R. giardinii* (Amarger et al., 1997), *R. yanglingense* (Tan et al., 2001); and by other genera, such as *Sinorhizobium* (Toledo et al., 2003), *Mesorhizobium* (Chen et al., 1991) and *Burkholderia* sp. (Ferreira et al., 2012).

PGPR can be free-living, associative or endophytic. Endophytic PGPR is able to colonize plant roots, and in the case of legume species, it is able to cohabit with BNF within the nodules. According to Kan et al. (2007), these bacteria possibly penetrate into the plant tissue, together with nodulating strains, during infection and nodules formation. The genera *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Bacillus* and *Paenibacillus* are more frequently reported as nodules endophytes (Kan et al., 2007; Li et al. 2008; Shiraishi et al. 2010; Costa et al. 2016). In the present study, *Bacillus* (UFLA 02-298) and *Paenibacillus*

(UFLA 02-276, UFLA 02-293, UFLA 02-281 and UFLA 02-282) were identified as nodules endophytes.

Similar to the pasture lands, high genetic diversity of strains isolated in western Amazon were also found in soils under agricultural systems by Guimarães et al. (2012) (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia* and *Achromobacter*), and agroforestry systems by Jaramillo et al. (2013) (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Bosea*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*) using cowpea as trap plant. These results prove the high symbiotic and genetic diversity of bacterial strains from different land use systems in the western Amazon as a potential plant growth promoter, as reported in this study and in Guimarães et al. (2012) and Jaramillo et al. (2013).

In the first experiment, although strains belonging to the genera *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia fungorum* and *Bacillus* did not nodulate common bean plants, they promoted plant growth in low N concentration (5.25 mg L<sup>-1</sup>). This result was probably caused by phytoestimulation biological processes different from BNF, such as phytohormones production. *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains are often described as potential plant growth promoters due to the action in different biological processes, especially in phosphate solubilization and phytohormones synthesis (particularly IAA) (Samavat et al., 2012; Oliveira-Longatti et al., 2013; 2014; Costa et al., 2016).

The ability to fix nitrogen may be affected by several biotic and abiotic factors (Tsai, 1993; Ali et al., 2009). The interaction of *Rhizobium* with other microorganisms in the soil is one of the factors that affect this process, and both stimulation and inhibition of nodulation and plant growth may occur, depending on the interaction between symbionts and growth-promoting bacterial strains. In the present study, this fact was presented by means of nodulation stimulation by *Pseudomonas* sp. (UFLA 02-293), *Bacillus* sp. (UFLA 02-290) and

*Pseudomonas* sp. (UFLA 02-298) strains, and nodulation inhibition by *Pseudomonas* sp. (UFLA 02-282 ND UFLA 276) strains. However, not all strains that stimulated nodulation in co-inoculated treatments with CIAT 899 promoted growth or increased SDM, RDM, and TDM production.

In RDM, SDM and TDM production, NAS was different for strains depending on the form N supply, except for the RDM in the co-inoculated treatments and in the presence of low N concentration. Notably, the highest increase in SDM was obtained by the combination of *Bacillus* sp. (UFLA 02-298) and *Paenibacillus* (UFLA 02-293, UFLA 02-281 and UFLA 02-282) co-inoculated with CIAT 899. Individual inoculations of PGPR in the presence of low N concentration did not influence NAS. This result was expected since they are not nodulating strains, nor N<sub>2</sub>-fixing strains; however, they influence plant growth by other processes (Costa et al., 2016). Nevertheless, co-inoculation of PGPR with *Bacillus* sp. (UFLA 02-298) and *Paenibacillus* sp. (02-293) together with *Rhizobium* increased NAS.

In the literature, PGPR of the genus *Pseudomonas* sp. are reported as growth promoters, as verified by Samatava et al. (2012). This genus also showed relevant performance when co-inoculated with CIAT 899. In other studies, the contribution of the co-inoculation of *Paenibacillus* strains (Rodrigues et al., 2012) and *Enterobacter* sp. (Costa et al., 2014) with *Bradyrhizobium* was observed on the dry matter yield of cowpea and soybean plants, respectively.

Inoculation of CIAT 899 with *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. can be an effective strategy for producing bio-fertilizers for beans. The present results will help establish an inoculum or a combination of inoculum for bean yield improvement, and the understanding of their performance under low and high N-minerals concentrations.

## Conclusions

16S rRNA gene sequencing showed the predominance of *Pseudomonas* genus as bean plants nodules endophytic strains. Other genera were identified: *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacillus*. Thus, high incidence of possible endophytic strains was found in the nodules, since most of these genera are not known as legume plants symbiont.

This result also demonstrates the high genetic diversity of bacterial strains under pasture system by the presence of strains of *Bacillus* and *Pseudomonas* genera, showing potential to be used as plant growth promoters. Inoculation of the seven strains with CIAT 899 promoted varied plant growth in the different forms of N supply. N-mineral supply may be replaced by the co-inoculation of CIAT 899 with UFLA 02-281, UFLA 02-86 and UFLA 02-293, which are plant growth promoting strains. Tests under field conditions are necessary to validate these promising results on a large scale.

## Acknowledgments

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development [Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)]-30457/2010-4; 560551/2010-0; 106350/2015-3; 141672/2014-5; Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel [Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)]- PROEX AUXPE 5902014 and Foundation support research in the state of Minas Gerais [Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais FAPEMIG)]- PACS AUXPE 26182012for financial support and for granting and fellowships

## References

- Ali, S.F.; Rawat, L. S.; Meghvansi, M.K.; Mahna, S.K. 2009. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 4: 13-18.
- Amarger, N.; Macheret, V.; Laguerre, G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47: 996-1006.
- Chen, W.X. ; Li, Y.L. ; Wang, E.T. ; Yuan, H.L.; Li, J.L. 1991. *Rhizobium huahuii* sp.nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41: 275-280.
- Costa, E.M.; de Carvalho, F.; Nóbrega, R.S.A.; Silva J.S.; Moreira, F.M.S. 2016. Bacterial strains from floodplain soils perform different plant-growth promoting processes and enhance cowpea growth. *Scientia Agricola*. 73: 301-310.
- Ferreira, P.A.A.; Bomfeti, C.A.; Soares, B.L; Moreira, F.M.S. 2012. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from Amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 1947-1959.
- Fonseca, G.G.; Oliveira, D.P.; Soares, B.L.; Ferreira, P.A.A.; Moreira, F.M.S.; Andrade, M. J. 2013. Growth and accumulation of n in bean plant cultivars inoculated with rhizobium strains. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, Fort Collins*. 56: 83-84.
- Fred, E.B.; Waksman, S.A., eds. 1928. *Laboratory manual of gen microbiology*. New York: McGraw-Hill Book, 143 p.

Hoagland, D.R.; Arnon, D.T., eds. 1950. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agriculture Experiment Station. 32 p.

Guimarães, A.A.; Jaramillo, P.M.D.; Nóbrega, R.S.A.; Florestino, L.A.; Silva, K.; Moreira, F.M.S. 2012. 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*. 78: 6726-6733.

Jaramillo, P.M.D.; Guimarães, A.A.; Florentino, L.A.; Silva, K.B.; Nóbrega, R.S.A.; Moreira, F.M.S. 2013. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. *Scientia Agricola*. 70: 397-404.

Jesus, E.C.; Marsh, T.L.; Tiedje, J.M. 2009. Moreira, Fatima S.M. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The Isme Journal*. 3: 1004-1011.

Kan, F.L.; Chen, Z.Y.; Wang, E.T.; Tian, C.F.; Sui, X.H.; Chen, W.X. 2007. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes cultivated in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. *Archives Microbiology*. 188: 103-115.

Li, J.H.; Wang, E.T.; Chena, W.F.; Chena, W.X. 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean cultivated in Heilongjiang province of China. *Soil Biology Biochemistry*. 40: 238-246.

Liao C.F.H. 1981. Devarda's allow methods for total nitrogen determination. *Soil Science Society of America Journal*. 45: 852-855

Lima, A.S.; Nóbrega, R.S.A.; Barberi, A.; Silva, K.; Ferreira, D.F.; Moreira, F.M.S. 2009. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil*. 319: 127-145.

Martínez-Romero, E.; Segovia, E.; Mercante, F.M.; Franco, A.A.; Graham, P.H.; Pardo, M.A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41: 417-426.

Marra, L.M.; Soares, C.R.F.S.; Oliveira, S.M.; Ferreira, P.A.A.; Soares, B.L.; Carvalho, R.F.; Lima, J.M.; Moreira, F.M.S. 2012. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant Soil*. 357: 289-307.

Mishra, P.K.; Bisht, S.C.; Ruwari, P.; Joshi, G.K.; Singh, G.; Bisht, J.K.; Bhatt, J.C. 2011. Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.). *European Journal Soil Biology*. 47: 35-43.

Medeiros, F.H.V.; Souza, R.M.; Medeiros, F.C.L.; Zhang, H. Wheeler, T.; Payton, P.; Ferro, H.M.; Paré, P.W. 2011. Transcriptional profiling in cotton associated with *Bacillus subtilis* (UFLA285) induced biotic-stress tolerance. *Plant and Soil*, 1-11.

Moreira, F.M.S.; Nóbrega, R.S.A.; Jesus, E.C.; Ferreira, D.F.; Pérez, D.V. 2009. Differentiation in the fertility of Inceptisols as related to land use in the upper Solimões river region, western Amazon. *Science of the Total Environment*. 408: 349-355.

Niemann, S.; Puehler, A.; Tichy, H.V.; Simon, R.; Selbitshka, W. 1977. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among



isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. Journal of Applied Microbiology. 82: 477-484.

Oliveira-Longatti, S.M.; Marra, L.M.; Soares, B.L.; Bomfeti, C.A.; Silva, K.; Ferreira, P.A.V.; Moreira, F.M.S. 2014. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. World Journal of Microbiology Biotechnology. 30: 1239-1250.

Oliveira-Longatti, S.M.; Marra, L.M.; Moreira, F.M.S. 2013. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. Africa Journal Microbiology. Research. 7: 948-959.

Saharan, B.S. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research.

Shiraishi, A.; Matsushita, N.; Hougetsu, T. 2010. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. Systematic and Applied Microbiology. 33: 269-274.

Silva, K. Cassetari, A.S.; Lima, A.S.; Brandt, E.; Pinnock, E.; Vandammec, P.; Moreira, F.M.S. 2012. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. Systematic and Applied Microbiology. 35: 253-262.

Samavat, S.; Samavat, S.; Mafakheri, S.; Shakouri, M.J. 2012. Promoting Common Bean Growth and Nitrogen Fixation by the Co-Inoculation of *Rhizobium* and *Pseudomonas fluorescens* Isolates. Bulgarian Journal Agricultural Science. 18: 387-395.

Segovia, L.; Young, J.P.W.; Martínez-Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. Internatinal Journal of Systematic Bacteriology. 43: 374-377.

Soares, B.L.; Ademar, P.A.; Oliveira-Longatti, S. M.; Marra, L.M.; Rufini, M. 2014. Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. Scientia Agricola. 71: 171-180.

Soares, B.L.; Ferreira, P.A.A.; Rufini, M.; Martins, F.A.D.; Oliveira, D.P.; Reis, R.P.; Andrade, M.J.B.; Moreira, FM.S. 2016. Agronomic and Economic Efficiency of Common-Bean Inoculation with Rhizobia and Mineral Nitrogen Fertilization. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 40: 1-13.

Toledo, I.; Lloret, L.; Martínez-Romero, E. 2003. *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. Systematic Applied Microbiology. 26: 54- 64.

Tan, Z.Y.; Kan, F.L.; Peng, G.X.; Wang, E.T.; Reinhard-Hurek, B.; Chen, W.X. 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov. isolated from arid and semiarid regions in China. Internatinal Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. 51: 901-914.

Tilak, K.V.B.; Ranganayaki, R.N.; Manoharachari, C, 2006. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeon pea. European Jounal Soil Science. 57: 67-71.

Tsai, S.M.; Bonetti, R.; Agbala, S.M.; Rossetto, R. 993. Minimizing the efect of mineral nitrogen on biological nitrogen fxation in common bean by increasing nutrient levels. Plant and Soil. 152: 131-138.

Vincent, J.M., eds. 1970. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell. 164.

Wang, E.T.; Rogel, M.A.; García-de los Santos, A.; Martínez-Romero, J.; Cevallos. M.A.; Martínez-Romero, E. 1999 *Rhizobium etli* *bv. mimosae*, a móvel biovar isolated from mimosae affinis. Internatinal Journal of Systematic Bacteriology. 49: 1479-1491.

**Table 1.** Identification of strains isolated from nodules of common bean grown in soil of pasture land from Amazon based on the most similar sequences found in GenBank (NCBI).

Strains	Sequence length	Most similar sequences found in GenBank (NCBI)		
		Similarity (%)	Accession number	Species
UFLA 02-267	612	99	KF295815	<i>Burkholderia fungorum</i>
UFLA 02-268	714	100	FJ534682	<i>Burkholderia</i> sp.
UFLA 02-288	783	100	HG794272	<i>Burkholderia fungorum</i>
UFLA 02-294	1340	99	CP010027	<i>Burkholderia fungorum</i>
UFLA 03-304	1308	99	CP010027	<i>Burkholderia fungorum</i>
UFLA 02-302	1274	99	CP010027	<i>Burkholderia fungorum</i>
UFLA 02-270	1244	100	LC005608	<i>Brevibacillus</i> sp.
UFLA 02-295	1260	99	LC005608	<i>Brevibacillus</i> sp.
UFLA 02-296	904	99	KT580607	<i>Brevibacillus</i> sp.
UFLA 02-299	1305	99	LC005608	<i>Brevibacillus</i> sp.
UFLA 02-290*	985	100	NR116873	<i>Bacillus magaterium</i>
UFLA 02-298*	1001	99	AB533761	<i>Bacillus</i> sp.
UFLA 02-15	792	100	AY822513	<i>Bacterium RSD-1-2</i>
UFLA 02-289	358	100	KC894165	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-291	738	100	KT154837	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-293*	1329	100	KJ185008	<i>Pseudomonas putida</i>
UFLA 02-297	1324	99	KJ748611	<i>Pseudomonas putida</i>
UFLA 02-303	498	99	KP279906	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-286	601	100	KU350602	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-281*	685	99	KF769969	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-282*	738	100	HM35242	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-283	584	100	JX827617	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-284	498	100	KP067092	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-269	681	100	KC879711	<i>Pseudomonas koreensis</i>
UFLA 02-273	501	100	EU853182	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-275	374	100	KM08802	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-276*	369	100	KF733335	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-277	601	100	KF053343	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-278	403	100	KF767887	<i>Pseudomonas putida</i>
UFLA 02-279	530	100	KP128829	<i>Rhizobium</i> sp.
UFLA 02-280	988	99	KJ632048	<i>Rhizobium</i> sp.
UFLA 02-09	453	99	KC113610	<i>Rhizobium etli</i>
UFLA 02-285	651	99	KJ513849	<i>Rhizobium</i> sp.
UFLA 02-287	704	100	KJ734011	<i>Rhizobium</i> sp.
UFLA 02-274*	649	100	KF923840	<i>Xanthomonas</i> sp.

\*Strains evaluated for growth promotion potential when subjected to inoculation and co-inoculation with CIAT 899 strain.

**Table 2.** Number of nodules (NN), nodules dry matter (NDM), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), and total dry matter (TDM) of bean plants inoculated with strains isolated from the Amazon pasture land.

Treatment	NN	NDM	SDM	RDM	TDM
	NN plant <sup>-1</sup>	-----g plant <sup>-1</sup> -----			
UFLA 02-305	0.00 c	0.00 c	0.10 c	0.09 b	0.19 c
UFLA 02-306	0.00 c	0.00 c	0.12 c	0.16 b	0.28 c
UFLA 02-307	0.00 c	0.00 c	0.15 c	0.19 b	0.34 c
UFLA 02-308	0.00 c	0.00 c	0.16 c	0.15 b	0.31 c
UFLA 02-309	0.00 c	0.00 c	0.16 c	0.19 b	0.36 c
UFLA 02-310	0.00 c	0.00 c	0.16 c	0.18 b	0.35 c
UFLA 02-311	0.00 c	0.00 c	0.16 c	0.12 b	0.29 c
UFLA 02-272	0.00 c	0.00 c	0.16 c	0.23 a	0.40 c
UFLA 02-295	0.00 c	0.00 c	0.16 c	0.23 a	0.40 c
UFLA 02-312	0.00 c	0.00 c	0.17 c	0.17 b	0.34 c
UFLA 02-313	0.00 c	0.00 c	0.17 c	0.22 a	0.38 c
UFLA 02-314	0.00 c	0.00 c	0.17 c	0.23 a	0.40 c
UFLA 02-315	0.00 c	0.00 c	0.18 c	0.20 b	0.38 c
UFLA 02-316	0.00 c	0.00 c	0.18 c	0.16 b	0.33 c
UFLA 02-273	0.00 c	0.00 c	0.19 c	0.23 a	0.42 c
UFLA 02-267	0.00 c	0.00 c	0.19 c	0.21 b	0.39 c
UFLA 02-317	0.00 c	0.00 c	0.19 c	0.20 b	0.40 c
UFLA 02-318	0.00 c	0.00 c	0.19 c	0.28 a	0.48 b
UFLA 02-281	0.00 c	0.00 c	0.20 c	0.23 a	0.43 c
UFLA 02-289	0.00 c	0.00 c	0.20 c	0.18 b	0.38 c
UFLA 02-269	0.00 c	0.00 c	0.20 c	0.20 b	0.40 c
UFLA 02-319	0.00 c	0.00 c	0.21 c	0.25 a	0.45 b
UFLA 02-290	0.00 c	0.00 c	0.21 c	0.23 a	0.43 c
UFLA 02-272	0.00 c	0.00 c	0.21 c	0.21 b	0.41 c
UFLA 02-320	0.00 c	0.00 c	0.21 c	0.14 b	0.35 c
UFLA 02-283	0.00 c	0.00 c	0.21 c	0.31 a	0.52 b
UFLA 02-293	0.00 c	0.00 c	0.21 c	0.19 b	0.40 c
UFLA 02-271	0.00 c	0.00 c	0.21 c	0.19 b	0.40 c
UFLA 02-284	0.00 c	0.00 c	0.21 c	0.26 a	0.47 b
UFLA 02-277	0.00 c	0.00 c	0.21 c	0.25 a	0.46 b
UFLA 02-295	0.00 c	0.00 c	0.22 c	0.19 b	0.42 c
UFLA 02-280	15.21 b	0.014 b	0.22 c	0.19 a	0.46 b
UFLA 02-270	0.00 c	0.00 c	0.22 c	0.24 a	0.46 b
UFLA 02-278	0.00 c	0.00 c	0.22 c	0.24 a	0.47 b
UFLA 02-287	12.04 b	0.013 b	0.23 c	0.19 b	0.42 c
UFLA 02-302	0.00 c	0.00 c	0.23 c	0.21 b	0.44 b
UFLA 02-211	0.00 c	0.00 c	0.23 c	0.27 a	0.50 b
UFLA 02-303	0.00 c	0.00 c	0.24 c	0.22 a	0.46 b
UFLA 02-276	0.00 c	0.00 c	0.24 c	0.23 a	0.48 b
UFLA 02-292	0.00 c	0.00 c	0.23 b	0.24 a	0.50 b
UFLA 02-301	0.00 c	0.00 c	0.25 b	0.25 a	0.50 b

(Continue)

**Table 2.** Number of nodules (NN), nodules dry matter (NDM), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), and total dry matter (TDM) of bean plants inoculated with strains isolated from the Amazon pasture land.

Treatment	NN	NDM	SDM	RDM	TDM
	NN plant <sup>-1</sup>	-----g plant <sup>-1</sup> -----			
UFLA 02-15	0.00 c	0.00 c	0.25 b	0.23 a	0.49 b
UFLA 02-296	0.00 c	0.00 c	0.25 b	0.28 a	0.51 b
UFLA 02-274	0.00 c	0.00 c	0.25 b	0.23 a	0.47 b
UFLA 02-299	0.00 c	0.00 c	0.26 b	0.21 a	0.47 b
UFLA 02-294	0.00 c	0.00 c	0.26 b	0.23 a	0.50 b
UFLA 02-300	0.00 c	0.00 c	0.27 b	0.29 a	0.56 b
UFLA 02-09	11.45 b	0.017 b	0.21 b	0.21b	0.42 b
UFLA 02-286	0.00 c	0.00 c	0.27 b	0.22 a	0.49 b
UFLA 02-282	0.00 c	0.00 c	0.28 b	0.24 a	0.51 b
UFLA 02-268	0.00 c	0.00 c	0.20 b	0.23 a	0.51 b
UFLA 02-279	18.66 b	0.016 b	0.29 b	0.21b	0.50 b
UFLA 02-285	11.35 b	0.015 b	0.28 b	0.21b	0.49 b
UFLA 02-275	0.00 c	0.00 c	0.31 b	0.15 b	0.46 b
UFLA 02-288	0.00 c	0.00 c	0.31 b	0.26 a	0.57 a
UFLA 02-297	0.00 c	0.00 c	0.34 b	0.22 a	0.56 b
Control 52.5 mg L <sup>-1</sup>	0.00 c	0.00 c	0.55 a	0.36 a	0.92 a
Control 5.25 mg L <sup>-1</sup>	0.00 c	0.00 c	0.16 c	0.17 b	0.33 c
CV %	48.74	0.35	28.51	22.95	21.35

CV = coefficient of variation. Means followed by the same letters in the columns do not differ by the Scott-Knott test at 5% probability.

**Table 3.** Number of nodules, nodules dry matter, shoot dry matter, root dry matter, and total dry matter of bean plants inoculated with strains isolated from Amazon pasture land in different forms of N supply.

Strains	Number of nodules (NN plant <sup>-1</sup> )		
	CIAT 899	High N concentration (52.5 mg L <sup>-1</sup> )	Low N concentration (5.25 mg L <sup>-1</sup> )
UFLA 02-282	42.33 dA	0.00 aB	0.00 aB
UFLA 02-276	44.33 dA	0.00 aB	0.00 aB
UFLA 02-290	120.33 bA	0.00 aB	0.00 aB
UFLA 02-281	90.00 cA	0.00 aB	0.00 aB
UFLA 02-298	187.00 aA	0.00 aB	0.00 aB
UFLA 02-293	176.33 aA	0.00 aB	0.00 aB
UFLA 02-274	85.66 cA	0.00 aB	0.00 aB
Control	86.00cA	0.00 aB	0.00 aB
	Shoot dry matter (g plant <sup>-1</sup> )		
UFLA 02-282	0.34 bB	2.48 aA	0.26 bB
UFLA 02-276	0.39 bA	0.48 cA	0.27 bA
UFLA 02-290	0.45 bB	1.41 bA	0.33 bB
UFLA 02-281	1.06 aA	1.17 bA	0.53 bB
UFLA 02-298	1.37aB	2.08 aA	0.87 aB
UFLA 02-293	1.67 aA	2.13 aA	0.49 bB
UFLA 02-274	0.40 bB	1.50 bA	0.29 bB
Control	0.19 bB	0.92 bA	0.17 bB

(Continue)

**Table 3.** Number of nodules, nodules dry matter, shoot dry matter, root dry matter, and total dry matter of bean plants inoculated with strains isolated from Amazon pasture land in different forms of N supply.

(Conclusion)

Root dry matter (g plant <sup>-1</sup> )			
UFLA 02-282	0.26 aB	1.35 aA	0.32 aB
UFLA 02-276	0.32 aA	0.48 cA	0.34 aA
UFLA 02-290	0.44 aA	0.57 cA	0.41 aA
UFLA 02-281	0.42 aB	1.43 aA	0.58 aB
UFLA 02-298	0.49 aB	1.05 bA	0.64 aB
UFLA 02-293	0.59 aB	1.05 bA	0.50 aB
UFLA 02-274	0.34 aB	0.80 cA	0.38 aB
Control	0.50 aA	0.36 cB	0.37 aB
Total dry matter (g planta <sup>-1</sup> )			
UFLA 02-282	0.60 cB	3.84 aA	0.58 bB
UFLA 02-276	0.71 cA	0.96 cA	0.61 bA
UFLA 02-290	0.77 cA	0.87 cA	1.00 cB
UFLA 02-281	1.48 bB	2.61 bA	1.11 bB
UFLA 02-298	1.87 bB	3.13 bA	1.51 aB
UFLA 02-293	2.75 aA	2.95 bA	1.00 bB
UFLA 02-274	0.75 cB	2.30 bA	0.67 bB
Control	0.69 cB	1.30 bA	0.54 bB
Nitrogen accumulation in shoots (mg plant <sup>-1</sup> )			
UFLA 02-282	11.52 bB	96.57 aA	8.00 aC
UFLA 02-276	18.13 bB	26.98 dA	6.79 aC
UFLA 02-290	16.86 bB	73.26 bA	6.28 aC
UFLA 02-281	18.86 bB	47.63 cA	13.31 aC
UFLA 02-298	41.77 aB	59.52 bA	12.96 aC
UFLA 02-293	50.35 aB	78.20 bA	17.81 aC
UFLA 02-274	10.44 bB	46.11 cA	6.55 aB
Control	15.80 bB	26.86 dA	7.95 aC

Means followed by the same lowercase letter in the columns between the seven strains, and by uppercase letters in the columns between the forms of N supply, do not differ by the Scott-Knott test at 5% probability, CV = coefficient of variation.

**Table 4.** Nodules dry matter (NDM) of bean plants inoculated with strains isolated from Amazon pasture land in different forms of N supply.

Strains	Dry matter of nodules (mg planta <sup>-1</sup> )
UFLA 02-282	16 <sup>NS</sup>
UFLA 02-276	12
UFLA 02-290	55
UFLA 02-281	23
UFLA 02-298	27
UFLA 02-293	35
UFLA 02-293	16
Control	25
Forms of N supply	
CIAT 899	79 a
High N concentration (52.5 mg L <sup>-1</sup> )	0 b
Low N concentration (5.25 mg L <sup>-1</sup> )	0 b

Means followed by the same lowercase letters in the rows do not differ according to the Scott-Knott test at 5% probability.

**Table 5.** Genetic identification of Re-isolated strains from nodules of common bean obtained from co-inoculation experiment based on the most similar sequences found in GenBank (NCBI).

Re-isolated strains	Sequence length	Most similar sequences found in GenBank (NCBI)		
		Similarity (%)	Accession number	Species
UFLA 02-276	403	100	NR028987	<i>Pseudomonas tivilis</i>
UFLA 02-276	1291	100	GQ868355	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-276	812	99	KR088611	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-276	1014	100	KR088611	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-281	476	100	NR112073	<i>Pseudomonas monteilii</i>
UFLA 02-281	614	100	NR112073	<i>Pseudomonas monteilii</i>
UFLA 02-281	944	100	KR190330	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-281	960	99	KR190330	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-281	1220	100	KJ191411	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-293	654	100	NR102854	<i>Pseudomonas entomophila</i>
UFLA 02-282	895	100	KR349260	<i>Pseudomonas putida</i>
UFLA 02-282	1327	99	KM820291	<i>Pseudomonas putida</i>
CIAT899 Control	88	100	NR116874	<i>Rhizobium tropici</i>
CIAT 899 Control	627	100	NR102511	<i>Rhizobium tropici</i>
CIAT 899 T3	840	100	NR102511	<i>Rhizobium tropici</i>
CIAT 899 T3	564	100	NR102511	<i>Rhizobium tropici</i>
CIAT 899 T1R1	802	99	KT356836	<i>Rhizobium</i> sp.
CIAT 899 T1R2	1221	99	NR102511	<i>Rhizobium</i> sp.
CIAT 899 T1R3	899	100	KP205042	<i>Rhizobium</i> sp.
CIAT 899 T1R3	1166	100	LN833444	<i>Rhizobium</i> sp.
CIAT 899 T3R3	951	99	KP760691	<i>Rhizobium</i> sp.
CIAT 899 T18R3	1013	100	KP205042	<i>Rhizobium tropici</i>
CIAT 899 T18R4	865	99	KP137112	<i>Rhizobium tropici</i>
CIAT 899 T18R1	1223	100	NR102511	<i>Rhizobium</i> sp.
CIAT 899 T18R2	654	100	KF773126	<i>Rhizobium tropici</i>

**ARTIGO 2 - ESTIRPES BACTERIANAS CONTROLAM RIZOCTONIOSE E  
PROMOVEM CRESCIMENTO EM FEIJÃO-FAVA E FEIJÃO-COMUM EM  
COINOCULAÇÃO COM *Rhizobium tropici***

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NBR 6022 (ABNT,2003).**

Linnajara de Vasconcelos Martins Ferreira<sup>1</sup>; Fernanda de Carvalho<sup>2</sup>; Júlia Fonseca Colombo Andrade<sup>2</sup>; Fernando Pereira Monteiro<sup>3</sup>; Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros<sup>3</sup>; Fatima Maria de Sousa Moreira<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup>Instituto Federal do Pará/IFPA –Campus Marabá Rural, C.P. 041 – 68508-979- Marabá, PA-  
Brazil<sup>2</sup>; Universidade Federal de Lavras- Departamento de Ciência do Solo, Setor de  
Biologia, Microbiologia e processos bioquímicos do solo, C.P. 3037 - 37200-000 - Lavras,  
MG - Brazil. <sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras- Departamento de Fitopatologia, C.P. 3037 -  
37200-000 - Lavras, MG - Brazil.



## RESUMO

A produção de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) é limitada pela ocorrência da rizoctoniose, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani*. Nesse contexto, a busca por métodos alternativos, como o uso de bactérias como agentes de controle biológico, torna-se essencial, para a o aumento do rendimento de grão, para as culturas. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da inoculação com estirpes de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, e *Pseudomonas*, individualmente e em combinação com *Rhizobium tropici*, quanto ao potencial de biocontrole da rizoctoniose e de promoção de crescimento em plantas de feijão-comum e feijão-fava. Para isso, foram conduzidos experimentos, em casa de vegetação, em condições em condições xênicas, utilizando o feijão-comum cultivar Pérola e sementes crioulas de feijão-fava. A primeira etapa constituiu-se de experimentos, em que se avaliou o potencial de 14 estirpes, no controle da *R. solani* inoculadas, individualmente e em conjunto com estirpe CIAT 899 (*Rhizobium tropici*). Na segunda etapa, foram realizados experimentos, para avaliação da capacidade dessas 14 estirpes, em prover crescimento vegetal, em três formas de fornecimento de nitrogênio: Coinoculação com estirpe CIAT 899, na presença de alta e baixa concentração de nitrogênio mineral. O uso de rizobactérias combinadas com *R. tropici* contribui, de forma sinérgica, para a promoção de crescimento e controle da rizoctoniose em feijão fava e feijão-comum. A coinoculação das estirpes UFLA 02-286 (*Bacillus* sp.), UFLA 02-281 (*Pseudomonas* sp.) e UFLA 04-227 (*Burkholderia fungorum*) juntamente com *R. tropici* (CIAT 899) controlam a rizoctoniase em ambas as leguminosas. O fornecimento de N, na forma mineral no feijão-comum cv. Pérola, pode ser substituído pela coinoculação da CIAT 899 com as estirpes promotoras do crescimento vegetal UFLA 02-281, UFLA 02-286, UFLA 02-293. A produção de biomassa do feijão-fava coinoculadas com UFLA 02-286, UFLA 02-293, UFLA 04-195, UFLA 02-281 e UFPI B3-9 é aumentada.

**Palavras-chave:** *Phaseolus lunatus*. *Phaseolus vulgaris*. *Rhizoctonia solani*. Bactérias endofíticas. Rizóbio.

## ABSTRACT

The production of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and lima bean (*Phaseolus lunatus*) is limited by the occurrence of rhizoctoniosis. This disease is caused by the *Rhizoctonia solani* fungus. In this context, the search for alternative methods such as the use of bacteria as biological control agents becomes essential for increasing crop yields. The present study aimed at evaluating the effect of inoculation with *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* strains, either individually or in combination with *Rhizobium tropici*, on the biocontrol potential of rhizoctoniosis and growth promotion in both common bean and lima bean. Greenhouse experiments were conducted under axenic conditions using the Pérola cultivar (common bean) and lima bean seeds. In the first stage of the experiment, the potential of 14 strains in the control of *R. solani*, which was inoculated either individually or in conjunction with the CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) strain, were assessed. In the second stage, experiments were carried out to evaluate the capacity of these 14 strains to improve plant growth in plants growing in three different nitrogen supply media: Co-inoculation with the CIAT 899 strain, and in the presence of high and low concentration of mineral nitrogen. The use of rhizobacteria combined with *R. tropici* synergistically contributes to growth development as well as rhizoctoniosis control in both lima bean and common bean. The co-inoculation of the strains UFLA 02-286 (*Bacillus* sp.), UFLA 02-281 (*Pseudomonas* sp.) and UFLA 04-227 (*Burkholderia fungorum*) together with *R. tropici* (CIAT 899) had the ability to control rhizoctoniase in both bean cultivars. The supply of nitrogen in mineral form in common bean can be replaced by the co-inoculation of CIAT 899 with the following plant growth promoting strains: UFLA 02-281, UFLA 02-286, and UFLA 02-293. The biomasses production of lima bean that were co-inoculated with UFLA 02-286, UFLA 02-293, UFLA 04-195, UFLA 02-281 and UFPI B3-9 were increased.

**Keywords:** *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizoctonia solani*, endophytic bacteria, rhizobia.

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por patógenos de plantas que vivem no solo dificultam seriamente a produção do (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). A rizoctoniose, causada pelo fungo do solo *Rhizoctonia solani* Kühn, é uma doença que acomete essas duas culturas causando redução na produtividade. Em áreas infestadas com *R. solani*, o dano ocorre, principalmente, até três semanas, após o plantio e os sintomas característicos da doença são podridão da semente e raiz, o cancro no hipocótilo e tombamento de plântulas (LAMARI; BERNIER, 1985).

O controle da *R. solani* é muito difícil, principalmente, em razão da elevada agressividade do patógeno, transmissibilidade pelas sementes e alta capacidade de sobrevivência no solo, mesmo na ausência da planta hospedeira (ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005). Para prevenir a doença, os produtores feijão-comum de feijão-fava abandonam as áreas infectadas e migram, para áreas não infectadas, causando grandes perdas econômicas, em decorrência da desvalorização das áreas abandonadas.

Os métodos tradicionais de controle, como uso de variedades resistentes, fungicidas e cobertura morta, não garantem controle satisfatório da doença e outros métodos devem ser combinados aos existentes, para manter a doença abaixo do limiar de dano econômico. Segundo a literatura, seleção de genótipos de feijoeiro (SINGH et al., 2007) e do feijão-fava (ASSUNÇÃO et al., 2011), visando à busca de fontes de resistência genética, para o controle do tombamento e mela, ainda, constitui um desafio, não havendo, ainda, cultivares comerciais brasileiras disponíveis no mercado com esse atributo. Nesse sentido, a busca por métodos alternativos, como o uso de bactérias como agentes de controle biológico, torna-se essencial, para a o aumento do rendimento de grãos. Dentre os organismos capazes de interagir com plantas e agir como agentes de biocontrole, estão as rizobactérias, conhecidas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPRs).

Alguns isolados de PGPRs, além de proporcionar o controle biológico da rizoctoniose, aumentam a nodulação e fixação de nitrogênio, por afetar a interação entre a leguminosa e rizóbio (VALVERDE et al., 2006; EGAMBERDIEVA et al., 2010; YADEGARI et al., 2010). O feijoeiro e o feijão-fava são duas leguminosas que se beneficiam do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Esse processo representa um dos principais contribuintes, para a disponibilidade de nitrogênio, em culturas agrícolas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Na literatura, não é relatada a introdução de PGPR, no controle da rizoctoniose, para a cultura do feijão-fava, no entanto, já existem alguns estudos para o feijoeiro como os

observados por Elkoca, Turan e Donmez (2010) e Martins (2013). Nesses dois estudos, a inoculação com PGPR, além de promover redução da rizoctoniose, também, demonstrou influência positiva, no peso seco de nódulos e, ainda, promoveu o dobro do número de nódulos.

Nesse estudo, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação com estirpes de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* combinado ou não com *Rhizobium tropici* quanto ao potencial de biocontrole da rizoctoniose e de promoção de crescimento em plantas de feijão-comum e feijão-fava.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 14 estirpes obtidas da coleção bacteriana do laboratório de microbiologia do solo da Universidade Federal de Lavras que promoveram o crescimento em leguminosas: a UFPI B3-9 (*Bacillus* sp.) e UFPI B4-9 (*Paenibacillus* sp.) (COSTA et al., 2013); UFLA 03-10 (*Paenibacillus* sp.) e UFLA 03-107 (*Bacillus subtilis*) (MARRA et al., 2012); UFLA 04-122, UFLA 04-227 e UFLA 04-195 (*Burkholderia fungorum*) (FERREIRA et al., 2012); UFLA 03-885, UFLA 03-18 e UFLA 03-26 (OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014); UFLA 02-290, UFLA 02-286 (*Bacillus* sp.), UFLA 02-281 (*Pseudomonas* sp.) e UFLA 02-293 (*Pseudomonas entomophila*) (FERREIRA et al., 2017).

### 2.1 Desinfestação das sementes

Antes da semeadura, as sementes de feijão-fava (cultivar Pérola) e sementes crioulas de feijão-fava foram desinfestadas, superficialmente, utilizando-se álcool etílico a 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio a 2% (2 minutos) e, em seguida, submetidas a lavagens sucessivas em água destilada estéril.

### 2.2 Preparo dos inoculantes bacterianos

Para o preparo dos inoculantes, as estirpes foram cultivadas, em meio de cultura 79 (FRED; WAKSMAN, 1928) líquido, sob agitação de 110 rpm, a 28°C, por um período de 3 dias. No momento da semeadura, foi adicionado 1 mL do inoculante sobre as sementes previamente desinfestadas. Nos controles sem inoculação, foi adicionado 1 mL do meio de cultura esterilizado.

### 2.3 Preparo do inóculo fitopatogênico

O inóculo de *R. solani* (CML1846) obtido da Coleção Micológica da Universidade Federal de Lavras foi preparado, em frascos de Erlenmeyer, contendo 100 g de substrato, constituído de arroz descascado autoclavado (120°C, 30 min, 1 atm), com adição de 40 mL de água destilada. Em cada frasco, foram colocados três discos de 5 mm de diâmetro de cultura do fungo, previamente cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA), com sete dias de cultivo. Após um período de incubação de 10 dias a 25 °C, o substrato colonizado pelo patógeno foi acondicionado em sacos de papel e colocado para secar por 48 horas. Posteriormente, o substrato colonizado foi triturado em liquidificador e pesado conforme a alíquota a ser incorporada ao solo (NORONHA; MICHEREFF; MARIANO, 1995).

#### 2.4 Experimento de eficiência de diferentes estirpes bacterianas no controle de *Rhizoctonia solani* nas culturas do feijoeiro e feijão-fava

Os ensaios foram conduzidos entre os meses de junho a agosto de 2015, em casa de vegetação do laboratório de fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, utilizando amostras de um Latossolo vermelho distroférico (pH = 5,6; N: 1,030 ppm; P = 3 mg/dm<sup>3</sup>; K = 0,14 cmolc/dm<sup>3</sup>; Al = 1,40 cmolc/dm<sup>3</sup>; Ca+Mg = 0,80 cmolc/dm<sup>3</sup>) misturadas com areia lavada, na promoção de 2:1, respectivamente. A mistura foi, previamente autoclavada, duas vezes por 60 minutos, à pressão de 1,5 kg cm<sup>2</sup>, a 121°C. Após 15 dias, o solo autoclavado foi acondicionado em vasos plásticos de 500 mL e infestados com *R. solani* (CML1846), pela incorporação de substrato colonizado na concentração de 50 mg kg<sup>-1</sup> de solo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições e 32 tratamentos, os quais foram constituídos por inoculações individuais com 14 estirpes de bactérias; coinoculação da estirpe CIAT 899 aprovada pelo MAPA como inoculante para o feijoeiro, juntamente com 14 estirpes de bactérias; Inoculação individual da CIAT 899; Inoculação individual da estirpe 629 *Bacillus amyloлицefaciens* isolada de *Theobroma cacao* (LEITE et al., 2013); coinoculação da estirpe 629 com a CIAT 899; e um controle sem aplicação de inoculante.

A inoculação do patógeno foi realizada no solo com 60% de capacidade de campo e 24 horas antes do plantio. O preparo dos inoculantes com as estirpes de bactérias bem como a inoculação das sementes foram realizados conforme descrito anteriormente.

As plantas foram avaliadas quanto à germinação e severidade da doença, de acordo com o descrito por Noronha, Michereff e Mariano (1995). Os dados de severidade foram medidos, a cada 3 dias, durante 15 dias após a emergência e foram transformados, para índice de doença, de acordo com McKinney (1923) e usados, para cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), de acordo com Shanner e Finney (1977). Os experimentos foram repetidos por duas vezes, nas mesmas condições de condução, em um intervalo de 30 dias. A temperatura, no interior da casa de vegetação, variou de 22 a 25 °C e 24 a 27 °C para o primeiro e segundo experimentos, respectivamente.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância individual, posteriormente, realizou-se análise conjunta envolvendo as repetições dos experimentos, observando-se a homogeneidade dos quadrados médios residuais entre as repetições dos experimentos. Nos casos de efeito significativo de tratamentos, a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. As análises de variância e aplicação dos testes foram realizadas utilizando-se o *software* de análise estatística Sisvar® (FERREIRA, 2011).

## **2.5 Experimento de Influência da densidade do inóculo de *Rhizoctonia solani* na severidade da rizoctoniose do feijoeiro e do feijão-fava.**

As estirpes mais promissoras obtidas nas etapas anteriores como agentes de biocontrole de *R. solani* foram avaliados sob diferentes níveis de inóculo do fitopatógeno no solo. No momento do plantio, as sementes foram previamente inoculadas e plantadas em vasos de 500 mL com solo e areia na proporção de 2:1, respectivamente (o mesmo descrito anteriormente) autoclavado previamente infestado com substrato colonizado por *R. solani* (CML1846) nas concentrações de 0,00 50, 100, 150 e 200 mg kg<sup>-1</sup> de solo. A avaliação foi efetuada conforme descrito anteriormente. O delineamento estatístico utilizado foi em esquema fatorial, inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e, em seguida, às análises de variância, teste de média (Scott-Knott a 5% de probabilidade) e regressão polinomial, para as concentrações de inóculo no solo, utilizando o programa estatístico SISVAR 4.2 (FERREIRA, 2011).

## **2.7 Experimento de eficiência de diferentes estirpes bacterianas no controle de *Rhizoctonia solani* in vitro**

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Utilizou-se meio de cultura com os exsudatos de sementes de feijão-comum. As sementes foram imersas em água, na proporção de 0,5 kg de sementes, para 1L de água destilada, e acondicionadas em geladeira por três dias. Após esse período, foi adicionado agar bacteriológico (16 g L<sup>-1</sup>) e autoclavado por 30 minutos e vertidos em plantas de petri. As estirpes bacterianas foram crescidas em meio de cultura 79 líquido sem azul de bromotimol sob agitação de 110 rpm, a 28°C, por um período de 3 dias. A densidade de célula foi ajustada à escala de 0,5 mcFarland. No centro da placa, foi colocado um disco de 5 mm de diâmetro de cultura fúngica (CML1846), previamente cultivado em meio batata-dextrose-ágar (BDA), com sete dias de cultivo. Em volta do fungo, foram pipetados 20 µl com o meio de cultura líquido, contendo as estirpes bacterianas.

Os tratamentos foram constituídos por seis estirpes (UFLA 03-18, UFLA 02-286, UFLA 227, UFLA 02-281, UFLA 03-885 e UFLA 04-195), inoculadas individualmente e coinoculadas com a CIAT 899; Inoculação individual da CIAT 899; e controle com inoculação apenas do fungo, totalizando 32 tratamentos com 4 repetições. O experimento foi avaliado até 20 dias após a inoculação do fungo e das estirpes bacterianas. A avaliação se deu pela medição do halo de inibição produzido pelas estirpes bacterianas. O experimento foi repetido por duas vezes, nas mesmas condições de condução, em um intervalo de 10 dias.

## 2.6 Experimento de inoculação e coinoculação do feijoeiro e do feijão-fava com bactérias promotoras do crescimento vegetal

As 14 estirpes descritas anteriormente foram utilizadas, para avaliar o potencial de promoção do crescimento no feijão-comum e feijão-fava, quando submetidas à inoculação e a coinoculação com a estirpe de rizóbio CIAT 899.

Os experimentos, para cada cultura, foram conduzidos no laboratório de microbiologia do solo da Universidade Federal de Lavras, em vasos de Leonard (VINCENT, 1970), contendo solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950). Na parte superior do vaso de Leonard, foi adicionada uma mistura 1:1 de areia e vermiculita, respectivamente. Após o preparo dos vasos e da solução nutritiva, eles foram autoclavados por uma hora, à pressão de  $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$ , a  $121^\circ\text{C}$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições em esquema fatorial ( $15 \times 3$ ), sendo sete estirpes e três formas de fornecimento de N: inoculação individual das sete estirpes de bactérias, na presença de baixa ( $5,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) e alta ( $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) concentração de N mineral na solução nutritiva; coinoculação das 14 estirpes com a CIAT899, um controle positivo, referente à inoculação individual com estirpe CIAT899 e dois controles negativos sem inoculação, um com alta concentração de N mineral ( $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e o outro com baixa concentração de N mineral ( $5,25 \text{ mg L}^{-1}$ ).

As sementes do feijoeiro e do feijão-fava foram desinfestadas, superficialmente, conforme anteriormente descrito. Em cada vaso, foram semeadas quatro sementes e inoculadas com 1 mL da cultura crescida em meio 79 (FRED; WAKSMAN, 1928) líquido com as estirpes na fase log de crescimento ( $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) em cada semente. Nos tratamentos sem inoculação, foram adicionados apenas 1 ml de meio 79 líquido esterilizado.

Após a semeadura e a inoculação, os vasos foram recobertos com uma camada de areia parafinada (10 kg de areia, 1 mL de clorofórmio e 10 g de parafina) com a finalidade de evitar possíveis contaminações. O desbaste foi realizado, cinco dias após a emergência, deixando-se uma planta por vaso. Durante a condução do experimento, a solução nutritiva foi preparada, autoclavada e repostada nos vasos, periodicamente, de acordo com a taxa de absorção das plantas.

Aos 40 dias, após a semeadura, as plantas foram coletadas, para determinação do número de nódulos (NN), produções de massa de matéria seca de nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR), e total (MST) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA). Para a determinação da MSN e MSPA, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para o experimento de autenticação. Depois da pesagem, a parte aérea foi moída, para as



determinações dos teores de N, pelo método semimicro Kjeldahl (LIAO, 1981), O acúmulo de nitrogênio nas folhas foram calculados, multiplicando-se a massa seca da parte aérea (g) pelo (teor % de N)/100.

Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2011). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS

Não foi verificada a interação entre os tratamentos e as repetições dos experimentos havendo apenas efeito individual. Comparando os resultados entre os experimentos, para a cultura do feijoeiro, observou-se que houve diferença significativa, para a altura de planta, número de nódulo, matéria seca da raiz e total e índice de doença, apresentando as maiores médias de crescimento, produção de matéria seca e os menores índices de doença no segundo experimento (Tabela 1). Para as demais variáveis, não foi observada diferença.

Nenhum tratamento proporcionou a inibição total de germinação para o feijoeiro, sendo 65% a menor percentagem observada (Tabela 1). Os tratamentos coinoculados UFLA 04-227 + CIAT, UFLA 02-290 + CIAT, UFLA 02-290 + CIAT, UFLA 02-281 + CIAT, UFLA 02-293 + CIAT e inoculado individualmente com UFLA 04-195 apresentaram 100% de germinação.

A altura variou de 2,95 cm planta<sup>-1</sup> (controle) a 5,81 cm planta<sup>-1</sup> (UFPI+B4-9) (Tabela 1). Os tratamentos coinoculados UFLA 04-122 + CIAT, UFLA 04-195 + CIAT e UFLA 02-281 + CIAT ficaram em um grupo superior aos demais tratamentos.

Nas plantas do feijoeiro, a nodulação só ocorreu, nos tratamentos coinoculados com a CIAT 899, havendo grande variação entre os tratamentos. As estirpes UFLA 02-290 e UFLA 02-281 inoculada juntamente com a CIAT 899 apresentaram destaque para essa variável. Os tratamentos UFPI B4-9 + CIAT 899, UFLA 03-107 + CIAT, UFLA 04-195 + CIAT, UFLA 03-885 + CIAT, UFLA 02-293 + CIAT ficaram em um grupo inferior aos tratamentos UFLA 02-290 + CIAT e UFLA 02-281 + CIAT, porém superior aos demais tratamentos (Tabela 1).

A matéria seca dos nódulos, também, apresentou médias variáveis dentro dos tratamentos coinoculados. Os tratamentos UFPI B4-9 + CIAT 899, UFLA 04-227 + CIAT, UFLA 03-885 + CIAT, UFLA 02-290 + CIAT, UFLA 02-281 + CIAT UFLA 02-293 + CIAT apresentaram as maiores médias de matéria seca de nódulo (Tabela 1). Os demais tratamentos ficaram no mesmo grupo do tratamento inoculado individualmente com a CIAT 899.

O tratamento com a coinoculação da UFLA 02-281 + CIAT promoveram as maiores médias de produção de matéria seca da parte aérea seguidas dos tratamentos UFLA 04-227 + CIAT, UFLA 03-18 + CIAT 899, UFLA 02-290 + CIAT, UFLA 02-286 + CIAT e inoculação individual da CIAT 899 (Tabela 1). Sete tratamentos ficaram no mesmo grupo do tratamento controle.

Observou-se que os tratamentos UFPI B4-9, UFPI B3-9, UFLA 04-227, UFLA 04-195, UFLA 03-885 com e sem coinoculação com CIAT 899 apresentaram as maiores médias de produção de matéria seca de raiz. A inoculação das plantas com a UFLA 02-290, UFLA

02-290 + CIAT e UFLA 02-293 não interferiu, na produção dessa variável, visto que ficaram no mesmo grupo do tratamento controle (Tabela 1).

A coinoculação da UFLA 04-227 + CIAT resultou em maior resposta de produção de matéria seca total seguida dos tratamentos UFLA 04-227, UFLA 04-195 + CIAT, UFLA 02-290 + CIAT e UFLA 02-286 + CIAT. Pode-se observar que 23 tratamentos ficaram em um grupo inferior, ao citado anteriormente, mais superior ao tratamento controle.

O índice de doença variou de 35 % (UFLA 02-286 + CIAT899) a 96,67 (tratamento controle). Quatro tratamentos dos demais, sendo eles todos coinoculados (UFLA 04-227 + CIAT, UFLA 03-18 + CIAT 899, UFLA 02-281 + CIAT e UFLA 02-286 + CIAT), mostraram o efeito positivo dessa junção de estirpes de gêneros diferentes. Os demais tratamentos inoculados e coinoculados ficaram no mesmo grupo do tratamento controle (Tabela 1).

A área abaixo da curva de progressão da doença variou de 2843,75 a 5406,25, para os tratamentos UFLA 04-227 + CIAT e controle, respectivamente, na cultura do feijoeiro. Os tratamentos que apresentaram menores médias de doença tenderam a menores valores de AACPD.

Não foi verificada a interação entre os tratamentos e as repetições dos experimentos, exceto para matéria seca de raiz. Houve apenas efeito individual para as demais variáveis. Conforme observado na Tabela 2, o primeiro experimento apresentou as maiores médias exceto para altura de planta. Os menores índices de doença, também, foram encontrados no primeiro experimento.

As sementes de feijão-fava germinaram 100% nos tratamentos com inoculação individual da UFLA 02-281 e a coinoculação UFLA 02-286 + CIAT (Tabela 2). Observou-se que a inoculação e a coinoculação não influenciaram na germinação para os tratamentos UFLA 02-293, UFLA 02-293 + CIAT, UFLA 03-18 + CIAT, UFLA 04-227 e UFPI B3-9 + CIAT, visto que estes ficaram no mesmo grupo que o tratamento controle, no entanto, apresentaram os menores valores médios de geminação.

A altura das plantas variou de 3,65 a 6,88 cm planta<sup>-1</sup> para o tratamento controle e o tratamento UFPI B4-9 + CIAT 899, respectivamente. O maior crescimento das plantas do feijão-fava foi encontrado nos tratamentos coinoculados UFPI B4-9 + CIAT, UFLA 04-122 + CIAT 899, UFLA 04-227 + CIAT e UFLA 02-281 + CIAT. Esses resultados mostram o efeito positivo da inoculação (Tabela 2).

A inoculação influenciou, positivamente, a produção de matéria seca total, nos tratamentos UFLA 02-281 + CIAT (0,39 g planta<sup>-1</sup>) e UFLA 02-286 + CIAT (0,37 g planta<sup>-1</sup>), mesmo com a presença do patógeno (Tabela 2). Um grupo de 24 tratamentos apresentou médias inferiores a essas estirpes, no entanto, superiores ao tratamento controle.

As médias de matéria seca total variaram, de acordo com os tratamentos, apresentando as maiores médias para os tratamentos coinoculados UFPI B4-9 + CIAT 899, UFLA 02-281 + CIAT e UFLA 02-286 + CIAT. A inoculação com a estirpe UFLA 02-293 (0,16 g planta<sup>-1</sup>) não influenciou a produção de matéria seca total, visto que os valores médios foram semelhantes ao tratamento controle (0,12 g planta<sup>-1</sup>) (Tabela 2).

Os tratamentos coinoculados UFLA 04-227 + CIAT, UFLA 04-195 + CIAT, UFLA 03-885 + CIAT, UFLA 03-18 + CIAT, UFLA 02-281 + CIAT reduziram o índice de doença na cultura do feijão-fava (Tabela 2). Os demais tratamentos ficaram no mesmo grupo de controle sem inoculação e tratamento químico.

A área abaixo da curva de progressão da doença variou de 2345,34 a 5406,25 para os tratamentos UFLA 04-227 + CIAT e controle, respectivamente, no feijão-fava. Os tratamentos que apresentaram menores médias de doença tenderam menores valores de AACPD.

A produção de matéria seca da raiz apresentou maiores médias, para o primeiro experimento, exceto para os tratamentos UFPI B4-9 + CIAT 899, UFLA 04-122 + CIAT 899 e UFLA 02-281 + CIAT 899 que apresentaram os mesmos valores nos dois experimentos (Tabela 3). No primeiro experimento, 19 tratamentos ficaram em um grupo superior a ao controle 11 coinoculados. No segundo experimento, também, foram observadas as maiores produções dessa variável nos tratamento, coinoculados.

Avaliando a influência da densidade do inóculo de *R. solani*, na severidade da rizoctoniose, não foi observada a presença da doença, quando não se inoculou o fungo ao solo. Quando as plantas de feijoeiro foram cultivadas em solo infestado com diferentes densidades do inóculo de *R. solani*, os tratamentos coinoculados apresentaram alta reação de resistência ao patógeno no 50 mg kg<sup>-1</sup> a densidade do inóculo no solo (Figura 1) e foram semelhantes aos observados, na seleção preliminar, com a mesma densidade de inóculo. Na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> a densidade do inóculo no solo, UFLA 04-227 + CIAT 899 e UFLA 02-286 + CIAT 8999 permaneceram, moderadamente resistentes, apresentando comportamento semelhante ao controle químico. A dose máxima estimada, para os tratamentos anteriores, é de 165,84 e 177,68 mg kg<sup>-1</sup> de inóculo no solo, respectivamente. Nas densidades de 150 e 200 mg kg<sup>-1</sup>, todos os tratamentos apresentaram a reação de susceptibilidade (Figura 1). Portanto,

os tratamentos UFLA 04-227 + CIAT 899 e UFLA 02-286 + CIAT 899 e o tratamento com a inoculação individual da CIAT 899 apresentaram reação de resistência *R. solani* a superior aos demais tratamentos apenas até a dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> a densidade do inóculo no solo.

No cultivo de feijão-fava em solo infestado com diferentes densidades do inóculo de *R. solani*, os tratamentos UFLA 02-281 + CIAT 899, UFLA 03-885 + CIAT 899, UFLA 04-195 + CIAT 899 e UFLA 04-227 + CIAT 899, apresentaram alta reação de resistência ao patógeno no 50 mg kg<sup>-1</sup> a densidade do inóculo no solo (Figura 2) e foram semelhantes aos observados na seleção preliminar com a mesma densidade de inóculo. A aplicação de 100 mg kg<sup>-1</sup> de densidade do inóculo no solo, os tratamentos UFLA 03-885 + CIAT 899, UFLA 04-227 + CIAT 899, UFLA 04-195 + CIAT 899 apresentaram resistência moderada. A dose máxima estimada, para esses tratamentos, é 181,03, 183,64 e 186,31 mg kg<sup>-1</sup> a densidade do inóculo no solo, respectivamente. Assim como no experimento com o feijoeiro, à medida que se aumentou a dose do inóculo fúngico ao solo, a severidade foi evidenciada com maior intensidade e, nas doses de 150 200 mg kg<sup>-1</sup> a densidade do inóculo no solo, todos os tratamentos apresentaram baixa redução de infestação nas plantas.

Nos dois experimentos para testar a inibição *in vitro*, verificou-se que as estirpes controlaram a doença de forma consistente (Tabela 4). Para os tratamentos UFLA 04-195 e UFLA 03-18, a inibição só foi observada quando coinoculados com a CIAT 899. No entanto, para os demais tratamentos, a inibição ocorreu com a inoculação individual ou em conjunto com a CIAT 899. Não ocorreu diferença entre os diâmetros do halo de inibição entre os tratamentos e experimentos.

### **Inoculação e coinoculação do feijoeiro e do feijão-fava com bactérias promotoras do crescimento vegetal**

Ao avaliar a matéria seca da parte aérea das plantas de feijão-fava, observou-se que as estirpes UFLA 03-107, UFLA 02-290, UFLA 02-293 e UFLA 02-286 não diferiram quanto à forma de fornecimento de N, no entanto, para as demais estirpes estudadas, os melhores resultados foram encontrados com o cultivo em alta concentração de nitrogênio (Tabela 5). A coinoculação das estirpes UFLA 02-293, UFLA 02-286, UFLA 04-195, UFLA 04-227, UFLA 02-281, UFPI B3-9 com a CIAT 899 obtiveram as melhores médias de produção de matéria seca total dentro dessa forma de fornecimento de N. Em alta concentração de nitrogênio, a inoculação individual da estirpe UFLA 03-18 proporcionou melhor resultado para essa variável. Em baixa concentração de N, também, foi verificado o bom desempenho

da estirpe UFLA 03-18 acrescida das UFLA 04-227, UFLA 04-195, UFLA 03-18 e UFLA 02-293 em promover o crescimento de plantas de feijão-fava.

Para a produção de matéria seca total, as três formas de fornecimento de N tiveram o mesmo comportamento com a inoculação das estirpes UFLA 03-107, UFLA 02-290, 04-227, UFLA 03-885 e UFLA 02-293 (Tabela 5). Para os demais tratamentos, o fornecimento do nitrogênio em altas concentrações proporcionou os melhores resultados. Avaliando, individualmente, cada forma de fornecimento de nitrogênio, verificou-se que a coinoculação da CIAT 899 com as estirpes UFLA 04-227 (5,06 g planta<sup>-1</sup>) e UFLA 02-286 (4,08 g planta<sup>-1</sup>) proporcionou os melhores resultados para essa variável, no entanto, para as estirpes UFLA 03-10 (1,63 g planta<sup>-1</sup>) e UFLA 03-26 (2,54 g planta<sup>-1</sup>), houve um redução de produção de matéria seca da total, visto que os valores médios foram inferiores ao controle (3,11 g planta<sup>-1</sup>). Em alta concentração de nitrogênio, o tratamento com a inoculação da UFLA 03-18 (9,52 g planta<sup>-1</sup>) se destacou das demais. Pode-se observar, também, uma redução de matéria seca total com a inoculação das estirpes UFLA 03-107 (3,80 g planta<sup>-1</sup>), UFLA 02-290 (4,27 g planta<sup>-1</sup>), UFLA 03-10 (5,10 g planta<sup>-1</sup>), UFLA 03-885 (3,70 g planta<sup>-1</sup>), UFLA 04-227 (5,51 g planta<sup>-1</sup>) e UFLA 02-293 (5,85 g planta<sup>-1</sup>) e essas ficaram em um grupo inferior ao tratamento controle. Em baixa concentração de nitrogênio, seis estirpes (UFLA 03-885, UFLA 04-227, UFLA 04-227, UFLA 03-18 e UFLA 02-293) ficaram em um grupo superior aos demais tratamentos.

Ao avaliar nas três formas de fornecimento de nitrogênio, nenhuma das estirpes inoculadas proporcionou acúmulo de nitrogênio na parte aérea semelhante entre si (Tabela 5). Apenas cinco estirpes (UFLA 03-107, UFLA 02-290, UFLA 03-885, UFLA 02-293 e UFLA 02-286), quando coinoculadas com a CIAT 899, promoveram médias equivalentes aos tratamentos conduzidos em alta concentração de nitrogênio mineral. Observando, individualmente, cada forma de fornecimento de nitrogênio, os tratamentos UFLA 04-227 e UFPI B3-9, quando inoculados na presença de baixa concentração de N com ou sem coinoculados com a CIAT 899, ficaram em um grupo superior às demais estirpes. Em altas concentrações de nitrogênio, as estirpes UFPI B4-9 (200,08 mg planta<sup>-1</sup>) e UFLA 03-18 (230,27 mg planta<sup>-1</sup>) que, também, destacaram-se, quando coinoculadas com a CIAT 899, promoveram médias superiores aos demais tratamentos, inclusive, do controle (147,50 mg planta<sup>-1</sup>). Observa-se que a estirpe UFLA 03-18 foi a única que se destacou dentro das três formas de fornecimento de nitrogênio.

Para a matéria seca de raiz (Tabela 6), verificou-se efeito apenas, para as formas de fornecimento de nitrogênio, em que os tratamentos em alta concentração de nitrogênio

mineral obtiveram média (2,054 g planta<sup>-1</sup>) superior aos tratamentos inoculados com a CIAT 899 (1,54 g planta<sup>-1</sup>) e em baixa concentração de nitrogênio (1,34 g planta<sup>-1</sup>).

Nas plantas de feijoeiro, foi verificada a nodulação apenas nos tratamentos coinoculados com a CIAT 899 (Tabela 7). Observou-se efeito positivo da coinoculação para algumas estirpes estudadas. Para o número de nódulo, a coinoculação das estirpes UFLA 03-18 (154,66 NN planta<sup>-1</sup>), UFLA 02-281 (137,00 NN planta<sup>-1</sup>), UFLA 04-195 (186,21) e UFLA 03-26 (146,67 NN planta<sup>-1</sup>) com a CIAT 899 obtiveram-se as maiores médias para essa variável, no entanto, para matéria seca de nódulo, apenas a estirpe UFLA 03-10 (0,97 g planta<sup>-1</sup>) se diferenciou dos demais tratamentos. As 13 estirpes restantes ficaram no mesmo grupo do tratamento controle.

Para matéria seca da parte aérea, observou-se que a inoculação da estirpe UFLA 03-885 proporcionou média semelhante nas três formas de fornecimento de nitrogênio (Tabela 7). Os tratamentos coinoculados UFLA 290, UFLA 02-281, UFLA 02-286, UFLA 02-293 com a CIAT 899 promoveram melhor desempenho quando comparado ao cultivo com alta concentração de nitrogênio. Com destaque, para a estirpe UFLA 02-293, em que a média para essa variável, para os tratamentos com ou sem coinoculação, em baixa concentração, não diferiram. Ao avaliar, individualmente, cada forma de fornecimento de nitrogênio, observou-se que as estirpes apresentaram comportamento variado. A estirpe UFLA 03-10 se destacou tanto coinoculada com a CIAT 899 (2,21 g planta<sup>-1</sup>) e quando inoculada individualmente (3,20 g planta<sup>-1</sup>) em alta concentração de nitrogênio. O mesmo se observa, para as estirpes UFLA 04-195 e UFLA 03-26, quando inoculadas individualmente e cultivadas em alta ou baixa concentração de nitrogênio.

Para a produção de raiz, a inoculação da UFLA 03-18, nas três formas de fornecimento de nitrogênio, foram semelhantes (Tabela 7). Observou-se uma redução de produção dessa variável para a coinoculação das estirpes UFLA 02-290 (0,30 g planta<sup>-1</sup>), UFLA B4-9 (0,34 g planta<sup>-1</sup>) e UFLA 04-122 (0,56 g planta<sup>-1</sup>) com a CIAT 899. Não foi observada diferença, para as médias de produção de raiz, para os tratamentos inoculados com a UFLA 03-885 e UFLA 04-227, quando cultivados em baixa concentração de nitrogênio e coinoculado com a CIAT 899 e em alta concentração de nitrogênio inoculadas individualmente.

Avaliando o comportamento, individualmente, dentro de cada forma de fornecimento de nitrogênio, duas estirpes (UFLA 04-122 e UFLA 03-26) promoveram as maiores médias de matéria seca de raiz para as três situações (Tabela 7). Observou-se redução de produção de

raiz para os tratamentos coinoculados UFLA 02-290, UFLA B4-9, UFLA B3-9 e UFLA 03-10 com a CIAT 899.

A produção de matéria seca total foi semelhante, para as três formas de fornecimento de nitrogênio, com a inoculação das estirpes UFLA 02-290 e UFLA 02-293. Para a inoculação da estirpe UFLA 03-885, não houve diferença, quando as plantas de feijão-comum foram cultivadas na presença de alta concentração de nitrogênio e em baixa concentração com a coinoculação da CIAT 899 (Tabela 7). A inoculação individual da estirpe UFLA 03-107, em baixa concentração de nitrogênio, foi o único tratamento que promoveu matéria seca total inferior aos tratamentos coinoculados com a CIAT 899.

Dentro de cada forma de fornecimento de nitrogênio, três estirpes (UFLA 02-281, UFLA 02-286 e UFLA 02-293), quando coinoculadas com a estirpe CIAT 899, obtiveram médias superiores de matéria seca total aos demais tratamentos e o mesmo foi verificado, para o cultivo do feijoeiro, em baixa concentração de nitrogênio e com inoculação individual acrescido das estirpes UFLA 02-290, UFLA 04-122, UFLA 04-195 e UFLA 03-26 (Tabela 7). No cultivo do feijoeiro em alta concentração de nitrogênio, a inoculação de oito estirpes (UFLA B4-9, UFLA 04-227, UFLA 03-10, UFLA 02-281, UFLA 04-122, UFLA 03-107, UFLA 04-195 e UFLA 03-26) promoveram médias de matéria seca total superior ao tratamento controle.



#### 4 DISCUSSÃO

O gênero rizóbio, recomendada para produção de inoculantes, para a cultura do feijoeiro é *Rhizobium tropici* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991), que compreende as estirpes comerciais CIAT 899 (= BR 322 = SEMIA 4077), PRF 81 (=BR 520 = SEMIA 4080) e H12 (= SEMIA 4088). Essa espécie é relatada como sendo, geneticamente, mais estável e mais tolerante a estresses que outras espécies de rizóbio, como temperaturas elevadas e acidez do meio, sendo mais adaptada às condições de solos tropicais (GRAHAM, 1992). No presente estudo, a inoculação individual da CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) não inibiu a doença causada pelo patógeno, em ambas as culturas estudadas, apenas, quando coinoculadas com estirpes de outros gêneros, porém estirpes de *Rhizobium* podem apresentar a capacidade de inibir os fungos fitopatogênicos, como observado por Buonassisi et al. (1986). Entre as 15 estirpes de *Rhizobium* testadas pelos autores, duas reduziram, significativamente, a podridão de raiz em plantas de feijão infectados, artificialmente, com *Fusarium solani*.

As RPCPs atuam como agentes de controle biológico, por meio da produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada (CHEN et al., 1999; PIETERESE et al., 2001). Os tratamentos, em que foram verificados os menores índices de doença, apresentaram tendência a produzir maior produção de biomassa para as duas culturas. Isso pode ser atribuído ao fato de que RPCPs atuam, também, promovendo diretamente o crescimento pela produção de ácido cianídrico, fito-hormônios, enzimas como a ACC-deaminase, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, fixação do nitrogênio e aumento da absorção pelas raízes (SAMAVAT et al., 2012; Costa et al. 2013; OLIVEIRA-LONGATTI; MARRA; MOREIRA, 2013; OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014).

As estirpes UFLA 02-286 (*Bacillus* sp.), UFLA 02-281 (*Pseudomonas* sp.) e UFLA 04-227 (*Burkholderia* sp.) coinoculadas juntamente com a CIAT 899 foram as que apresentaram inibição do fungo para as duas culturas. Na literatura, os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são conhecidos como inibidores de patógenos vegetais, no entanto, o gênero *Burkholderia*, ainda, não foi estudado quanto ao seu potencial em controlar a *R. solani*. Esse gênero foi relatado com bactérias endofíticas de nódulos, como descrito por Li et al. (2008). Quatro estirpes bacterianas isoladas, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* L. cultivadas em solo de Marrocos, foram identificadas como *Burkholderia phymatum* (TALBI et al., 2010). Recentemente, Ferreira et al. (2012), também, mostraram que bactérias do gênero *Burkholderia* isoladas de solos ácidos, na região amazônica, são capazes de formar nódulos, quando inoculados em *Phaseolus vulgaris*. Nos experimentos de teste de inibição

com vaso com solo, não foi observada nodulação, nas duas culturas estudadas, porém atuaram como promotoras de crescimento.

Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* colonizam, rapidamente, o sistema radicular das plantas e promovem aumento, no crescimento das plantas e rendimento de grãos e, também, suprimem vários microrganismos patogênicos (KHARE et al., 2011; LAVAKUSHA et al., 2014). Os *Bacillus* spp. são muito atraentes como potenciais inoculantes em agricultura, pois produzem esporos muito resistentes que podem sobreviver por períodos prolongados no solo (KUMAR et al., 2016). São escassas as pesquisas que visam ao estudo do controle biológico com bactérias endofíticas na cultura do feijão-fava sendo mais encontrados para outras culturas.

Em casa de vegetação, estirpes de *B. subtilis* (AP323, AP3, AP183) e *Pseudomonas* fluorescentes (FR38, CR26, TR48) protegeram mais efetivamente plântulas de feijão contra o tombamento causado por *R. solani*. (ANDRADE et al., 1994). O efeito do tratamento de sementes de caupi com *B. subtilis* e *Pseudomonas* sp. no controle de *R. solani* reduziu a intensidade da doença em condições de campo e foi superior ao tratamento químico (NORONHA et al., 1995). Sementes de algodão foram tratadas com 40 isolados bacterianos e 67 *Pseudomonas* sp. Fluorescentes, também, para controle *R. solani*. O isolado BA-20 (*B. subtilis*) foi o mais eficiente, em todas as situações, exceto, quando comparado ao tratamento químico em condições controladas. Quando testado em campo com diferentes níveis de inóculo do patógeno, BA-20 não reduziu, significativamente, a intensidade da doença, o que foi obtido pelo uso do fungicida quintozene nos dois primeiros níveis de inóculo (SILVA et al., 1996).

Houve grande variação, na performance das estirpes, para o controle de *R. solani* em ambas as culturas. No entanto, apenas os tratamentos coinoculados com *R. Tropici* (UFLA 02-286 + CIAT899, UFLA 02-281 + CIAT899, UFLA 04-227 + CIAT899, UFLA 03-18 + CIAT899, UFLA 03-885 + CIAT899, UFLA 04-195 + CIAT899) apresentaram eficiência semelhante ao fungicida Certeza na concentração de 50 mg kg<sup>-1</sup> de inóculo no solo. Há vários relatos que revelam que estirpes de rizóbio coinoculados com outros RPCPs controlam melhor os fungos patogênicos que sozinhos. Em estudo realizado nos Estados Unidos, verificou-se que estirpes de *B. subtilis*, em combinação com *R. tropici* no tratamento de sementes do feijoeiro, limitou o desenvolvimento da podridão radicular causado por *R. solani*. (JEASEN; PERCICH; GRAHAM, 2012). Em lentilha, a coinculação de *Rhizobium* sp. com estirpes de *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes* promove o biocontrole de *Fusarium* (AKHTAR; SHAKEEL; SIDDIQUI, 2010). A incidência da doença causada pelo patógeno

*Sclerotium rolfsii* foi diminuída, significativamente, em plantas de grão de bico pelo efeito sinérgico da coinoculação de estirpes de *Rhizobium* sp. e *Pseudomonas* sp. (HAMEEDA et al., 2010). A eficiência da coinoculação de estirpe de gêneros diferentes indica uma estratégia importante, na produção de feijão, reduzindo a necessidade de tratamento químico das sementes.

Quando as estirpes foram testadas em diferentes níveis de inoculo fúngico no solo, a coinoculação UFLA 03-18 + CIAT899, UFLA 02-286 + CIAT899, CIAT899 demonstraram controle no mesmo nível que o fungicida certeza para 150 mg kg<sup>-1</sup> de solo na cultura do feijoeiro. Porém, as plantas de feijão-fava apresentaram mais sensíveis à doença apresentando índice, relativamente, mais alto que o feijoeiro, nas doses de 150 e 200 mg kg<sup>-1</sup> de inoculo para todos os tratamentos.

O teste de inibição *in vitro* confirmou a capacidade das estirpes UFLA 03-18, UFLA 02-286, UFLA 04-227, UFLA 02-281, UFLA 03-885 e UFLA 04-195 controlarem a rizoctoniose em combinação com *Rhizobium tropici*. Este estudo, embora preliminar, permite vislumbrar a utilização desses endofíticos na supressão de doenças

Em vaso Leonard com diferentes formas de fornecimento de nitrogênio, verificou-se efeito variado, para as estirpes estudadas, nas duas culturas. No feijoeiro, a nodulação foi influenciada, positivamente, pela coinoculação, promovendo as maiores produções de biomassa nas plantas. Em alguns casos, superior aos tratamentos cultivados em altas concentrações de N como observado na inoculação UFLA 02-290, UFLA 02-281, UFLA 02-286 e UFLA 02-293 juntamente com a CIAT 899. Coinoculação de rizóbios, em conjunto com outra PGPR, têm mostrado melhores respostas à nodulação, fixação de nitrogênio e outras variáveis tais como o crescimento vegetativo, produtividade, controle biológico, em comparação com a inoculação individual de PGPR (Figueiredo et al. 2008). STAJKOVIC et al. (2011) relataram um efeito significativo de coinoculation com *Pseudomonas* sp. e *R. phaseoli* em crescimento, bem como acúmulo de N e P Plantas do feijoeiro em comparação com a inoculação com *Rhizobium* sozinho. A Coinoculação de estirpes *Bacillus* com *Bradyrhizobium* resultou no aumento da nodulação e crescimento de plantas de *Vigna radiata* (SINDHU et al., 2002).

Tal fato pode ser atribuído aos efeitos positivos dessa combinação, no cultivo de leguminosas, por proporcionar maior crescimento e absorção de nutrientes, conforme verificado em plantas de lentilha pela coinoculação de *Pseudomonas* sp. e *Rhizobium leguminosarum* (MISHRA et al., 2011) e aumento da nodulação em *Cajanus cajan* por meio

da coinoculação de *Pseudomonas putida* com *Rhizobium* (TILAK; RANGANAYAKI; MANOHARACHARI, 2006).

O feijão-fava apresenta a capacidade de realizar o processo de FBN, entretanto, os estudos sobre a simbiose e a bactéria associada ao feijão-fava são escassos. No presente trabalho, não se verificou a nodulação por nenhuma estirpe inoculada, no entanto, observou-se a promoção do crescimento, nas diferentes formas de fornecimento de nitrogênio, em especial, quando coinoculado com a CIAT 899 juntamente com estirpes UFLA 02-286, UFLA 02-293, UFLA 04-195, UFLA 02-281 e UFPI B3-9, demonstrando elevada produção de biomassa, nas plantas de feijão-fava, em vaso Leonard com baixa concentração de nitrogênio na solução nutritiva. É importante ressaltar que a estirpe UFLA 02-286 (*Bacillus* sp.), isolada de solo de pastagem, na Amazônia, apresentou destaque, também, no controle da *R. solani* quando inoculadas com a CIAT 899. Apesar da CIAT 899 ser autorizada como inoculante ao feijoeiro, apresentou efeito promotor de crescimento na cultura do feijão-fava, quando coinoculada com estirpes de *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia*.

## 5 CONCLUSÕES

As estirpes de *Pseudomonas* sp. (UFLA 02-286, UFLA 03-18 e UFLA 03-885) *Burkholderia fungorum* (UFLA 04-195 e UFLA 04-227) e *Pseudomonas* sp. (UFLA 02-281) coinoculadas com *Rhizobium tropici* (CIAT 899) apresentam eficiência no controle da *Rhizoctonia solani*. A coinoculação das estirpes UFLA 02-286 (*Bacillus* sp.), UFLA 02-281 (*Pseudomonas* sp.) e UFLA 04-227 (*Burkholderia fungorum*) juntamente com *Rhizobium tropici* (CIAT 899) inibem a rizoctoniase em plantas de feijão-fava e feijão-comum. A inoculação das 14 estirpes com a CIAT 899 promovem crescimento variado nas diferentes formas de fornecimento de N. O fornecimento de N na forma mineral pode ser substituído pela coinoculação da CIAT 899 com as estirpes promotoras do crescimento vegetal UFLA 02-281, UFLA 02-286, UFLA 02-293 na cultura do feijão-comum. A produção de biomassa do feijão-fava coinoculada com a CIAT 899 e UFLA 02-286, UFLA 02-293, UFLA 04-195, UFLA 02-281 e UFPI B3-9 é aumentada. Ensaios em condições de campo são necessários para validar esses resultados promissores em uma escala maior.

## REFERÊNCIAS

- AKHTAR, M. S.; SHAKEEL, U.; SIDDIQUI, Z. A. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. **Turkish Journal of Biological**, v. 34, n. 1, p. 1-7, Feb. 2010.
- ANDRADE, D. E. G. T. et al. Bean seed bacterization with *Bacillus* spp. and fluorescent pseudomonads for *Rhizoctonia solani* biocontrol. In: RYDER M. H.; STEPHENS, P. M.; BOWEN, G. D. (Ed.). **Improving plant productivity with rhizosphere bacteria**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p. 77-79.
- ASSUNÇÃO, I. P. et al. Reaction of faba bean genotypes to *Rhizoctonia solani* and resistance stability. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 492-497, out./ dez. 2011.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. C. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba SP. FEALQ. 2005. p. 51-80.
- BUONASSISI, A. J. et al. Effect of *Rhizobium* spp. on *Fusarium* sp. *Phaseoli*. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ontario, v. 8, n. 2, p. 140-146, 1986.
- CHEN, C. et al. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, Orlando, v. 5, n. 1, p. 83-91, Mar. 1995.
- COSTA. E. M. et al. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, set. 2013.
- EGAMBERDIEVA, D. et al. Coinoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). **European Journal of Soil Biology**, Mountroge, v. 46, n. 3, p. 269-272, May 2010.
- ELKOCA, E.; TURAN, M.; DONMEZ M. F. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* on nodulation nutrient uptake, yield and parameters of common bean (*Phaseolu vulgaris*). **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 33, n. 14, p. 2104-2119, Oct. 2010.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR software**: versão 5.1. Lavras: UFLA/DEX, 2011. Software.
- FERREIRA, L. V. M. et al. Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from the Amazon pasture land. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, 2017. No prelo.
- FERREIRA, P. A. A. et al. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from Amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal of Microbiology and Biotechnololy**, New York, v. 28, n. 5, p. 1947-1959, May 2012.
- FRED. E. B.; WAKSMAN. S.A. **Laboratory manual of gen microbiology**. New York: McGraw-Hill Book, 1928. p. 143.
- GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 475-484, 1992.

- HAMEEDA, B. et al. Biological control of Chickpea collar rot by coinoculation of antagonistic bacteria and compatible rhizobia. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 50, n. 4, p. 419–424, Oct. 2010.
- HOAGLAND. D. R.; ARNON. D. T. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experiment Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).
- JEASEN, C. E.; PERCICH, J. A.; GRAHAM, P. H. Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 74, n. 2/3, p. 107-115, Mar. 2002.
- KHARE, E. et al. Suppression of charcoal rot of chickpea by fluorescent *Pseudomonas* under saline stress condition. **Current Microbiology**, New York, v. 62, p. 1548–1553, 2011.
- KUMAR, P. et al. Bacteria consortium optimization improves nutrient uptake, nodulation, disease suppression and growth of the common bean *Phaseolus vulgaris* in both pot and field studies. **Rhizosphere**, New York, v. 160, p. 325-336, Sept. 2016.
- LAMARI, L.; BERNIER, C. C. Etiology of seedling blight and root rot of faba bean (*Vicia faba*) in Manitoba. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 7, p. 139-145, 1985.
- LAVAKUSHA et al. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). **Ecological Engineering**, Oxford, v. 62, p. 123–128, Jan. 2014.
- LEITE, H. A.C. et al. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 6, p. 2639-2651, Mar. 2013.
- LI, J. H. et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean cultivated in Heilongjiang province of China. **Soil Biology Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 1, p. 238-246, Jan. 2008.
- LIAO C. F. H. Devarda's allow methods for total nitrogen determination. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 45, p. 852-855, 1981.
- MARTINEZ-ROMERO et al. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 41, n. 3, p. 417-426, July 1991.
- MARTINS, S. A. **Desenvolvimento do feijão-comum tratado com *Bacillus subtilis***. 2013. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- MCKINNEY. R. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, p.195-218, 1923.
- MISHRA, P. K. et al. Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. and Rhizobium *leguminosarum*-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.). **European Journal Soil Biology**, Montrouge, v. 47, n. 1, p. 35-43, Jan. 2011.

- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.
- NORONHA, M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 174-178, 1995.
- OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. et al. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 30, p. 1239-1250, Nov. 2014.
- OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M. MOREIRA, F. M. S. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 7, n. 11, p. 948-959, Mar. 2013.
- MARRA, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant Soil**, The Hague, v. 357, n. 1, p. 289-307, Aug. 2012.
- PIETERESE, C. M. J. et al. Rhizobacteria-mediated induced Systemic resistance: triggering, signaling, and expression. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 51-61, Jan. 2001.
- SAMAVAT, S. et al. Promoting common bean growth and Nitrogen Fixation by the Co-Inoculation of *Rhizobium* and *Pseudomonas fluorescens* Isolates. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, Sofia, v. 18, n. 3, p. 387-395, June 2012.
- SHANNER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, p. 1051-1056, 1997.
- SILVA, J. B. et al. Efeito da bacterização de sementes de algodoeiro no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 342-348, 1996.
- SINDHU, S. S. et al. Enhancement of green gram nodulation and growth by *Bacillus* species. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 45, n. 1, p. 117-120, Mar. 2002.
- SINGH, P. et al. Seventy-five years of breeding dry bean of the western USA. **Crop Science**, Madison, v. 47, n. 3, p. 981-989, May 2007.
- STAJKOVIC, O. et al. Improvement of common bean growth by inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucurest, v. 16, n. 1, p. 5919-5926, 2011.
- TALBI, C. et al. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 13, p. 4587-4591, July 2010.
- TILAK, K. V. B.; RANGANAYAKI, R. N.; MANOHARACHARI, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeon pea. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 67-71, Feb. 2006.



VALVERDE, A. et al. Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. **Plant Soil**, The Hague, v. 287, n. 1-2, p. 43-50, Mar. 2006.

VINCENT, J. M. (Ed.). **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. p. 164.

YADEGARI, M. et al. Evaluation of bean [*Phaseolus vulgaris*] seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 9, p. 792-799, 2008.

Tabela 1 - Valores médios de altura (H), germinação (GERM), matéria seca da parte aérea (MSPA) da raiz (MSR) e total (MST), índice de doença (ID) e área abaixo da curva da progressão da doença (AACPD) de plantas de feijoeiro cultivadas em vasos com solo autoclavado em casa de vegetação.

Experimentos	GERM	H	NN	MSN	MSPA	MSR	MST	ID	AACPD
	%	cm planta <sup>-1</sup>	NN planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	-----g planta <sup>-1</sup> -----			%-	
1°	86,29	3,51 b	6,31b	7,47	0,15	0,068 b	0,18 b	73,03a	4335,69
2°	85,30	4,65 a	7,75a	7,36	0,12	0,094 a	0,21 a	69,60 b	4370,83
<b>Tratamentos</b>									
UFPI B4-9	85,0 b	3,31d	0,00 f	0,00 c	0,08 e	0,11 a	0,19 d	78,75 a	4526,04 c
UFPI B4-9 + CIAT*	83,8 b	5,81 <sup>a</sup>	13,00 b	17,31 a	0,08 e	0,10 a	0,18 d	75,63 a	4312,50 c
UFPI B3-9	80,0 c	3,77 c	0,00 f	0,00 c	0,10 e	0,11 <sup>a</sup>	0,21 c	77,19 a	4958,33 b
UFPI B3-9 + CIAT	65,0 d	4,73 b	9,38 d	13,63 b	0,12 d	0,11 <sup>a</sup>	0,23 c	78,75 a	4552,08 c
UFLA 03-10	95,0 a	3,66 c	0,00 f	0,00 c	0,11 d	0,08 b	0,19 d	71,25 a	4593,75 c
UFLA 03-10 + CIAT	95,0 a	3,56 d	12,31 c	13,25 b	0,13 d	0,08 c	0,23 c	83,96 a	4296,88 c
UFLA 03-107	92,5 a	4,32 b	0,00 f	0,00 c	0,13 d	0,08 b	0,23 c	73,02 a	4333,33 c
UFLA 03-107 + CIAT	75,0 c	3,12 d	16,63 b	11,88 b	0,13 d	0,08 b	0,23 c	72,50 a	4437,50 c
UFLA 04-122	85,0 b	3,21 c	0,00 f	0,00 c	0,13 d	0,09 b	0,24 c	76,67 a	4437,50 c
UFLA 04-122 + CIAT	70,0 d	5,11 a	11,19 c	11,00 b	0,12 d	0,08 b	0,22 c	74,58 a	4312,50 c
UFLA 04-227	90,0 b	5,21 a	0,00 f	0,00 c	0,14 d	0,11 a	0,25 b	71,46 a	4468,75 c
UFLA 04-227 + CIAT	100,0 a	5,32 a	16,3 b	19,13 a	0,19 b	0,11 a	0,30 a	45,62 b	2843,75 d
UFLA 04-195	100,0 a	4,43 b	0,00 f	0,00 c	0,11 d	0,10 a	0,21 c	74,58 a	4562,50 c
UFLA 04-195 + CIAT	95,0 a	5,12 a	13,63 b	11,88 b	0,14 d	0,11 a	0,25 b	78,75 a	4546,88 c
UFLA 03-885	85,0 b	3,34 d	0,00 f	0,00 c	0,10 d	0,10 a	0,20 c	75,63 a	4437,50 c
UFLA 03-885 + CIAT	100,0 a	3,19 d	15,80 b	19,00 a	0,13 d	0,10 a	0,23 c	73,54 a	4562,50 c
UFLA 03-18	80,0 c	3,45 c	0,00 f	0,00 c	0,12 d	0,08 b	0,22 c	74,58 a	4187,50 c
UFLA 03-18 + CIAT	65,0 d	4,54 b	9,50 d	10,00 b	0,19 b	0,08 b	0,20 c	42,50 b	3125,00 d
UFLA 03-26	80,0 c	4,22 b	0,00 f	0,00 c	0,09 e	0,09 b	0,18 d	79,17 a	4500,00 c
UFLA 03-26 + CIAT	95,0 a	4,32 c	7,88 d	9,88 b	0,11 d	0,07 c	0,18 d	72,50 a	4375,00 c
UFLA 02-290	77,5 c	3,32 d	0,00 f	0,00 c	0,08 e	0,05 d	0,13 e	76,67 a	4437,50 c
UFLA 02-290 + CIAT	100,0 a	3,87 d	22,13a	21,58 <sup>a</sup>	0,20 b	0,06 d	0,26 b	78,75 a	4026,04 c
UFLA 02-281	75,0 c	4,23 b	0,00 f	0,00 c	0,12 d	0,08 b	0,20 c	74,06 a	4312,50 c
UFLA 02-281 + CIAT	100,0 a	5,12 a	18,3a	22,50 <sup>a</sup>	0,23 a	0,05 d	0,19 c	42,42 b	4687,50 c
UFLA 02-286	65,0 d	3,76 c	0,00 f	0,00 c	0,08 e	0,08 c	0,15 e	72,50 a	4104,17 c
UFLA 02-286 + CIAT	95,0 a	4,45 b	10,88 c	12,63 b	0,20 b	0,07 c	0,27 b	35,00 b	4750,00 c
UFLA 02-293	95,0 a	4,18 c	1,38 e	1,25 c	0,08 e	0,06 d	0,14 e	92,29 a	4625,00 c
UFLA 02-293 + CIAT	100,0 a	4,18 b	14,88 b	24,30 <sup>a</sup>	0,11 d	0,07 c	0,18 d	80,84 a	4625,00 c
629	85,0 b	4,34 b	2,38 e	0,00 c	0,10 e	0,07 c	0,16 d	71,88 b	4520,83 c
629 + CIAT	87,5 b	4,34 b	9,50 d	11,88b	0,09 e	0,07 c	0,18 d	69,58 a	4647,29 c
CIAT 899	75,0 c	4,55 b	8,25 d	8,62 b	0,19 b	0,07 c	0,16 c	68,41 a	4666,67 c
Controle	60,0 d	2,95 d	0,00 f	0,00 c	0,07 e	0,05 d	0,13 e	96,67 a	5406,25 a

Dentro do fator "Experimentos", médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade. Dentro de "Tratamentos", médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. \*CIAT 899.

Tabela 2 - Valores médios de altura (H), germinação (GERM), matéria seca da parte aérea (MSPA) da raiz (MSR) e total (MST), índice de doença (ID) e área abaixo da curva da progressão da doença (AACPD) de plantas de feijão-fava cultivadas em vasos com solo autoclavado em casa de vegetação.

Experimentos	GERM --%--	H --cm--	MSPA --g planta <sup>-1</sup> --	MST	ID --%--	AACPD
1 <sup>a</sup>	83,0a	5,15 b	0,26 a	0,37 a	67,12b	4265,45
2 <sup>a</sup>	81,7b	5,42 a	0,22 b	0,29 b	79,31 a	4731,12
<b>Tratamentos</b>						
UFPI B4-9	77,5 c	4,41d	0,35 b	0,48 b	68,23 a	4644,14 c
UFPI B4-9 + CIAT 899	83,1 b	6,88 a	0,35 b	0,67a b	85,45 a	3325,10 d
UFPI B3-9	75,0 c	4,85 c	0,33 b	0,45 b	67,43 a	3918,33 d
UFPI B3-9 + CIAT 899	65,0 d	5,63 b	0,27 c	0,39 c	88,49 a	4334,21 c
UFLA 03-10	95,0 a	4,76 c	0,17 d	0,25 e	71,69 a	3433,75 c
UFLA 03-10 + CIAT 899	80,0 c	4,46 d	0,17 d	0,28 d	73,98 a	4296,88 c
UFLA 03-107	92,5 a	5,44 b	0,27 c	0,33 d	83,94 a	4543,24 c
UFLA 03-107 + CIAT 899	75,0 c	4,22 d	0,22 d	0,31 d	62,39 a	4325,28 c
UFLA 04-122	85,0 b	5,20 c	0,29 c	0,35 c	66,10 a	3135,21 d
UFLA 04-122 + CIAT 899	82,5 b	6,15 a	0,18 d	0,25 e	84,23 a	4632,24 c
UFLA 04-227	65,0 d	5,35 b	0,21 d	0,27 d	81,39 a	4225,56 c
UFLA 04-227 + CIAT 899	92,5 a	6,40 a	0,33b	0,45 b	48,49 b	2345,34 d
UFLA 04-195	92,5 a	5,60 b	0,28 c	0,36 c	84,73 a	4562,13 c
UFLA 04-195 + CIAT 899	95,0 a	6,10 a	0,32 b	0,48 b	38,94 b	3531,23 d
UFLA 03-885	83,8 b	4,58 d	0,18 d	0,26 d	87,82 a	4243,45 c
UFLA 03-885 + CIAT 899	98,8 a	4,63 d	0,35 b	0,41 b	40,38 b	3545,54 d
UFLA 03-18	80,0 c	5,00 c	0,15 d	0,24 e	84,89 a	3108,32 d
UFLA 03-18 + CIAT 899	65,0 d	5,18 c	0,18 d	0,32 d	80,30 b	4245,21 c
UFLA 03-26	80,0 c	5,43 b	0,31 e	0,40 c	76,39 a	4523,32 c
UFLA 03-26 + CIAT 899	80,0 c	5,00 c	0,22 d	0,34 d	71,81 a	4375,32 c
UFLA 02-290	85,0 c	4,35 d	0,16 d	0,23 e	83,94 a	5456,45 a
UFLA 02-290 + CIAT 899	80,0 c	4,65 d	0,26 c	0,32 d	81,59 a	5423,23 a
UFLA 02-281	100,0 a	5,45 b	0,33 b	0,39 c	79,94 a	4134,43 b
UFLA 02-281 + CIAT 899	75,0 c	6,03 a	0,39 a	0,63 a	42,09 b	3431,45 d
UFLA 02-286	100,0 a	4,98 c	0,32 b	0,36 c	82,69 a	4563,25 d
UFLA 02-286 + CIAT 899	100,0 a	4,38 d	0,37 a	0,59 a	35,92 b	4651,45 c
UFLA 02-293	65,0 d	5,11 c	0,10 e	0,16 f	82,04 a	4722,42 b
UFLA 02-293 + CIAT 899	65,0 d	5,41 b	0,20 d	0,30 d	70,59 a	5225,34 a
629	85,0 b	5,70 b	0,15 d	0,24 e	81,38 a	4325,45 c
629 + CIAT 899	85,7 b	5,83 b	0,15 d	0,29 d	69,84 a	4743,54 c
CIAT 899	75,0 c	5,25 b	0,25 c	0,36 c	60,39 a	4456,34 c
Controle	60,0 d	3,95 d	0,08 e	0,12 f	95,39 a	5556,32 a

Dentro do fator "Experimentos", médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade, Dentro de Tratamentos", médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Valores médios de altura (H) de plantas de feijão-fava cultivadas em vasos com solo autoclavado em casa de vegetação.

Tratamentos	MSR (g planta <sup>-1</sup> )	
	1ª experimento	2ª experimento
UFPI B4-9	0,13 aB	0,15 aA
UFPI B4-9 + CIAT 899	0,11 aA	0,10 bA
UFPI B3-9	0,15 aA	0,12 aB
UFPI B3-9 + CIAT 899	0,13 bA	0,12 aA
UFLA 03-10	0,09 bA	0,07 bB
UFLA 03-10 + CIAT 899	0,12 aA	0,10 bB
UFLA 03-107	0,07 bA	0,05 cB
UFLA 03-107 + CIAT 899	0,10 aA	0,08 bB
UFLA 04-122	0,08 bA	0,06 cB
UFLA 04-122 + CIAT 899	0,08 bA	0,07 cA
UFLA 04-227	0,07 bA	0,05 cB
UFLA 04-227 + CIAT 899	0,12 aA	0,10 bB
UFLA 04-195	0,08 bA	0,06 cB
UFLA 04-195 + CIAT 899	0,10 aA	0,08 bB
UFLA 03-885	0,12 aA	0,10 bB
UFLA 03-885 + CIAT 899	0,09 bA	0,07 cB
UFLA 03-18	0,09 bA	0,07 cB
UFLA 03-18 + CIAT 899	0,14 aA	0,12 aB
UFLA 03-26	0,11 aA	0,09 bB
UFLA 03-26 + CIAT 899	0,14 aA	0,12 aB
UFLA 02-290	0,12 ab	0,04 cB
UFLA 02-290 + CIAT 899	0,11 aA	0,06 cB
UFLA 02-281	0,09 bA	0,05 cB
UFLA 02-281 + CIAT 899	0,10 aA	0,11 bA
UFLA 02-286	0,08 bA	0,05 cB
UFLA 02-286 + CIAT 899	0,13 aA	0,06 cB
UFLA 02-293	0,12 aA	0,05 cB
UFLA 02-293 + CIAT 899	0,12 aB	0,05 cB
629	0,09 bA	0,07 cB
629 + CIAT 899	0,09 bA	0,07 cB
CIAT 899	0,13 aA	0,11 aB
Controle	0,06 bA	0,04 cB

Dentro do fator, médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Dentro de "Tratamentos", médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

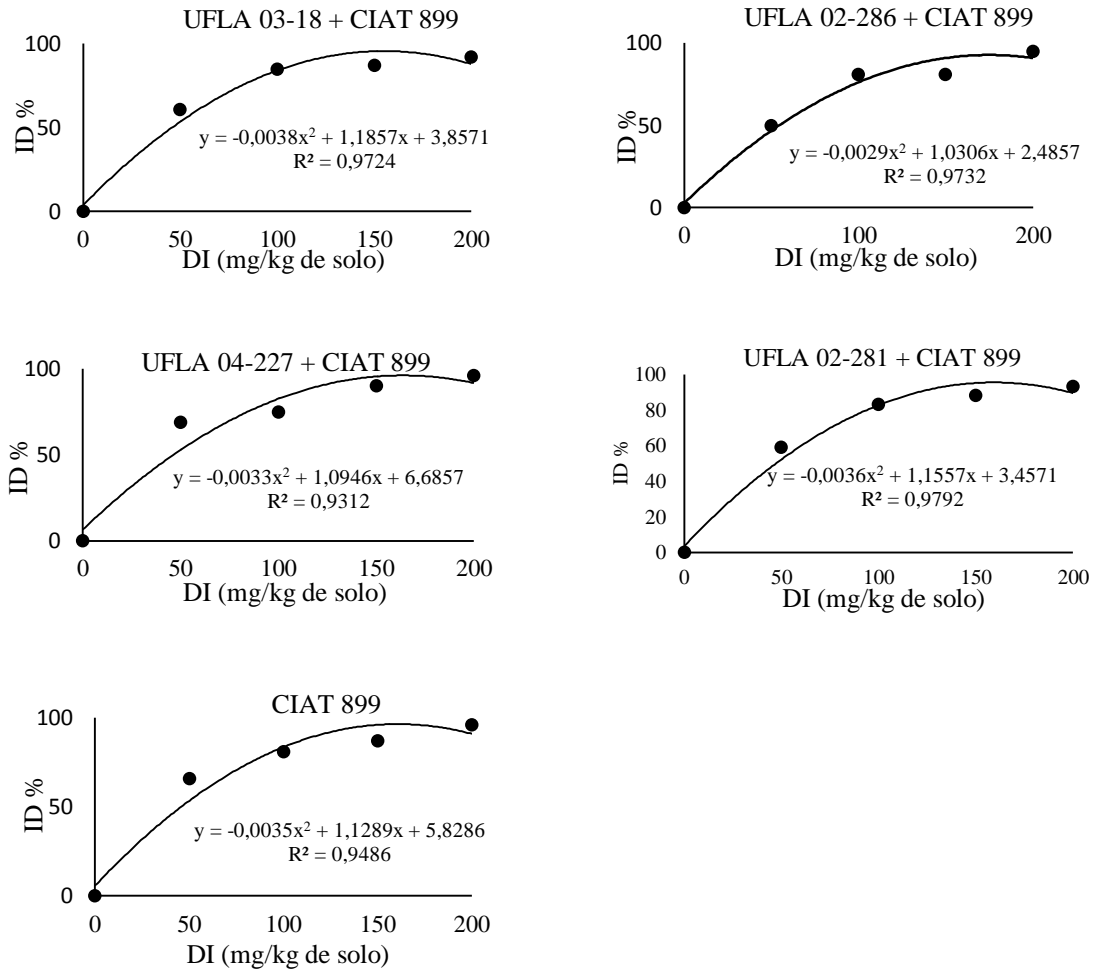


Figura 1 - Influência da densidade do inoculo (DI) de *Rhizoctonia solani* no índice de doença em feijoeiro, em condições de casa-de-vegetação.

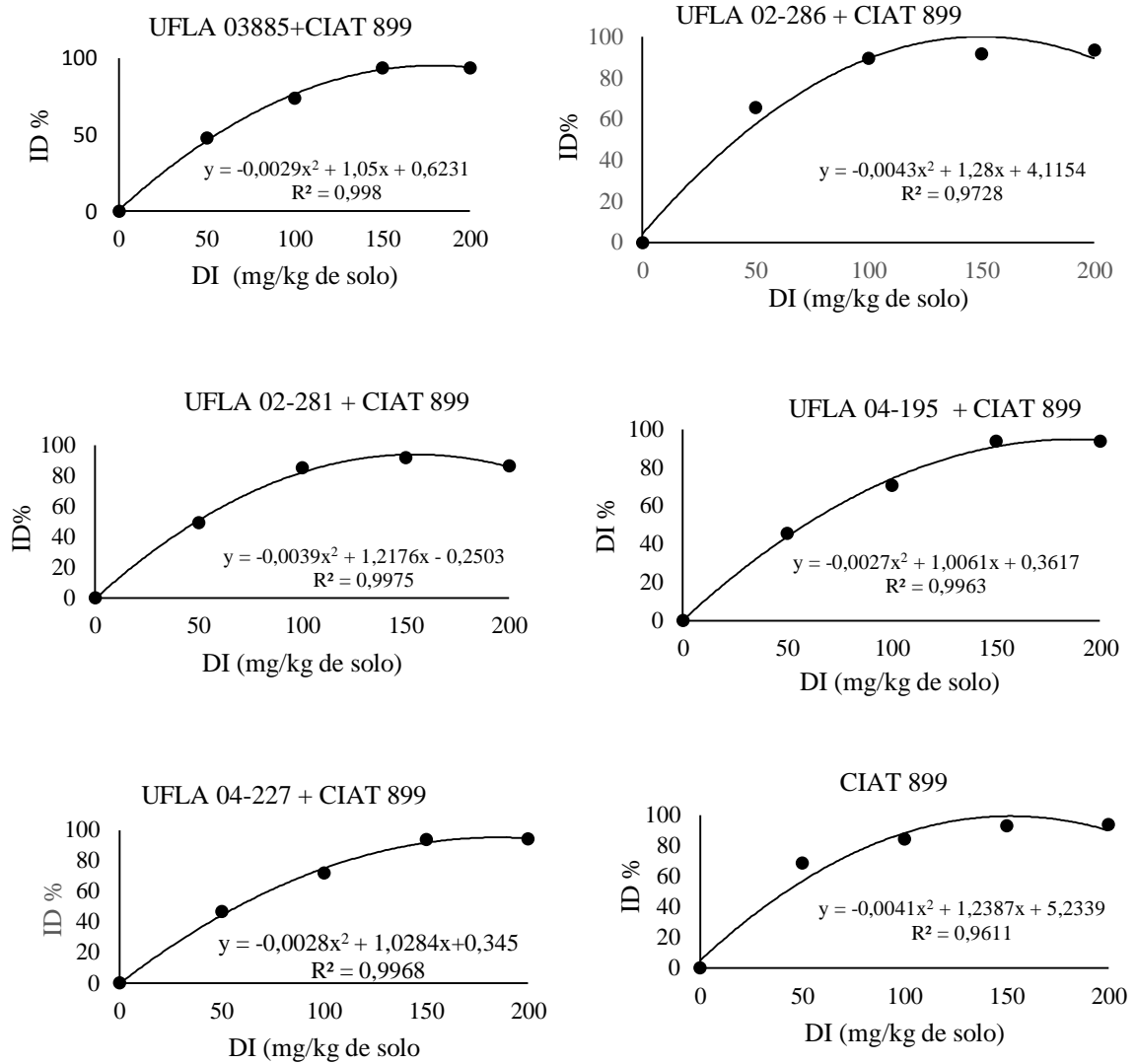


Figura 2 - Influência da densidade do inoculo (DI) de *Rhizoctonia solani* no índice de doença (ID) em feijão-fava, em condições de casa-de-vegetação.

Tabela 4 - Diâmetro do halo de inibição de *Rhizoctonia solani in vitro* por estirpes bacterianas inoculadas individualmente ou em combinação com *Rhizobium tropici*.

Experimento	Formação do alo de inibição (cm)
1°	3,4
2°	3,3
Tratamentos	
UFLA 04-227	3,3
UFLA 04-227 + CIAT 899	3,2
UFLA 04-195	0
UFLA 04-195 + CIAT 899	3,1
UFLA 03-885	3,1
UFLA 03-885 + CIAT 899	3,1
UFLA 03-18	0
UFLA 03-18 + CIAT 899	3,3
UFLA 02-281	3,1
UFLA 02-281 + CIAT 899	3,3
UFLA 02-286	3,3
UFLA 02-286 + CIAT 899	3,0
CIAT 899	3,1
Controle	0

Tabela 5 - Matéria seca da parte aérea, e total e acúmulo de nitrogênio da parte aérea de feijão-fava inoculadas com estirpes bacterianas em diferentes formas de fornecimento de N cultivado em vaso Leonard.

(Continua)

Estirpes	CIAT	Alta concentração de N (52,5 mg N L <sup>-1</sup> )	Baixa concentração de N (5,25 mg N L <sup>-1</sup> )
Matéria seca da parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )			
UFLA03-107	1,77 bA	1,94 dA	1,4 2 bA
UFLA 0310	0,85 bB	3,64 cA	1,54 bB
UFLA 02-290	2,14 bA	1,94 dA	1,55 bA
UFPI B3-9	3,37 aB	4,87 cA	1,85 bB
UFLA 02-281	2,34 aB	4,40 cA	1,91 bB
UFPI B4-9	1,94 bB	5,35 bA	1,94 bB
UFLA 04-122	1,67 bB	5,06 bA	1,97 bB
UFLA 03-26	1,55 bB	5,25 bA	2,25 bB
UFLA 03-885	1,54 bB	1,63 dA	2,15 aB
UFLA 04-227	2,58 aB	4,68 cA	3,27 aB
UFLA 04-195	2,97 aB	4,64 cA	3,37 aB
UFLA 03-18	1,98 bC	6,27 aA	3,41 aB
UFLA 02-293	2,95 aA	4,04 cA	3,49 aA
UFLA 02-286	3,02 aA	4,68 cA	3,73 aA
Controle	1,78 bB	4,64 cA	1,29 bB
Matéria seca total (g planta <sup>-1</sup> )			
UFLA03-107	2,91 bA	3,80 dA	2,26 bA
UFLA 0310	1,63 cB	5,10 cA	2,24 bB
UFLA 02-290	3,60 bA	4,27 dA	2,33 bA
UFPI B3-9	3,50 bB	7,18 bA	3,13 bB
UFLA 02-281	3,74 bB	6,58 bA	3,03 bB
UFPI B4-9	3,13 bB	7,56 bA	3,18 bB
UFLA 04-122	3,04 bB	7,18 bA	3,08 bB
UFLA 03-26	2,54 bB	7,34 bA	3,25 bB
UFLA 03-885	3,88 bA	3,70 dA	4,34 aA
UFLA 04-227	5,06 aA	5,51 cA	4,20 aA
UFLA 04-195	2,69 bC	6,75 bA	4,78 aB
UFLA 03-18	3,37 bB	9,52 aA	4,57 aB
UFLA 02-293	3,61 bA	5,85 cA	4,82 aA
UFLA 02-286	4,08 aB	6,24 bA	4,78 aB
Controle	3,11 bB	6,27 bA	2,68 bB
UFLA03-107	59,76 bA	60,19 dA	34,09 cB
UFLA 0310	15,57 bB	127,89 cA	38,75 cB
UFLA 02-290	73,57 bA	94,34 cA	56,90 bB
UFPI B3-9	93,12 aB	162,58 bA	87,01 aB
UFLA 02-281	29,34 bB	96,46 cA	54,47 cB
UFPI B4-9	67,61 bB	200,08 aA	63,35 cB
UFLA 04-122	45,81 bB	147,00 bA	68,72 cB
UFLA 03-26	56,61 bB	180,86 bA	69,69 cB
UFLA 03-885	46,27 bA	59,81 dA	31,49 cB
UFLA 04-227	79,94 bB	176,58 bA	69,48 bB
UFLA 04-195	74,00 bB	180,48 bA	77,61 bB



Tabela 5 - Matéria seca da parte aérea, e total e acúmulo de nitrogênio da parte aérea de feijão-fava inoculadas com estirpes bacterianas em diferentes formas de fornecimento de N cultivado em vaso Leonard.

(Conclusão)

Estirpes	CIAT	Matéria seca da parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )	
		Alta concentração de N (52,5 mg N L <sup>-1</sup> )	Baixa concentração de N (5,25 mg N L <sup>-1</sup> )
UFLA 03-18	105,54 aB	230,27 aA	85,15 aB
UFLA 02-293	80,58 bA	110,61 cA	34,58 bB
UFLA 02-286	57,41 bA	65,27 dA	34,50 cB
Controle	48,21 bB	147,50 bA	43,85 cB

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas entre as sete estirpes e maiúsculas nas colunas entre as formas de fornecimento de N, não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Matéria seca da raiz de feijão-comum inoculadas com estirpes bacterianas em diferentes formas de fornecimento de N cultivado em vaso Leonard.

Estirpes	Matéria seca da raiz (g planta <sup>-1</sup> )
UFLA03-107	1,27
UFLA 0310	0,98
UFLA 02-290	1,52
UFPI B3-9	1,56
UFLA 02-281	1,56
UFPI B4-9	1,54
UFLA 04-122	1,53
UFLA 03-26	1,46
UFLA 03-885	1,33
UFLA 04-227	1,32
UFLA 04-195	1,54
UFLA 03-18	1,93
UFLA 02-293	1,36
UFLA 02-286	1,23
Controle	1,45
Formas de Fornecimento de N	
CIAT 899	1,15 b
Alta concentração de N (52,5 mg N L <sup>-1</sup> )	2,05 a
Baixa concentração de N (5,25 mg N L <sup>-1</sup> )	1,35 b

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7 - Número de nódulo, matéria seca de nódulo, da parte aérea, raiz e total e de feijão-comum inoculadas com estirpes bacterianas em diferentes formas de fornecimento de N cultivado em vaso Leonard.

(Continua)

Estirpes	CIAT 899	Número de Nódulo (NN planta <sup>-1</sup> )	
		Alta concentração de N (52,5 mg N)	Baixa concentração de N (5,25 mg N)
UFLA 03 -885	83,0 b	0,00 <sup>NS</sup>	0,00 <sup>NS</sup>
UFLA 02-290	86,34 b	0,00	0,00
UFPI B4-9	0,00 d	0,00	0,00
UFPI B3-9	55,00 c	0,00	0,00
UFLA 03-18	154,66 a	0,00	0,00
UFLA 04-227	102,66 b	0,00	0,00
UFLA 03-10	46,66 c	0,00	0,00
UFLA 02-281	137,00 a	0,00	0,00
UFLA 04 122	124,00 b	0,00	0,00
UFLA 02-286	109,33 b	0,00	0,00
UFLA 02-293	91,43 b	0,00	0,00
UFLA 03 -107	99,31 b	0,00	0,00
UFLA 04 -195	186,21 a	0,00	0,00
UFLA 03-26	146,67 a	0,00	0,00
Controle	107,00 b	0,00	0,00
Matéria seca de Nódulo (g planta <sup>-1</sup> )			
UFLA 03 -885	0,78 b	0,00 <sup>NS</sup>	0,00 <sup>NS</sup>
UFLA 02-290	0,76 b	0,00	0,00
UFPI B4-9	0,70 b	0,00	0,00
UFPI B3-9	0,76 b	0,00	0,00
UFLA 03-18	0,81 b	0,00	0,00
UFLA 04-227	0,80 b	0,00	0,00
UFLA 03-10	0,97 a	0,00	0,00
UFLA 02-281	0,79 b	0,00	0,00
UFLA 04 122	0,79 b	0,00	0,00
UFLA 02-286	0,74 b	0,00	0,00
UFLA 02-293	0,87 b	0,00	0,00
UFLA 03 -107	0,80 b	0,00	0,00
UFLA 04 -195	0,84 b	0,00	0,00
UFLA 03-26	0,80 b	0,00	0,00
Controle	0,77 b	0,00	0,00
UFLA 03-885	1,18 bA	1,46 cA	0,75 bA
UFLA 02-290	1,81bA	0,83 cB	1,02bB
UFPI B4-9	1,05 bB	2,18 bA	0,46 bB
UFPI B3-9	1,38 bB	1,92 bA	0,86 bB
UFLA 03-18	1,19 bB	2,11 bA	0,88 bB
UFLA 04-227	1,02 bB	2,61 aA	0,75 bB
UFLA 03-10	2,21 aB	3,20 aA	0,66 bC
UFLA 02-281	3,33 aA	2,65 cB	1,05 aB
UFLA 04 122	1,25 bB	2,77 aA	1,31 aB
UFLA 02-286	2,99 aA	1,11 cB	1,24 aB
UFLA 02-293	2,47 aA	1,28 cB	1,96 aA
UFLA 03 -107	1,75 bB	3,12 aA	0,93 bC
UFLA 04 -195	1,75 bB	2,91 aA	1,40 aB
UFLA 03-26	1,39 bB	3,19 a A	1,58 aB
Controle	1,58 bB	2,30 bA	0,46 bC

Tabela 7 - Número de nódulo, matéria seca de nódulo, da parte aérea, raiz e total e de feijão-comum inoculadas com estirpes bacterianas em diferentes formas de fornecimento de N cultivado em vaso Leonard.

(Conclusão)

Estirpes	CIAT 899	Número de Nódulo (NN planta <sup>-1</sup> )	
		Alta concentração de N (52,5 mg N)	Baixa concentração de N (5,25 mg N)
Matéria da raiz (g planta <sup>-1</sup> )			
UFLA 03 -885	0,60 aA	0,58 dA	0,37 bB
UFLA 02-290	0,30 cC	1,06 bA	0,66 aB
UFPI B4-9	0,34 cC	1,06 bA	0,67 aB
UFPI B3-9	0,37 cB	0,98 bA	0,38 bB
UFLA 03-18	0,59 aA	0,66 dA	0,64 aA
UFLA 04-227	0,65 aA	0,74 cA	0,41 bB
UFLA 0310	0,34 cB	0,84 cA	0,40 bB
UFLA 02-281	0,46 bB	0,74 cA	0,38 bB
UFLA 04 122	0,56 aC	1,31 aA	0,89 aB
UFLA 02-286	0,43 bB	0,83 cA	0,40 bB
UFLA 02-293	0,64 aB	1,12 bA	0,42 bC
UFLA 03 -107	0,66 aB	0,98 bA	0,45 bB
UFLA 04 -195	0,73 aB	1,14 bA	0,63 aB
UFLA 03-26	0,60 aB	1,41 aA	0,78 aB
Controle	0,69 aA	0,55 dA	0,24 bB
Matéria seca total (g planta <sup>-1</sup> )			
UFLA 03 -885	1,78 bA	2,05 cA	1,13 bB
UFLA 02-290	2,12 bA	2,89 cA	1,69 aA
UFPI B4-9	1,40 bB	3,24 bA	1,13 bB
UFPI B3-9	1,75 bB	2,90 cA	1,24 bB
UFLA 03-18	1,78 bB	2,77 cA	1,52 bB
UFLA 04-227	1,68 bB	3,36 bA	1,16 bB
UFLA 0310	1,55 bB	4,05 aA	1,06 bB
UFLA 02-281	3,69 aA	2,39 bB	1,73 aB
UFLA 04 122	1,81 bB	4,08 aA	2,20 aB
UFLA 02-286	3,33 aA	2,94 cB	1,65 aB
UFLA 02-293	3,11 aA	2,40 c A	2,38 aA
UFLA 03 -107	2,41 bB	4,10 aA	1,37 bC
UFLA 04 -195	2,49 bB	4,05 aA	2,03 aB
UFLA 03-26	2,00 bB	4,61 aA	2,36 aB
Controle	2,27 bA	2,86 cA	0,70 bB

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas entre as sete estirpes e maiúsculas nas colunas entre as formas de fornecimento de N, não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 8 - Acúmulo de nitrogênio na parte aérea de feijão-comum inoculadas com estirpes bacterianas em diferentes formas de fornecimento de N cultivado em vaso Leonard.

Estirpes	Acúmulo de nitrogênio na parte aérea (mg)
UFLA 03 -885	117,57 <sup>1</sup>
UFLA 02-290	89,23
UFPI B4-9	144,49
UFP1I B3-9	87,67
UFLA 03-18	71,34
UFLA 04-227	142,87
UFLA 0310	102,93
UFLA 02-281	111,96
UFLA 04 122	117,10
UFLA 02-286	120,31
UFLA 02-293	98,13
UFLA 03 -107	188,95
UFLA 04 -195	146,10
UFLA 03-26	109,20
Controle	127,14
Formas de Fornecimento de N	
CIAT 899	132,61 b
Alta concentração de N (52,5 mg N L <sup>-1</sup> )	228,00 a
Baixa concentração de N (5,25 mg N L <sup>-1</sup> )	34,388 c

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade,<sup>1</sup>Não significativo.

Anexo

Tabela 1 - Resumo da análise de variância conjunta (Quadrados Médios) referentes a altura (H), germinação (GERM), matéria seca da parte aérea (MSPA) da raiz (MSR) e total (MST), índice de doença (ID) e área abaixo da curva da progresso da doença (AACPD) em plantas de feijão-comum.

FV	QM								
	H	GERM	MSPA	MSR	MST	NN	MSN	ID	AACPD
Experimentos (E)	4,8411**	64,0151	0,0001	0,0533**	0,0448**	0,2667	0,0788	1020,9360**	81492,8227
Tratamentos (T)	4,3818**	1181,1080**	0,0107**	0,0020**	0,0142**	17,6843**	20,0394**	1528,2438**	2168770,7435**
E x T	0,2049	28,0776	0,000026	0,00006	0,0001	0,0831	0,3161	15,6692	18136,3303
Erro	0,6608	157,9545	0,0006	0,0002	0,0008	0,2555	0,4782	110,7298	194571,5500
CV (%)	15,37	14,65	21,00	15,93	14,54	23,35	30,66	14,70	10,13

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste F.

Tabela 2. Resumo da análise de variância conjunta (Quadrados Médios) referentes a germinação (GERM), altura (H), matéria seca da parte aérea (MSPA) da raiz (MSR) e total (MST), índice de doença (ID) e área abaixo da curva da progressão da doença (AACPD) em plantas de feijão-fava.

FV	QM						
	H	GERM	MSPA	MSR	MST	ID	AACPD
Experimentos (E)	4,841**	91,003	0,0093**	0,077**	0,351**	1020,258**	71492,8532
Tratamentos (T)	4,381**	1116,477**	0,0664**	0,006**	0,079**	1328,2457**	2168770,4821**
E x T	0,204	10,5350	0,0071	0,002**	0,0080	13,7592	17146,7452
Erro	0,660	89,3624	0,0059	0,0007	0,0074	120,7458	184571,406
CV (%)	15,37	11,47	32,27	29,69	26,16	13,39	14,02

\*\* e \*: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste F.

Tabela 3. Resumo da análise de variância (grau de liberdade –GL, soma de quadrado – SQ, quadrado médio – QM) referente a influência da densidade do inoculo de *Rhizoctonia solani* na severidade rizoctoniose em feijão-comum e feijão-fava, em condições de casa-de-vegetação.

Fonte de variação	GL	SQ	QM
Feijão-comum			
Dose	4	18248.2090**	6082.73660**
Tratamento	7	2046.82143**	341.13690**
Dose*Tratamento	18	1866.26510**	103.68139**
CV%			6,81
Feijão-Fava			
Dose	4	194014.545**	48503.663**
Tratamento	7	1914.460**	273.494**
Dose*Tratamento	28	6286.220**	224.5078**
CV%			10,81