

Estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com guandu-anão em casa de vegetação e no campo

Márcia Rufini⁽¹⁾, Dâmiany de Pádua Oliveira⁽²⁾, André Trochmann⁽¹⁾, Bruno Lima Soares⁽²⁾,
Messias José Bastos de Andrade⁽²⁾ e Fatima Maria de Souza Moreira⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras (Ufla), Departamento de Ciência do Solo, Caixa Postal 3.037, CEP37200-000 Lavras, MG, Brasil. E-mail: marciarufini@gmail.com, trochmann@gmail.com, fmoreira@dcs.ufla.br ⁽²⁾Ufla, Departamento de Agricultura. E-mail: damy_agro84@hotmail.com, brunolsoares@gmail.com, mandrade@dag.ufla.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium* com guandu-anão. Os experimentos foram conduzidos em vasos de Leonard, em vasos com solo e em campo. Foram testadas 11 estirpes em vasos de Leonard, e as que apresentaram maior eficiência em promover o crescimento do guandu-anão foram avaliadas em vasos com solo (Latossolo Vermelho-Amarelo e Cambissolo) e em campo (Latossolo Vermelho-Amarelo). Em todos os experimentos, os tratamentos foram comparados a dois controles positivos (estirpes aprovadas como inoculantes para as cultivares de guandu-anão BR 2003 e BR 2801) e a duas testemunhas sem inoculação, uma com alta concentração de N mineral, e a outra, a depender do experimento, sem N mineral (solo) ou com baixa concentração de N (vasos de Leonard). Algumas estirpes proporcionaram crescimento vegetal semelhante ou superior às estirpes-referência e às testemunhas em vaso de Leonard. Em vasos com solo, o tipo de solo influenciou os tratamentos. No campo, não houve diferença entre os tratamentos, e as estirpes nativas promoveram bom crescimento. O guandu-anão é capaz de estabelecer associação simbiótica com bactérias fixadoras de N₂, e a estirpe UFLA 03-320 apresenta potencial para ser recomendada para a cultura junto com a estirpe BR 2801.

Termos para indexação: *Cajanus cajan*, fixação biológica de nitrogênio, inoculante.

***Bradyrhizobium* strains in symbiosis with dwarf pigeon pea under greenhouse and field conditions**

Abstract – The objective of this work was to evaluate the symbiotic efficiency of nitrogen-fixing bacterial strains, from the genus *Bradyrhizobium*, with dwarf pigeon pea. The experiments were carried out in Leonard jars, in pots with soil and in the field. In Leonard jars, 11 strains were tested, and the most effective in promoting pigeon pea growth were evaluated in pots with soil (Oxisol and Cambisol) and in the field (Oxisol). In all experiments, treatments were compared to two positive controls (strains approved as inoculants for pigeon pea cultivars, BR 2003 and BR 2801) and to two controls without inoculation, one with a high concentration of mineral N, and the other, depending on the experiment, without mineral N (soil) or with low N concentration (Leonard jars). Some strains have provided plant growth similar or superior to the reference strains and to the controls in Leonard jars. In the pot experiment with soil, the soil type influenced the treatments. In the field, there was no difference among treatments, and the native strains promoted a good plant growth. Dwarf pigeon pea is able to establish a symbiotic association with nitrogen-fixing bacteria, and the strain UFLA 03-320 has the potential to be recommended for this crop together with the BR 2801 strain.

Index terms: *Cajanus cajan*, biological nitrogen fixation, inoculants.

Introdução

O guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], é originário da África, pertence à família Fabaceae e é cultivado em 5,32 milhões de hectares, com produção anual de 4,33 milhões de toneladas e produtividade média de grãos de 1.354,9 kg ha⁻¹ (Food and Agriculture

Organization of the United Nations, 2012). Atualmente, a Índia é seu maior produtor, com 3,86 milhões de hectares e 73% da produção mundial de grãos. No Brasil, o guandu é cultivado em associação com outras culturas, em áreas não irrigadas de agricultura de subsistência de regiões semiáridas, onde é utilizado na alimentação humana e animal (Souza et al., 2007).

É uma opção para a região Nordeste do Brasil, pelo seu elevado valor nutritivo, capacidade de resistir à baixa precipitação pluvial e adaptação a solos salinos e de baixa fertilidade (Paz et al., 2000). Além disso, associa-se a bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (BFNN) e pode receber a maior parte do N para seu desenvolvimento da fixação biológica de N (FBN) (Fernandes & Fernandes, 2000; Paz et al., 2000; Fernandes et al., 2003), o que também indica seu potencial como adubo verde.

No contexto atual, a FBN tem considerável importância econômica e ambiental, pois reduz os custos com fertilizantes nitrogenados e, conseqüentemente, o alto consumo de combustível utilizado na fabricação destes, além de minimizar o impacto ambiental causado pelo uso intensivo e inadequado desses fertilizantes (Moreira & Siqueira, 2006). Um dos grandes desafios para o uso da FBN é obter um manejo adequado da simbiose e aumentar sua eficiência.

O guandu é uma leguminosa altamente promíscua, capaz de nodular com BFNN de crescimento lento e rápido. Poth et al. (1986) estimaram, por meio de diluição isotópica de ^{15}N , a quantidade de N fixado biologicamente na simbiose com guandu e efetivamente incorporado ao solo, e obtiveram de 144 a 179 kg ha⁻¹, conforme a estirpe de BFNN utilizada. As duas estirpes de BFNN aprovadas como inoculantes pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Mapa (Brasil, 2011) pertencem ao gênero de crescimento lento *Bradyrhizobium*: BR 2003 (SEMIA 6156) e BR 2801 (SEMIA 6157). Em outro trabalho conduzido na Índia, Anand & Dogra (1997), ao avaliar a eficiência de diferentes estirpes de *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp., de crescimento rápido e lento, respectivamente, em cultivares de guandu, em vasos de Leonard modificados, observaram que as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. foram superiores a todas as estirpes de *Rhizobium* spp.

Bradyrhizobium tem a vantagem de ser mais estável do que outros gêneros de bactérias fixadoras de N₂, pois os genes relacionados ao estabelecimento (genes *nod*) e funcionamento da simbiose (genes *nif*) estão localizados em cromossomo e não em plasmídeos que podem ser perdidos em condições ambientais estressantes. A maioria das estirpes de BFNN, aprovadas para espécies florestais, adubo verde, forrageiras e para grãos, pertence a esse gênero, e muitas já são usadas com sucesso há décadas, sem a

perda de suas propriedades simbióticas, como as de soja e de feijão-caupi. Para uso com feijão-caupi, têm sido relatadas novas estirpes eficientes de *Bradyrhizobium* (Guimarães et al., 2012; Costa et al., 2013; Jaramillo et al., 2013), o que pode ser extrapolado também para guandu.

A presença de BFNN nativas, pouco efetivas na FBN e que podem competir com as estirpes inoculadas podem limitar os efeitos da inoculação no guandu. Outros fatores, como tipo de solo e diferentes cultivares, podem também influenciar o processo da FBN (Nautiyal et al., 1988; Bidlack et al., 2001). De acordo com Nautiyal et al. (1988), esses fatores podem ser os responsáveis pela pobre nodulação e baixa resposta do guandu à inoculação.

Em razão da diversidade climática e edáfica dos agroecossistemas do Brasil e, ainda, da ausência dos resultados publicados que motivaram a indicação das estirpes de BFNN atualmente aprovadas pelo Mapa, torna-se de fundamental importância a seleção de estirpes inoculantes que permitam o sucesso do manejo da simbiose entre BFNN e guandu, em condições climáticas e edáficas específicas, bem como a constatação da eficiência das estirpes atualmente aprovadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio, do gênero *Bradyrhizobium*, com guandu-anão.

Material e Métodos

O ensaio para a avaliação da eficiência simbiótica das estirpes de BFNN em guandu foi realizado em condições axênicas de vasos de Leonard (Vincent, 1970), em vasos com solo e em campo. Foi utilizada a cultivar de guandu-anão Iapar 43 (Aratã), de ciclo curto e menor altura, desenvolvida para a produção de grãos para alimentação animal e humana.

O ensaio em vasos de Leonard foi realizado no Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, do Departamento de Ciência do Solo, da Universidade Federal de Lavras, de 10/8 a 10/10/2012. Foram testadas sete estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, que fazem parte da coleção do referido Setor e se mostraram eficientes em fixar o N₂ em outras espécies leguminosas como siratro e feijão-caupi (Tabela 1). Além destas, também foram testadas estirpes de

Bradyrhizobium já aprovadas como inoculantes para a cultura da soja (BR 29 ou SEMIA 5019) e do feijão-caupi (UFLA 03-84 ou SEMIA 6461, INPA 03-11b ou SEMIA 6462 e BR 3267 ou SEMIA 6463). Informações relevantes sobre cada estirpe encontram-se na Tabela 1.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições e 15 tratamentos. Os tratamentos constituíram-se de: inoculação individual das estirpes; comparação com duas testemunhas consideradas controles positivos (estirpes-referência, aprovadas como inoculantes para guandu, BR 2003 e BR 2801); além de duas testemunhas sem inoculação, uma com alta concentração de N mineral, e outra com baixa concentração de N mineral para, respectivamente, verificação de condições adequadas de crescimento vegetal e controle de possível contaminação.

A parte superior dos vasos de Leonard continha uma mistura 1:1 de areia e vermiculita, e a inferior, solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada. Após o preparo, os vasos foram autoclavados por uma hora, à pressão de 1,5 kg cm⁻², a 127°C. Nos tratamentos que receberam inoculação e na testemunha com baixa concentração de N mineral (5,25 mg L⁻¹ de N), que não inibe a FBN, a solução nutritiva apresentou a

seguinte composição por litro: 0,4 mL de 236,16 g L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O; 0,6 mL de 101,11 g L⁻¹ KNO₃; 0,1 mL de 115,03 g L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 2,0 mL de 246,9 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 3,0 mL de 87,13 g L⁻¹ K₂SO₄; 10,0 mL de 12,6 g L⁻¹ Ca(H₂PO₄)₂·H₂O; 200,0 mL de 1,72 g L⁻¹ CaSO₄·2H₂O; 1,0 mL de Fe-EDTA e 1,0 mL de solução suplementar (2,86 g L⁻¹ H₃BO₃; 1,81 g L⁻¹ MnCl₂·4H₂O; 0,22 g L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O; 0,08 g L⁻¹ CuSO₄·5H₂O; e 0,02 g L⁻¹ H₂MoO₄·H₂O). No tratamento que recebeu alta concentração de N mineral (52,5 mg L⁻¹ N), foi utilizada a solução completa, com a seguinte composição por litro: 4,0 mL de 236,16 g L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O; 6,0 mL de 101,11 g L⁻¹ KNO₃; 1,0 mL de 115,03 g L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 2,0 mL de 246,9 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 1,0 mL de Fe-EDTA e 1,0 mL de solução suplementar (2,86 g L⁻¹ H₃BO₃; 1,81 g L⁻¹ MnCl₂·4H₂O; 0,22 g L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O; 0,08 g L⁻¹ CuSO₄·5H₂O; e 0,02 g L⁻¹ H₂MoO₄·H₂O). Ambas as soluções foram autoclavadas por 40 min, a 1,5 kg cm⁻² e a 127°C, antes de serem colocadas nos vasos.

As sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 96% v/v por 30 s e hipoclorito de sódio a 2% por 2 min. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes com água esterilizada, para retirada de resíduos dos tratamentos anteriores. Após esses procedimentos, as sementes foram

Tabela 1. Origem e características das estirpes de *Bradyrhizobium* testadas.

Estirpe	Origem			Eficiência simbiótica ⁽¹⁾	Fonte/referência ⁽²⁾
	Estado/região	Sistema de uso da terra	Planta hospedeira		
UFLA03-153	Minas Gerais	Mineração de bauxita	<i>Vigna unguiculata</i>	<i>V. unguiculata</i> (E)	SBMPBS-Ufla/(Soares et al., 2014)
UFLA03-154	Minas Gerais	Mineração de bauxita	<i>V. unguiculata</i>	<i>V. unguiculata</i> (E)	SBMPBS-Ufla/(Soares et al., 2014)
UFLA03-164	Minas Gerais	Mineração de bauxita	<i>V. unguiculata</i>	<i>V. unguiculata</i> (E)	SBMPBS-Ufla/(Soares et al., 2014)
UFLA03-320	Minas Gerais	Agricultura	<i>V. unguiculata</i>	<i>V. unguiculata</i> (E)	SBMPBS-Ufla/(Rufini et al., 2014)
UFLA03-321	Minas Gerais	Agricultura	<i>V. unguiculata</i>	<i>V. unguiculata</i> (E)	SBMPBS-Ufla/(Rufini et al., 2014)
UFLA03-325	Minas Gerais	Agricultura	<i>V. unguiculata</i>	<i>V. unguiculata</i> (E)	SBMPBS-Ufla/(Rufini et al., 2014)
UFLA04-212	Amazônia	Agricultura	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>M. atropurpureum</i> (E)	SBMPBS-Ufla/(Florentino et al., 2009)
INPA 03-11b	Amazônia	Capoeira	<i>Centrosema</i> sp.	<i>V. unguiculata</i> (R)	SBMPBS-UFLA/(Soares et al., 2006)
UFLA 03-84	Rondônia	Pastagem	<i>V. unguiculata</i>	<i>V. unguiculata</i> (R)	SBMPBS-UFLA/(Soares et al., 2006)
BR 3267	Semiárido	-	<i>V. unguiculata</i>	<i>V. unguiculata</i> (R)	Embrapa Agrobiologia/(Martins et al., 2003)
BR 29	Rio de Janeiro	-	-	<i>Glycine max</i> (R)	CNPAB-(Peres & Vidor, 1980)
BR2801	Rio de Janeiro	-	<i>Crotalaria</i> spp.	<i>Cajanus cajan</i> (R)	Embrapa Agrobiologia(Brasil, 2011)
BR2003	Brasília	-	<i>Stylosantes</i> spp.	<i>C. cajan</i> (R)	Embrapa Agrobiologia(Brasil, 2011)

⁽¹⁾E, eficiente (massa de matéria seca da parte aérea do tratamento, com inoculação da estirpe testada = testemunha sem inoculação, que recebeu N mineral); R, aprovada como inoculante para *Vigna unguiculata* (UFLA03-84, INPA03-11b e BR3267), *Glycine max* (BR 29) e *Cajanus cajan* (BR2801, BR2003), pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ⁽²⁾SBMPBS-UFLA, Coleção de Bactérias do Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, da Universidade Federal de Lavras.

imersas em água destilada por duas horas, para ficarem embebidas de água e garantir a germinação. Posteriormente, as sementes foram postas a germinar em placas de Petri, que continham papel filtro e algodão umedecido e esterilizado, e colocadas em câmara de crescimento a 28°C, por 24 horas. Após este período, foram semeadas quatro sementes pré-germinadas por vaso e, posteriormente, foi realizada a inoculação com 1,0 mL do meio de cultura 79 líquido (Fred & Waksman, 1928) colocado junto a cada semente. Os isolados foram cultivados sob agitação por aproximadamente 120 horas e continham aproximadamente 10^8 células de BFNN mL⁻¹. Para evitar contaminação, colocouse sobre a superfície do vaso uma fina camada de mistura esterilizada de areia, clorofórmio e parafina.

O nível de solução nutritiva nos vasos foi mantido, com reposição periódica. Até aos 45 dias após o plantio, os vasos receberam solução nutritiva com 1/4 de força iônica. A partir desse período, aumentou-se a força da solução nutritiva para 1/3. Após a emergência, realizou-se o desbaste, tendo-se deixado duas plantas por vaso. As plantas foram colhidas aos 60 dias, tendo-se avaliado o número de nódulos (NN), a matéria seca de nódulos (MSN), a matéria seca da raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), o teor (TNPA) e o acúmulo (ANPA) de N na parte aérea, a eficiência relativa (ER) e a altura da planta.

As estirpes mais eficientes (UFLA 03-320 e UFLA 03-321) no experimento com vasos de Leonard, além da estirpe BR 29, aprovada como inoculante para soja, foram selecionadas para testes em vasos com solo e campo.

O experimento em vasos com solo foi realizado em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo da Ufla, de 23/1 a 17/5/2013. Foram coletados solos da camada arável, em dois locais distintos – Luminárias e Lavras. As amostras de solo foram destorroadas, homogeneizadas e passadas em peneira de 4 mm, antes de serem usadas como substrato. Os vasos utilizados tinham capacidade de 1,6 dm³.

Os solos de Luminárias (21°32'S e 44°57'W) e Lavras (21°12'S, 44°58'W) foram classificados como Cambissolo e Latossolo Vermelho-Amarelo, respectivamente, ambos de textura argilosa. Esses solos tinham histórico de cultivo com milho, e não havia registro de uso de inoculantes. A população nativa em ambos era de aproximadamente

10^3 UFC g⁻¹ de solo. O Cambissolo e o Latossolo Vermelho-Amarelo apresentaram os seguintes atributos químicos e físicos, respectivamente : pH em água, 4,6 e 5,9; P (Mehlich I), 0,56 e 5,81 mg dm⁻³; K, 68 e 128 mg dm⁻³; Ca, 0,4 e 3,5 cmol_c dm⁻³; Mg, 0,2 e 1,1 cmol_c dm⁻³; Al, 0,8 e 0,1 cmol_c dm⁻³; H+Al, 5,05 e 4,04 cmol_c dm⁻³; soma de bases, 0,77 e 4,93 cmol_c dm⁻³; T, 5,82 e 8,97 cmol_c dm⁻³; t, 1,57 e 5,03 cmol_c dm⁻³; saturação por alumínio, 50,96 e 1,99%; saturação por bases, 13,31 e 54,94%; matéria orgânica, 3,41 e 2,61 dag kg⁻¹; areia, 400 e 590 g kg⁻¹; silte, 250 e 70 g kg⁻¹; e argila, 350 e 340 g kg⁻¹.

O delineamento experimental em blocos ao acaso foi utilizado com quatro repetições, em arranjo fatorial 7x2, com sete tratamentos e dois tipos de solo. Os sete tratamentos foram: inoculação com as estirpes UFLA 03-320, UFLA 03-321 e BR 29, além das estirpes aprovadas como inoculante para guandu (BR 2003 e BR 2801), e das testemunhas sem inoculação, com ou sem adubação com N mineral. Em todas as parcelas, foi efetuada uma adubação com 300, 300, 40, 0,8, 1,5, 3,6, 5,0 e 0,15 mg dm⁻³ de K, P, S, B, Cu, Mn, Zn e Mo, respectivamente (Malavolta et al., 1989). A testemunha com N mineral recebeu 300 mg dm⁻³ de N, fonte NH₄NO₃, parcelados em três aplicações.

As sementes de guandu-anão 'Iapar 43' (Aratã) foram desinfestadas e germinadas conforme a metodologia descrita no ensaio com vasos de Leonard. Foram semeadas quatro sementes pré-germinadas por vaso, e cada uma recebeu 1,0 mL do inóculo (aproximadamente 10^8 células de BFNN mL⁻¹), cultivado em meio 79 líquido. Após a emergência, foi feito o desbaste, tendo-se deixado duas plântulas por vaso.

As plantas foram colhidas no período da floração (aproximadamente aos 120 dias após emergência), para avaliação das seguintes variáveis: número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER), teor (TNPA) e acúmulo (ANPA) de N na parte aérea e altura da planta.

O ensaio de campo foi instalado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária da Ufla, de 28/11/2012 a 2/4/2013. Os dados de temperatura média e precipitação, no período do experimento, foram de 21,6°C e 883,4 mm, respectivamente. Utilizou-se o delineamento experi-

mental de blocos ao acaso com quatro repetições e sete tratamentos. Os tratamentos foram: inoculação com as estirpes UFLA 03-320, UFLA 03-321, BR 29, mais as estirpes BR 2003 e BR 2801, além das testemunhas sem inoculação, com ou sem N mineral.

O inoculante foi preparado com turfa esterilizada, à proporção de 3:2 de turfa e culturas em meio 79 líquido, que continham aproximadamente 10^8 células de BFNN mL⁻¹. Utilizaram-se 250 g do inoculante para cada 10 kg de sementes. As parcelas foram constituídas por seis linhas de 5 m de comprimento, espaçadas em 0,50 m, o que totalizou 15 m² de área total e 5 m² de área útil (duas linhas destinadas à colheita dos grãos).

Após a demarcação dos sulcos, todos os tratamentos receberam adubação fosfatada e potássica à base de 90 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 50 kg ha⁻¹ de K₂O, tendo-se utilizado como fontes o superfosfato triplo e o cloreto de potássio, respectivamente. Além desta adubação, a testemunha nitrogenada recebeu 70 kg ha⁻¹ de N (fonte ureia), parcelados em duas vezes: 35 kg ha⁻¹ de N aplicados à época de semeadura, e 35 kg ha⁻¹ de N aos 35 dias após a emergência. A semeadura foi realizada imediatamente após a inoculação, à densidade de 15 sementes por metro. O ensaio foi mantido livre de plantas invasoras por meio de capinas manuais. Não houve necessidade de outros tratamentos fitossanitários.

Por ocasião do florescimento, foram coletadas oito plantas de cada parcela, da segunda e terceira linhas, para avaliação de: número e massa de matéria seca de nódulos (NN e MSN, respectivamente); massa de matéria seca da parte aérea (MSPA); eficiência relativa (ER%); teor (TNPA%) e acúmulo (ANPA) de N na parte aérea; e a quantidade de N disponibilizada (kg de N ha⁻¹). À época da colheita, que foi realizada na quarta e quinta linhas de cada parcela, tendo-se deixado 1 m linear de bordadura nas cabeceiras, avaliaram-se: o número de vagens por planta; o número de grãos por vagem; a massa de 100 grãos; o rendimento de grãos; o e teor (TNG%) e o acúmulo (ANG) de N nos grãos. Para a avaliação do rendimento de grãos, a umidade foi corrigida para 13%.

Em todos os ensaios, a eficiência relativa (ER) foi calculada em relação à produção de MSPA das plantas do tratamento que recebeu N mineral, por meio da seguinte expressão: $ER = (MSPA \text{ tratamento}) \times 100 / (MSPA \text{ da TCN})$. O teor de N total foi avaliado pelo

método semimicrokjedahl, de acordo com Sarruge & Haag (1979), tendo-se determinado a percentagem de N na matéria seca da parte aérea e nos grãos. O N acumulado foi calculado por meio da multiplicação da massa de matéria seca da parte aérea ou do rendimento de grãos pelo teor de N (%) e divisão do produto por 100.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, com uso do sistema de análise estatística Sisvar (Ferreira, 2011). As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os valores das variáveis número de nódulos (NN) e matéria seca de nódulos (MSN) foram previamente transformados com uso da fórmula $(X+0,5)^{0,5}$. Realizou-se a correção da produtividade em função do estande, pela análise de covariância para o estande médio, com o programa Genes (Cruz, 2013). Para o cálculo da quantidade de N (kg ha⁻¹ N) disponibilizada pela biomassa, utilizou-se o estande médio do ensaio (72 mil plantas por hectare).

Resultados e Discussão

No ensaio em vasos de Leonard, não se verificou a presença de nódulos na testemunha com baixa concentração de N, o que indica que não houve contaminação do experimento.

Todas as estirpes testadas foram capazes de nodular o guandu-anão, das quais UFLA 03-84, UFLA 03-11B, UFLA 03-154 e UFLA 04-212 apresentaram os maiores valores de número de nódulos, superiores aos das demais estirpes e às estirpes-referência aprovadas como inoculante para o guandu (BR 2003 e BR 2801), porém, estes nódulos não foram muito eficientes em promover o crescimento da planta (MSPA e altura) (Tabela 2).

Na análise da matéria seca de nódulos, as estirpes BR 29, UFLA 03-84, UFLA 03-11B, UFLA 03-153, UFLA 03-320, UFLA 03-325 e UFLA 04-212 apresentaram os maiores valores e não se agruparam a nenhuma das estirpes-referência. A estirpe-referência BR 2003 apresentou o menor valor de MSN. As estirpes UFLA 03-84, UFLA 03-11B, UFLA 03-153, UFLA 03-320, UFLA 03-321, UFLA 03-325 e UFLA 04-212 induziram os maiores valores de matéria seca de raiz e foram semelhantes à estirpe-referência BR 2801 e superiores às testemunhas e à estirpe-referência BR 2003.

Os efeitos dos tratamentos foram mais pronunciados na parte aérea do que nas raízes. Quanto à matéria seca da parte aérea, eficiência relativa e altura, as estirpes UFLA 03-320 e UFLA 03-321 foram as mais eficientes em promover o crescimento vegetal, tendo superado os demais tratamentos. As estirpes UFLA 03-84, UFLA 03-11B, UFLA 03-153, UFLA 03-325 e UFLA 04-212, junto com a estirpe-referência BR 2801, foram superiores às demais estirpes, inclusive à BR 2003 e às testemunhas. A testemunha que recebeu alta concentração de N mineral foi semelhante à estirpe-referência BR 2003; e a testemunha com baixa concentração de N mineral apresentou os menores valores nestes parâmetros. Os tratamentos que receberam inoculação foram superiores às testemunhas quanto ao teor de N na parte aérea. Quanto ao acúmulo de N na parte aérea, as estirpes UFLA 03-84, UFLA 03-320, UFLA 03-321 e UFLA 03-325, junto com a estirpe-referência BR 2801, apresentaram os maiores valores, tendo superado os demais tratamentos, e as testemunhas apresentaram os menores valores.

As estirpes UFLA 03-320 e UFLA 03-321 foram as mais eficientes em promover o crescimento do guandu. Estas estirpes também se mostraram eficientes

em promover o crescimento do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), em condições de casa de vegetação, em vasos de Leonard (Rufini et al., 2014).

Fernandes & Fernandes (2000) e Fernandes et al. (2003), que testaram BFNN nativas dos tabuleiros costeiros em guandu, encontraram estirpes capazes de estabelecer simbiose efetiva com o guandu em vasos de Leonard, semelhantes às estirpes aprovadas como inoculante usadas no presente ensaio. Carvalho et al. (2008), ao testar a eficiência de estirpes de soja e suas variantes, entre elas a BR 29, em soja, caupi e guandu, observaram que todas nodularam as três espécies de plantas, contudo, apenas para soja, a interação rizóbio-leguminosa mostrou eficiência significativa.

No ensaio em vasos com solo, a interação solo e tratamentos foi significativa para a maioria dos parâmetros estudados, exceto para MSPA e altura, o que indica que o tipo de solo influenciou os tratamentos (Tabela 3). No Cambissolo, as estirpes-referência (BR 2003 e BR 2801) e a estirpe BR 29 apresentaram os maiores valores de NN, seguidas das estirpes UFLA 03-320 e UFLA 03-321. No Latossolo Vermelho-Amarelo, a estirpe BR 2003 não ficou no grupo com os maiores valores de NN. Além das estirpes BR 2801 e BR 29, que apresentaram maior

Tabela 2. Número de nódulos (NN), massa de matéria seca de nódulos (MSN), de raiz (MSR) e de parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER), teor (TNPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), e altura do guandu-anão cultivar Iapar 43 (Aratã), em vasos de Leonard, nos diferentes tratamentos de fontes de N⁽¹⁾.

Fonte de N	NN por vaso	MSN (mg por vaso)	MSR (g por vaso)	MSPA (g por vaso)	ER (%)	TNPA (%)	ANPA (mg por vaso)	Altura (cm)
+N (52,5 mg L ⁻¹)	0c	0,0c	0,857b	2,500c	100,0c	1,43b	36,006d	41,75c
-N (5,25 mg L ⁻¹)	0c	0,0c	0,287b	0,663d	26,6d	1,82b	12,376d	23,42d
BR2003	108b	75,0c	0,570b	1,910c	78,1c	3,12a	59,618c	32,38c
BR2801	188b	156,7b	1,197a	3,747b	148,5b	3,86a	144,317a	44,75b
BR29	165b	245,0a	0,470b	2,070c	84,2c	2,99a	61,477c	33,00c
UFLA03-84	328a	371,7a	1,107a	3,807b	154,7b	3,77a	142,827a	50,75b
INPA03-11B	294a	435,0a	1,170a	3,783b	152,8b	3,12a	118,486b	50,67b
BR3267	121b	210,7b	0,517b	2,253c	89,6c	3,21a	72,280c	37,58c
UFLA03-153	223b	374,3a	1,067a	3,430b	139,4b	3,60a	121,026b	45,83b
UFLA03-154	285a	192,3b	0,770b	2,807c	116,1c	3,68a	102,353b	39,167c
UFLA03-164	197b	143,7b	0,623b	2,367c	94,7c	3,51a	85,328c	38,167c
UFLA03-320	146b	292,3a	1,480a	4,683a	188,0a	3,51a	164,220a	56,25a
UFLA03-321	118b	196,0b	1,447a	4,756a	195,1a	3,73a	176,861a	55,83a
UFLA03-325	132b	299,3a	1,287a	3,957b	162,3b	3,60a	142,398a	49,33b
UFLA04-212	439a	325,0a	0,957a	3,397b	138,0b	3,25a	108,091b	46,83b
P valor	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
CV (%)	30,5	4,6	28,3	17,5	19,5	14,5	20,3	10,6

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

nodulação no Cambissolo, a estirpe UFLA 03-320 também proporcionou maior nodulação em guandu no Latossolo Vermelho-Amarelo. A testemunha que recebeu N mineral não nodulou no Cambissolo e, junto com a testemunha sem N mineral, apresentou os menores valores. No Latossolo Vermelho-Amarelo, a testemunha que recebeu N mineral apresentou nódulos, porém em número baixo. A testemunha sem N mineral apresentou mais nódulos do que a testemunha que recebeu N mineral, e foi semelhante à estirpe-referência BR 2003 e a estirpe UFLA 03-320.

As estirpes-referência – BR 2003 e BR 2801 – e a estirpe UFLA 03-320 apresentaram os maiores valores de MSN no Cambissolo, seguidas pelas estirpes BR 29 e UFLA 03-321, enquanto as testemunhas apresentaram os menores valores. No Latossolo Vermelho-Amarelo, a testemunha +N foi inferior aos demais tratamentos. No Cambissolo, as testemunhas apresentaram maiores valores de ER do que os tratamentos com inoculação. Quanto ao teor e acúmulo de N na parte aérea, a testemunha que recebeu N mineral foi superior aos demais tratamentos. No Latossolo Vermelho-Amarelo, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto aos parâmetros ER, TNPA e ANPA.

Quanto aos parâmetros relativos ao desenvolvimento da planta (ER e ANPA), os tratamentos com inoculação foram inferiores à testemunha +N no Cambissolo. Isto pode estar relacionado à acidez e à fertilidade do solo, pois, no Latossolo Vermelho-Amarelo, que possui pH mais elevado e é mais fértil, estes tratamentos foram semelhantes. Um fator estressante para a bactéria e a planta, como a sensibilidade à acidez, pode ter afetado a simbiose. De acordo com Moreira & Siqueira (2006), o hospedeiro pode ser mais afetado pela acidez do que a bactéria. Plantas sem adubação de N são mais sensíveis aos estresses ambientais do que plantas que recebem apenas N mineral. Rufini et al. (2011) observaram que a simbiose e o desenvolvimento das plantas de feijoeiro-comum, em solo com e sem calagem, foram favorecidos com a calagem. Portanto, em outros tipos de solo, com características mais favoráveis ao estabelecimento da simbiose com estas estirpes, pode haver respostas positivas à inoculação.

Em relação aos efeitos principais dos tratamentos para MSPA, a testemunha que recebeu N mineral foi superior aos demais tratamentos, porém quanto à altura, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4). Entre os dois tipos de solo,

Tabela 3. Número de nódulos (NN), massa de matéria seca de nódulos (MSN) e de parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER), teor (TNPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), e altura em guandu-anão cultivar Iapar 43 (Aratã), para a interação entre solo e tratamentos, em casa de vegetação⁽¹⁾.

Tratamento	NN por vaso	MSN (mg por vaso)	MSPA (g por vaso)	ER (%)	TNPA (%)	ANPA (mg por vaso)	Altura (cm)
Cambissolo							
+N (300 mg dm ⁻³)	0c	0,0c	6,378a	100,0a	4,16a	259,55a	58,33a
-N	2c	35,3c	5,568a	89,4a	2,08b	115,87b	66,75a
BR2003	19a	265,5a	4,893a	77,3b	2,60b	125,38b	57,06a
BR2801	22a	180,5a	5,198a	82,0b	2,24b	117,15b	56,60a
BR29	14a	111,3b	4,923a	78,7b	1,98b	97,89b	66,80a
UFLA03-320	6b	158,0a	4,410a	68,1b	2,24b	99,29b	51,38a
UFLA03-321	8b	104,3b	4,935a	77,6b	2,18b	109,70b	62,53a
Latossolo Vermelho-Amarelo							
+N (300 mg dm ⁻³)	7c	49,3b	7,013a	100,0a	2,80a	196,54a	71,94a
-N	22b	308,5a	5,295a	76,6a	3,15a	166,36a	66,06a
BR2003	19b	225,3a	5,558a	77,6a	2,76a	149,79a	68,31a
BR2801	41a	338,3a	6,035a	86,1a	2,76a	167,05a	76,81a
BR29	36a	376,0a	5,733a	82,5a	2,73a	156,17a	69,69a
UFLA03-320	24b	293,3a	5,330a	74,3a	2,96a	159,74a	60,06a
UFLA03-321	29a	286,3a	5,713a	80,4a	3,06a	175,10a	66,50a
P valor	0,0281	0,0008	0,8895	0,8173	0,0000	0,0027	0,5385
CV (%)	22,4	5,1	17,0	15,7	11,8	21,0	17,0

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

houve diferença significativa para MSPA e altura, em que os tratamentos em Latossolo Vermelho-Amarelo apresentaram os maiores valores (Tabela 4), fato que também pode estar relacionado à acidez e à menor fertilidade do Cambissolo, o que afetou o desenvolvimento da planta.

No ensaio de campo, realizado em Lavras, houve diferença significativa apenas para NN e

Tabela 4. Massa de matéria seca da parte aérea (MSPA) e altura em guandu-anão cultivar Iapar 43 (Aratã), para os diferentes solos e tratamentos, em casa de vegetação⁽¹⁾.

Tratamento	MSPA (g por vaso)	Altura (cm)
+N (300 mg dm ⁻³)	6,695a	65,14a
-N	5,431b	66,41a
BR2003	5,225b	62,69a
BR2801	5,616b	66,71a
BR29	5,328b	68,24a
UFLA03-320	4,870b	55,72a
UFLA03-321	5,324b	64,51a
P valor	0,0168	0,3585
Solo		
Cambissolo	5,186b	59,92b
Latossolo Vermelho-Amarelo	5,811a	68,48a
P valor	0,0172	0,0058
CV (%)	17,0	17,0

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

MSN quanto aos parâmetros avaliados na floração (Tabela 5). As estirpes UFLA 03-320 e UFLA 03-321 apresentaram maior nodulação e MSN do que os demais tratamentos. A estirpe UFLA 03-321 também apresentou alta nodulação no experimento em vaso com Latossolo Vermelho-Amarelo. Com relação aos parâmetros avaliados por ocasião da colheita, não houve diferença nos tratamentos com inoculação. A produtividade foi superior a 1.100 kg ha⁻¹ para todos os tratamentos. No presente trabalho a produtividade média de grãos foi de 1.287 kg ha⁻¹, superior à obtida por Cesar et al. (2011), de 600 kg ha⁻¹, no Cerrado do Mato Grosso do Sul, e próxima à média mundial de 1.354,9 kg ha⁻¹ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012).

No presente trabalho, mostrou-se a presença de BFNN nativas, nos solos onde foram instalados os experimentos, capazes de nodular e promover o crescimento do guandu-anão. Mostrou-se também a eficiência das populações nativas, o que provavelmente está associado às boas condições de fertilidade e matéria orgânica do solo, que permitiram às estirpes nativas seu estabelecimento e sobrevivência. Populações nativas de BFNN superiores a 50 células por grama de solo podem afetar a resposta à inoculação (Moreira & Siqueira, 2006). Nos solos usados no presente estudo, as populações eram superiores a esse valor.

Tabela 5. Número de nódulos (NN), massa de matéria seca de nódulos (MSN) e de parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER), teor (TNPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA), massa de N disponibilizado (kg ha⁻¹), número de vagens/planta, número de grãos/vagem, massa de 100 grãos, rendimento, teor (TNG) e acúmulo de N nos grãos (ANG), em guandu-anão cultivar Iapar 43 (Aratã), nos tratamentos em condições de campo⁽¹⁾.

Tratamento	NN por planta	MSN (mg por planta)	MSPA (g por planta)	ER (%)	TNPA (%)	ANPA (mg por planta)	N (kg ha ⁻¹)	Nº vagens por planta	Nº grãos por vagem	Massa 100 grãos (g)	Rendimento (kg ha ⁻¹)	TNG (%)	ANG (kg ha ⁻¹)
+N (70 kg ha ⁻¹)	7b	108,4b	33,33a	100,0a	4,03a	1346,55a	96,95a	151a	2,2a	7,54a	1568,0a	4,13a	64,83a
-N	6b	67,2b	19,40a	62,2a	3,81a	745,09a	53,65a	117a	2,7a	6,85a	1152,0a	4,20a	48,21a
BR2003	8b	90,6b	23,24a	76,5a	4,13a	966,47a	69,59a	100a	3,4a	7,52a	1190,2a	4,13a	48,93a
BR2801	7b	71,3b	27,68a	92,7a	3,93a	1090,31a	78,50a	142a	2,3a	7,69a	1308,9a	3,87a	48,81a
BR29	7b	85,9b	23,40a	77,8a	3,67a	868,46a	62,53a	97a	2,4a	7,36a	1229,5a	4,10a	50,01a
UFLA03-320	12a	185,0a	31,12a	100,6a	3,54a	1101,05a	79,28a	132a	2,2a	7,12a	1408,0a	4,19a	58,91a
UFLA03-321	13a	232,8a	20,51a	68,6a	3,45a	706,43a	50,86a	126a	3,2a	7,38a	1149,7a	4,19a	48,37a
P valor	0,0268	0,0046	0,0941	0,1302	0,2481	0,1128	0,1128	0,4942	0,1179	0,0564	0,5337	0,5054	0,4157
CV (%)	16,7	4,5	28,2	26,6	11,0	32,3	32,3	34,2	25,6	4,8	25,7	5,9	24,2

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Conclusões

1. A estirpe UFLA 03-320 é eficiente em promover o crescimento do guandu-anão 'Iapar 43' (Aratã) e, portanto, tem potencial para ser utilizada como inoculante para a cultura junto com a estirpe BR 2801.

2. Os dois solos utilizados têm populações nativas de BFNN eficientes, com destaque para o Latossolo Vermelho-Amarelo.

Agradecimentos

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

Referências

- ANAND, R.C.; DOGRA, R.C. Comparative efficiency of *Rhizobium/Bradyrhizobium* spp. strains in nodulating *Cajanus cajan* in relation to characteristic metabolic enzymes. **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p.283-287, 1997. DOI: 10.1007/s003740050244.
- BIDLACK J.E.; RAO S.C.; DOMEZAS D.H. Nodulation, nitrogenase activity, and dry weight of chickpea and pigeon pea cultivars using different *Bradyrhizobium* strains. **Journal of Plant Nutrition**, v.24, p.549-560, 2001. DOI: 10.1081/PLN-100104979.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos microorganismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil, na forma dos anexos I, II e III, desta instrução normativa. **Diário Oficial da União [da República Federativa do Brasil]**, 25 mar. 2011. Seção 1.
- CARVALHO, F.G. de; SELBACH, P.A.; SILVA, A.J.N. da. Especificidade hospedeira de variantes *Bradyrhizobium* spp. em soja (cvs Peking e Clark), caupi e guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.2701-2708, 2008. DOI: 10.1590/S0100-06832008000700013.
- CESAR, N.Z.; GUERRA, J.G.M.; RIBEIRO, R. de L.D.; URQUIAGA, S.S.C.; PADOVAN, M.P. Performance de adubos verdes cultivados em duas épocas do ano no Cerrado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.6, p.159-169, 2011.
- COSTA, E.M. da; NÓBREGA, R.S.A.; DE CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. de V.M.; MOREIRA, F.M. de S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1275-1284, 2013. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000900012.
- CRUZ, C.D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v.35, p.271-276, 2013. DOI: 10.4025/actasciagron.v35i3.21251.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.321-327, 2000. DOI: 10.1590/S0100-204X2003000700007.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.835-842, 2003. DOI: 10.1590/S0100-204X2003000700007.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011. DOI: 10.1590/S1413-70542011000600001.
- FLORENTINO, L.A.; GUIMARÃES, A.P.; RUFINI, M.; SILVA, K. da; MOREIRA, F.M. de S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, v.66, p.667-676, 2009. DOI: 10.1590/S0103-90162009000500012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 29 nov. 2013.
- FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology**: with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill, 1928. 145p.
- GUIMARÃES, A.A.; JARAMILLO, P.M.D.; NÓBREGA, R.S.A.; FLORENTINO, L.A.; SILVA, K.B.; MOREIRA, F.M.S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.6726-6733, 2012. DOI: 10.1128/AEM.01303-12.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (California Agricultural Experiment Station. Circular, 347).
- JARAMILLO, P.M.D.; GUIMARÃES, A.A.; FLORENTINO, L.A.; SILVA, K.B.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems. **Scientia Agricola**, v.70, p.397-404, 2013. DOI: 10.1590/S0103-90162013000600004.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1989. 201p.
- MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.333-339, 2003. DOI: 10.1007/s00374-003-0668-4.

- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- NAUTIYAL, C.S.; HEGDE, S.V.; VAN BERKUM, P. Nodulation, nitrogen fixation, and hydrogen oxidation by pigeon pea *Bradyrhizobium* spp. in symbiotic association with pigeon pea, cowpea, and soybean. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.94-97, 1988.
- PAZ, L.G. da; LUPCHINSKI, E.W.L.; SANTOS, M.V.F. dos; SILVA, J.A.A. da. Efeito do nitrogênio e estirpes de *Bradyrhizobium* na fixação do nitrogênio e desenvolvimento do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) cv. Fava Larga. **Revista Científica de Produção Animal**, v.2, p.96-106, 2000.
- PERES, J.R.R.; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* (L) Merrill). **Agronomia Sulriograndense**, v.16, p.205-219, 1980.
- POTH, M.; LA FAVRE, J.S.; FOCHT, D.D. Quantification by direct ¹⁵N dilution of fixed N₂ incorporation into soil by *Cajanus cajan* (pigeon pea). **Soil Biology and Biochemistry**, v.18, p.125-127, 1986. DOI: 10.1016/0038-0717(86)90118-5.
- RUFINI, M.; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; OLIVEIRA, D.P.; ANDRADE, M.J.B. de; MOREIRA, F.M. de S. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.81-88, 2011. DOI: 10.1590/S0100-204X2011000100011.
- RUFINI, M.; SILVA, M.A.P. da; FERREIRA, P.A.A.; CASSETARI, A.S.; SOARES, B.L.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutradox. **Biology and Fertility of Soils**, v.50, p.115-122, 2014. DOI: 10.1007/s00374-013-0832-4.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: USP, 1979. 27p.
- SOARES, A.L. de L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M. do; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B. de; MOREIRA, F.M. de S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões, MG: I - caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.795-802, 2006. DOI: 10.1590/S0100-06832006000500005.
- SOARES, B.L.; FERREIRA, P.A.A.; OLIVEIRA-LONGATTI, S.M. de; MARRA, L.M.; RUFINI, M.; ANDRADE, M.J.B. de; MOREIRA, F.M.S. Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. **Scientia Agricola**, v.71, p.171-180, 2014. DOI: 10.1590/S0103-90162014000300001.
- SOUZA, F.H.D. de; FRIGERI, F.; MOREIRA, A.; GODOY, R. **Produção de sementes de guandu**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 68p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 69).
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).

Recebido em 15 de janeiro de 2014 e aprovado em 13 de março de 2014