

ANDRÉ SUÊLDO TAVARES DE LIMA

**MAXIMIZAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N₂ PELA INTERAÇÃO BPCP_s
X RIZÓBIOS X FMA NO CAUPI**

**Recife - PE
Fevereiro, 2009**

ANDRÉ SUÊLDO TAVARES DE LIMA

**MAXIMIZAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N₂ PELA INTERAÇÃO BPCP_s
X RIZÓBIOS X FMA NO CAUPI**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência.

Orientadora: Márcia do Vale Barreto Figueiredo, D.Sc.

Co-orientadores: Hélio Almeida Burity, Ph.D.

Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão, D.Sc.

Recife - PE

Fevereiro, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

L732m Lima, André Suêlto Tavares de
Maximização da fixação biológica do N₂ pela interação
BPCPs X Rizóbios X FMA no Caupi / André Suêlto Tavares de Lima. -- 2009.
45 f. il.

Orientadora : Márcia do Vale Barreto Figueiredo
Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Inclui bibliografia.

CDD 631.46

1. Crescimento
 2. Solubilização de fosfato
 3. *Vigna unguiculata*
 4. AIA
 5. Simbiose
 6. Co-inoculação
- I. Figueiredo, Márcia do Vale Barreto
 - II. Título

**MAXIMIZAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N₂ PELA INTERAÇÃO BPCP_s
X RIZÓBIOS X FMA NO CAUPI**

ANDRÉ SUÊLDO TAVARES DE LIMA

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 19/02/2009:

Orientadora:

Márcia do Vale Barreto Figueiredo, D.Sc.

Examinadores:

Carolina Etiene de Rosália e Silva Santos, D. Sc.

Janete Magali de Araújo, D. Sc.

Uided Maaze Tiburcio Cavalcante, D. Sc.

Ao meu pai, Ambrosio Tavares de Lima,
meu eterno orientador, tanto em minha vida pessoal
quanto profissional, por seu incondicional incentivo e
estímulo para que eu prossiga na carreira científica.

DEDICO

A Terezinha Ferreira Xavier,
que comigo caminhou e me ajudou por esses dois
longos anos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que nunca me desamparou nesta longa caminhada, me dando força e esperança para superar todos os obstáculos.

Aos meus pais Ambrosio e Salete e todos meus familiares em especial Aydê, Adriana, Ciluana, Camila, Elano, Ana Clara e João Vitor que sempre estiveram do meu lado me apoiando nos momentos mais difíceis e foram fonte de estímulo para conclusão deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, Denise, Gerlúcio e Virginia, que sempre acreditaram no meu potencial.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao programa de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo pela oportunidade de poder me especializar na área de solos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, que me acolheu não só nestes dois anos, mas em toda minha vida acadêmica.

Ao laboratório de Biologia do Solo – IPA, que proporcionou suporte técnico para conclusão deste trabalho.

À Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo pela sugestão do tema de pesquisa, orientação no transcorrer da condução deste trabalho, e pelos valiosos ensinamentos de vivência profissional.

Ao Dr. Hélio Almeida Burity pela confiança e contribuição concedida neste trabalho.

À Dra. Adália Mergulhão pela valiosa co-orientação e contribuição neste trabalho.

Ao Dr. José de Paula Oliveira que não mediu esforços para o sucesso deste trabalho.

Aos pesquisadores do IPA, Dr. Luiz Gonzaga e Dr^a. Marta Assunção que me modelaram sutilmente para fazer parte da comunidade científica.

Ao Dr. Venezio Santos pelos esclarecimentos estatísticos.

À todos os colegas do IPA: Almira, Anybia, Carminha, Eidy, Fabio, Lucinha, Maria do Carmo, Sonia, Tailton, Valeria, Waldemar, Mário Leandro pelo convívio diário e ajuda prestada.

As professoras Carolina Etiene, Janete Magali, Lucy Seldin e Uided Maaze, pela colaboração neste trabalho.

Aos professores (as) Izabel Galindo, Mario Junior, Dimas Menezes e Rosimar Santos pelos ensinamentos acadêmicos.

À Maria do Socorro Santana, que sempre esteve disposta a colaborar, com simpatia e dedicação.

Aos colegas de curso pelos bons momentos que compartilhamos.

À Terezinha Xavier pela amizade, companheirismo e conversas que ajudaram na minha formação tanto científica como pessoal no decorrer deste curso.

E, finalmente, a todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

	Pág
CAPITULO 1 – Co-Inoculação <i>Bacillus</i>, <i>Brevibacillus</i> e/ou <i>Paenibacillus</i> na Simbiose <i>Bradyrhizobium</i>-Caupi: Estudo do Sinergismo.	
Tabela 1 – Altura da planta, comprimento da raiz (CR), matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e nódulo (MSN) e relação MSPA/MSR e número de nódulos (Nº nód.) nas plantas de caupi co-inoculadas com <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> e <i>Paenibacillus</i> vs <i>Bradyrhizobium</i> sp.	28
Tabela 2 – Teor de nitrogênio na matéria seca da parte aérea (Teor N), nitrogênio acumulado na MSPA (N ac), eficiência da fixação de N ₂ (EFN ₂), nodulação específica (NE) e tamanho de nódulo (T nód) nas plantas de caupi co-inoculadas com <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> e <i>Paenibacillus</i> vs <i>Bradyrhizobium</i> sp.	29
CAPITULO 2 – Resposta da Tripla Inoculação <i>Bradyrhizobium</i> X <i>Glomus</i> X <i>Paenibacillus</i> na Eficiência Simbiótica e Desenvolvimento do Caupi	
Table 1 – Chemical characteristics of the Yellow Argisol soil.	42
Table 2 – Physical characteristics of the Yellow Argisol soil concerning granulometry, class textural, bulk density (Dg), particle density (Dp), total porosity (Pt), field capacity (CF) and the permanent wilting point (PWP).	42
Table 3 – Shoot dry matter (SDM), nitrogen accumulation (N ac.) in cowpea plants and easily extractable glomalin (EEG) from soil in treatments with strains of <i>Bradyrhizobium</i> sp. BR 3267 and EI – 6 inoculated separately and in combination (BR 3267 + EI - 6), control without inoculation and without nitrogen (TA) and control without inoculation and with nitrogen (TN).	42

Table 4 – Shoot dry matter (SDM) of cowpea plants inoculated with strains of *Bradyrhizobium* sp. BR 3267, EI – 6 separately and in mixture (BR 3267 + EI – 6), absolute control (TA) without inoculation and without nitrogen and nitrogen control (TN) without inoculation and with nitrogen, combined with or without inoculation of AMF - *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann. 42

Table 5 – Plant height at 10, 20, 30 and 40 days; root length (RL), shoot dry matter (SDM), root (RDM) and nodule (NDM), SDM/RDM ratio, nitrogen accumulation (N ac.) N content, N₂ efficiency (N₂FE), leghemoglobin (LHb), phosphorus content (P) in the cowpea plants and number of spores (No esp) and easily extractable glomalin (EEG) in soil with or without inoculation with AMF - *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann. 43

Table 6 - Plant height at 10, 20, 30 and 40 days, root length (RL), shoot dry matter (SDM), root (RDM) and node (NDM), SDM/RDM ratio, nitrogen accumulation (N ac.) N content, N₂ efficiency (N₂FE), leghemoglobin (LHb), phosphorus content (P) in the cowpea plant and number of spores (No esp) and easily extractable glomalin (EEG) in soil with or without inoculation of PGPB - *Paenibacillus brasilensis* (24). 44

SUMÁRIO	Pág
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO GERAL	X
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO GERAL	01
REVISÃO DE LITERATURA	02
Caupi (<i>Vigna unguiculata</i> [L.] Walp.)	02
Fixação biológica do nitrogênio (FBN) em leguminosas	03
Bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs)	04
Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs)	05
Referências bibliográficas	07
CAPITULO 1 – Co-Inoculação <i>Bacillus</i>, <i>Brevibacillus</i> e/ou <i>Paenibacillus</i> na Simbiose <i>Bradyrhizobium</i>-Caupi: Estudo do Sinergismo	12
Resumo	13
Summary	14
Introdução	15
Material e métodos	17
Resultados e discussão	19
Conclusões	23
Literatura citada	23
CAPITULO 2 – Response of the Triple Inoculation of <i>Bradyrhizobium</i> X <i>Glomus</i> X <i>Paenibacillus</i> in the Symbiotic Efficiency and Cowpea Development	30
Abstract	31
Introduction	32
Material and Methods	33
Results and discussion	35
Conclusions	38
References	39
CONCLUSÕES GERAIS	45

RESUMO GERAL

O feijão caupi *Vigna unguiculata* [L.] Walp. é a principal cultura de subsistência do semi-árido e uma fonte de proteínas de baixo custo, notadamente, para as populações carentes. A produção desta cultura no Nordeste é baixa devido a não utilização de insumos agrícolas dentre eles o nitrogênio. O uso de microrganismos para o aumento da produção agrícola, será provavelmente uma das táticas mais importantes para a atualidade no mundo. Isso se deve à demanda emergente para a diminuição da dependência de fertilizantes químicos e a necessidade de desenvolvimento da agricultura sustentável. Entre os sistemas biológicos envolvendo planta e microrganismos, temos as simbioses leguminosas-rizóbios, de maior expressão econômica, leguminosas-fungos micorrízicos arbusculares e ainda a utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs). Os objetivos deste trabalho foram: verificar a viabilidade da co-infecção das sementes de caupi pela co-inoculação *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e/ou *Bacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi; caracterizar as estirpes quanto à produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato avaliando o sinergismo entre os microrganismos, assim como avaliar a resposta da tripla inoculação (*Bradyrhizobium* x *Glomus* x *Paenibacillus*) na promoção de crescimento do caupi como alternativa para maximizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN). A primeira parte dos experimentos foi conduzida em laboratório e em casa de vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), utilizando o caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cv. “IPA – 206”. As estirpes de *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* utilizadas foram: *Bacillus* sp. – ANBE 31, 449, 450, 451 e 461, *B. cereus* – 440, *B. subtilis* – 438, 441, 454, 455 e 459, *B. pumilus* – 444, 445 e 448, *B. megaterium* – 462 e *Brevibacillus brevis* – 447, *Paenibacillus brasiliensis* – 24, 172 e 177, *P. graminis* – MC 04.21, MC 22.13 e BR 60106, *P. polymyxa* – S21 e *P. durus* – RBN4. A segunda parte do experimento foi conduzida em casa de vegetação do IPA, utilizando a mesma leguminosa do experimento anterior. Os tratamentos utilizados foram os seguintes: estirpes de *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 e EI – 6 inoculadas isoladamente; inoculação em mistura com as estirpes (BR 3267 + EI – 6); testemunhas absoluta (TA) e nitrogenada (TN), combinados com a presença e ausência de fungo micorrízico arbuscular (FMA - *Glomus etunicatum*) e bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP - *Paenibacillus brasiliensis*- 24), em um fatorial 5x2x2. Foram efetuados contrastes dos tratamentos para estudo das variáveis. Os microrganismos não apresentaram capacidade para produzir AIA e nem solubilizar fosfato. Foi verificado sinergismo entre as estirpes de *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* co-inoculadas com *Bradyrhizobium* no caupi. A inoculação com *Paenibacillus brasiliensis* (24), foi superior em relação as demais estirpes proporcionando uma melhor performance simbiótica. A co-inoculação *Bradyrhizobium* e *Bacillus pumilus* – 444 inibiu a eficiência simbiótica do caupi. As inoculações com *Bradyrhizobium* sp. (BR3267 + EI 6) x *Glomus etunicatum* favoreceram o processo de aquisição de nitrogênio e disponibilidade de fósforo às plantas de caupi. A inoculação com *Paenibacillus brasiliensis* (24), incrementou o processo de infecção pelos *Bradyrhizobium* sp. e *Glomus etunicatum*, assim como favoreceu a promoção de crescimento do caupi. É importante relatar que o nitrogênio proveniente da simbiose foi suficiente para suprir as necessidades das plantas.

GENERAL ABSTRACT

The cowpea *Vigna unguiculata* [L.] Walp. is the main subsistence crop in the semi-arid and a low cost source of protein especially for the poor population. The crop production is low in the Northeast due to the non use of agricultural inputs, among them nitrogen. The use of microorganisms to increase agricultural production is probably one of the most important tactics for today in the world. This is due to the emerging demand to decrease dependence on chemical fertilizers and the need for development of sustainable agriculture. Among the biological systems involving plants and microorganisms, there are the legume-rhizobia symbioses with the most economical expression, legume-arbuscular mycorrhizal fungi and the use of plant growth promoting bacteria (BPCPs). The objectives of this study were: to determine the viability of co-infection of cowpea seed by the co-inoculation of *Paenibacillus*, *Brevibacillus* and/or *Bacillus* in the symbiosis *Bradyrhizobium*-cowpea; characterize the strains concerning production of the indole acetic acid (IAA) and phosphate solubilization evaluating the synergism among microorganisms as well as evaluating the response of the triple inoculation (*Glomus* x *Bradyrhizobium* x *Paenibacillus*) in promoting cowpea growth as an alternative to maximize the biological nitrogen fixation (BNF). The first part of experiments was conducted in the laboratory and in the greenhouse of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA) using the cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cv. "IPA - 206. The strains of *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* used were: *Bacillus* sp. (ANBE 31, 449, 450, 451 and 461), *B. cereus* (440), *B. subtilis* (438, 441, 454, 455 and 459), *B. pumilus* (444, 445 and 448), *B. megaterium* (462), *Brevibacillus brevis* (447), *Paenibacillus brasiliensis* (24, 172 and 177), *P. graminis* (04.21 MC, MC 22:13 and BR 60106), *P. polymyxa* (S21) and *P. durus* (RBN4). The second part of the experiment was conducted in a greenhouse of IPA, using the same legume in the previous experiment. The treatments used were: strains of *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267 and EI - 6) inoculated alone; inoculation in combination with the strains (BR 3267 + EI - 6), controls (absolute (TA) and nitrogen (TN)), combined with the presence and absence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF - *Glomus etunicatum*) and plant growth promoting bacteria (BPCP - *Paenibacillus brasiliensis* (24) in a 5x2x2 factorial. Treatments contrasts were performed to study the variables. The microorganisms showed neither capacity to produce IAA nor solubilize phosphate. Synergism was observed between strains of *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* co-inoculated with *Bradyrhizobium* in cowpea. The inoculation with *Paenibacillus brasiliensis* (24) was higher than the other strains providing a better symbiotic performance. Co-inoculation *Bradyrhizobium* and *Bacillus pumilus* (444) inhibited the symbiotic efficiency of cowpea. The inoculation with *Bradyrhizobium* sp. (BR3267 + EI 6) x *Glomus etunicatum* favored the nitrogen acquisition and phosphorus availability to cowpea plants. The inoculation with *Paenibacillus brasiliensis* (24), increased the process of infection by *Bradyrhizobium* sp. and *Glomus etunicatum* and stimulated the promotion of cowpea growth. It is important to report that the nitrogen from the symbiosis was sufficient to supply the needs of plants.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas estão constantemente expostas a grande variedade de microrganismos. No entanto, apenas parte deles especializou-se durante a evolução na interação com as plantas. Considerando que o fato de haver interação entre espécies não necessariamente significa contato direto entre organismos envolvidos ou alterações morfológicas ou fisiológicas e pode-se afirmar que, de maneira geral, se conhece muito pouco quais espécies de microrganismos interagem com plantas, como se dá a interação e qual sua importância (Hoffmann; Lucena, 2006).

O solo é um reservatório de diversidade de espécies microbianas, que entram em contato com as plantas via raiz. As raízes das plantas são importantes para grande número de espécies microbianas, uma vez que, na maior parte do tempo, o solo é pobre em carbono orgânico, que é fonte de energia para a maioria dos microrganismos, os quimiotróficos, que ficam então em inanição (Cardoso et al., 1992). Neste contexto, as raízes são as principais fontes de matéria orgânica e, conseqüentemente, os microrganismos ploriferam na região da rizosfera, onde há constante aporte de uma variedade de compostos orgânicos exsudados pelas raízes. Outras alterações produzidas no solo pelas raízes também afetam os microrganismos, tais como a absorção localizada de água e nutrientes, reumidificação e alterações físicas. Assim, a comunidade microbiana da rizosfera difere daquelas encontradas em outras regiões do solo (McCully, 1999).

Algumas das bactérias que vivem na rizosfera promovem alterações que estimulam o desenvolvimento das plantas, o que pode ocorrer através da disponibilização do fósforo, através da solubilização de fosfatos inorgânicos pela ação de ácidos orgânicos ou mineralização de fosfato orgânico. As plantas podem beneficiar-se também pela produção de sideróforos e/ou hormônios vegetais produzidos por estas bactérias. Elas podem também ajudar na proteção a patógenos, por meio da produção de metabólitos tóxicos, competição por nutrientes, indução de reação fisiológica sistêmica da planta, com efeito de resistência. Essas bactérias são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (Kapulnik, 1996). Podem também associar-se às raízes, bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre, beneficiando as plantas através da conversão do nitrogênio atmosférico em forma assimilável (Kapulnik, 1996; Baldani, 2001).

As interações mais estudadas e conhecidas são aquelas em que ocorrem alterações morfofisiológicas nos organismos envolvidos e que, ao mesmo tempo, têm maior relevância econômica: a simbiose e a patogênese. As simbioses definem-se como uma relação onde

ocorrem alterações morfológicas e benefício para os organismos envolvidos, isto é, planta e microssimbionte, enquanto que na patogênese o microrganismo é favorecido em detrimento da planta (Hoffmann; Lucena, 2006). Os objetivos deste trabalho foram: verificar a viabilidade da co-infecção das sementes de caupi pela co-inoculação *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e/ou *Bacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi; caracterizar as estirpes quanto à produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato avaliando o sinergismo entre os microrganismos, assim como avaliar a resposta da tripla inoculação (*Bradyrhizobium* x *Glomus* x *Paenibacillus*) na promoção de crescimento do caupi como alternativa para maximizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN).

REVISÃO LITERATURA

Caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.)

O caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é uma cultura antiga de origem africana, cultivada nos trópicos e sub-trópicos, apresenta relativa tolerância a períodos secos (Souza, 1991), principalmente as cultivares de crescimento indeterminado (Miranda et al., 1985). As cultivares apresentam variações em relação ao período de tolerância a estresse hídrico, o que contribui decisivamente para sua implantação na região Nordeste do Brasil (Summerfield et al., 1975).

O caupi vulgarmente conhecido por feijão macassar, feijão-de-corda ou feijão verde é a mais importante leguminosa de grãos do Semi-Árido brasileiro, e exerce a função de suprir parte das necessidades protéicas das populações mais carentes da região (Teixeira et al., 1988). Seus grãos são consumidos na forma seca (quiescente) ou verde (imatura). Nutricionalmente são predominantemente constituídos de carboidratos (65% em média) e proteína (24% em média), sendo também fonte de fibras, vitaminas e minerais. Entre os micronutrientes mais importantes presentes nos grãos de feijão-caupi podem ser citados o ferro e o zinco (Rocha, 2007).

É difundido em várias regiões do país como hortaliça, para produção de grãos verdes e vagens, e os ramos e folhas são utilizados para alimentação animal, sendo consumidas naturalmente ou como feno (Oliveira; Carvalho, 1998).

Pela rusticidade e capacidade de se desenvolver bem em solos de baixa fertilidade, constitui também uma opção como fonte de matéria orgânica para utilização como adubo

verde na recuperação de solos naturalmente pobres em fertilidade ou esgotados pelo uso intensivo (Oliveira; Carvalho, 1998). Na realidade, a baixa produtividade desta cultura está associada ao baixo nível tecnológico empregado em sua produção, destacando-se a baixa disponibilidade hídrica, baixa qualidade genética de sementes e baixo uso de insumos como fertilizantes e inoculantes rizobianos (Costa, 1989).

Fixação biológica do nitrogênio (FBN) em leguminosas

A simbiose leguminosas-bactérias fixadoras de N_2 atmosférico é amplamente aceita como alternativa à fertilização química. Bactérias do grupo dos rizóbios têm a capacidade de formar nódulos em raízes e caules de leguminosas e possuem papel importante na agricultura sustentável (Freitas et al., 2007). A nitrogenase, enzima responsável por este processo, é confinada a um número limitado de espécies (Young, 1996). Dentre essas espécies de microrganismos que possuem a nitrogenase, estão àquelas conhecidas genericamente como rizóbios, que formam nódulos nas raízes das leguminosas (Fabaceae), e são reconhecidos como os principais fixadores de nitrogênio atmosférico. Até recentemente, era geralmente aceito que as leguminosas eram noduladas exclusivamente por membros das α -proteobactérias, pertencentes a alguns gêneros relacionados à família Rhizobiaceae que inclui *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Young, 1996; Van Berkum; Eardly, 1998). Nos últimos anos, entretanto, outras α -proteobactérias foram mostradas como noduladoras de leguminosas (Moullin et al., 2002) incluindo estirpes de *Methylobacterium* (Sy et al., 2001); *Blastobacter* (Van Berkum; Eardly, 2002) e *Devosia* (Rivas et al., 2002).

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre (em torno de 79%), estando presente principalmente na forma diatômica (N_2) e é um dos principais macronutrientes dos vegetais. Algumas bactérias que coexistem em simbiose ou não nas raízes de plantas, possuem enzimas com capacidade de redução do nitrogênio atmosférico, transformando-o em amônia e posteriormente em elementos essenciais (Lodeiro et al., 2000).

A habilidade das bactérias do gênero *Rhizobium* para fixar nitrogênio em simbiose com as leguminosas é de considerável importância agrícola (Jensen et al., 2003), entretanto, tipo de solo, clima e cultivar podem afetar a resposta da inoculação, sendo assim, necessário pesquisas para se determinar qual estirpe é mais eficiente para estas condições (Rumjanek; Xavier, 2007). As leguminosas têm, ao seu dispor, duas fontes de nitrogênio: o mineral, proveniente do solo e/ou fertilizante, e o nitrogênio fixado biologicamente através da

simbiose com rizóbios. Entretanto, o aumento vertiginoso dos preços dos adubos nitrogenados devido ao consumo de energia fóssil em sua fabricação, aliada aos graves problemas de poluição causados pelo uso intensivo desses adubos, têm deixado a agricultura dos países em desenvolvimento e dos desenvolvidos apenas as alternativas de maximizar a fixação biológica de nitrogênio, otimizar a distribuição e emprego dos compostos nitrogenados dentro das plantas e tornar mais eficiente a utilização de carboidratos pelos nódulos (Neves; Rumjanek, 1996; James, 2000).

O crescimento e a produção das leguminosas são pelo menos em parte, resultados da interação entre as cultivares das plantas, as estirpes de rizóbios e as condições ambientais em que o sistema simbiótico se desenvolve e que afetam a assimilação, distribuição e utilização do carbono e nitrogênio pelas plantas. A disponibilidade de nitrogênio para as sementes em desenvolvimento determina a produção e depende de uma fixação de nitrogênio que se prolongue até o período de enchimento dos grãos (Neves; Rumjanek, 1997).

A fixação biológica do nitrogênio dar-se-á mediante a presença de nódulos nas raízes induzidos pela infecção das raízes pelas bactérias (Uribe, 1994; Hungria et al., 2000). O desenvolvimento dos nódulos será iniciado pela troca de sinais químicos moleculares entre a planta e o simbionte (Hungria et al., 1994).

Os nódulos e a planta hospedeira são perfeitamente interligados por meio de vasos xilemáticos e floemáticos e, portanto, totalmente integrados em termos hormonais e nutricionais. O processo de fixação do nitrogênio também requer um suprimento contínuo de carboidratos que fornecem tanto a energia para a redução do nitrogênio, quanto os esqueletos de carbono necessários à assimilação da amônia produzida. Durante os processos de infecção e desenvolvimento dos nódulos, energia é necessária às divisões celulares e é obtida da oxidação dos carboidratos produzidos na parte aérea da planta hospedeira (Neves, 1992; Silveira et al., 2001).

Bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs)

Bactérias promotoras de crescimento em plantas – BPCPs são aquelas que encontram-se em habitats naturais colonizando de forma interna e externa órgãos de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas (Mariano et al., 2004).

O uso de BPCPs impacta a produção agrícola, pelo aumento de rendimento (Kloepper et al., 1989). As BPCPs atuam indiretamente pela supressão de doenças e diretamente pela produção ou alteração da concentração de fitohormônios de crescimento como giberelinas, auxinas e citocininas (Melo; Azevedo, 1998), fixação de N₂, pela solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo; oxidação de sulfatos; aumento de permeabilidade das raízes e; produção de sideróforos (Cattelan, 1999; Mariano; Kloepper, 2000), produção de enzimas e ácido cianídrico (HCN), eliminação e alteração da microbiota deletéria, e produção de antibióticos extracelulares (Enebak et al., 1998).

Como exemplos dos efeitos de BPCPs na produção podemos citar os aumentos de até 48% na produção de cenoura e de até 37% na produção e nodulação do amendoim com a inoculação de *Bacillus subtilis* (Merriman et al., 1974) e (Turner; Backman, 1991), respectivamente. Li e Alexander (1988) conseguiram incrementar a colonização e a nodulação de soja, através da co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de antibióticos. Outros relatos demonstram efeitos positivos na nodulação pela co-inoculação de rizóbio com outras espécies de bactérias (Stamford et al., 2003; Silva et al., 2006, 2007; Figueiredo et al., 2007). Essa contribuição foi relacionada com a produção de fitormônios, pectinase ou sinais moleculares, em *Bacillus cereus* (Halverson; Handelsman, 1991), *Azospirillum* spp. (Andreeva et al., 1991; Hamaoui et al., 2001; Bahat-Samet et al., 2004), *Agrobacterium* (Caetano-Anollés; Bauer, 1988) e outras espécies de microrganismos (Dakora, 2003). Segundo Silva et al. (2006), a simbiose entre *Bradyrhizobium* e caupi, juntamente com as BPCPs, *Paenibacillus polymyxa* -Loutit (L) e *P. macerans* - LBF-410, estimula a nodulação e pode promover melhor eficiência na fixação do N₂.

Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs)

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são microrganismos simbiotes pertencentes ao filo Glomeromycota (Schüssler et al., 2001) que formam associações mutualísticas com raízes da maioria das plantas superiores, incluído muitos cultivos de grãos de interesse comercial. A literatura enfatiza amplamente a utilização destes na captação de nutrientes (Jeffries et al., 2003), proteção frente à patógenos radiculares (Newsham et al., 1995), tolerância a fitotoxidade por alumínio (Borie; Rubio, 1999), manganês (Mendoza; Borie, 1998) e déficit hídrico (Ruiz-Lozano; Azcón, 1995) sendo responsáveis pela diversidade de espécies de plantas (van der Heijden et al., 1998). Os FMAs, além de

umentarem a capacidade das plantas em absorver água e nutrientes, são capazes de tolerar estresses diversos, como aqueles causados por metais tóxicos do solo (Siqueira et al., 1999).

Resultados experimentais permitem afirmar que é válida a inoculação do feijão-de-corda com fungos formadores de micorrizas VA (*Glomus epigaeum*, *G. macrocarpum*, *G. fasciculatum*, *Gigaspora margarita* e *Acaulospora laevi*), mostrando-se todos eficientes em associação com a citada leguminosa (Almeida et al., 1985).

A formação de agregados no solo é um dos benefícios da simbiose micorrízica arbuscular e hospedeiro e pensava-se que esta característica estava ligada apenas à trama de hifas presentes no solo (Mergulhão et al., 2008). Em meados da década de 1990, Wright; Upadhyaya (1996) observaram a presença de uma proteína produzida pelos FMA denominada glomalina, a qual está relacionada à agregação de partículas e ao conseqüente estoque de carbono no solo (Mergulhão, 2006). A quantificação da glomalina no solo pode constituir importante indicador de mudanças causadas pelo uso da terra e por isso poderia se tornar bom indicador de reabilitação (Rillig et al. 2003). Ainda segundo Rillig et al. (2003), outro aspecto interessante relacionado ao teor de glomalina no solo é que sua quantificação experimental tem demonstrado variações em termos de concentração em resposta a perturbações no ecossistema. A presença da glomalina é um dos principais requisitos, além da água, que diferenciam um terreno fértil de um solo arenoso.

A produção de glomalina total pode chegar a 3,65 mg g⁻¹ solo em áreas revegetadas com plantas micorrizadas (Caravaca et al., 2005). Em áreas agrícolas, Rillig et al. (2003) verificaram que os valores de glomalina facilmente extraível e total estão em torno de 0,5 e 3 mg g⁻¹. A glomalina pode servir como fonte de nutrientes no solo (Harner et al., 2005); sua produção é dependente da espécie de FMA (Wright; Upadhyaya, 1996; Rillig et al., 2005) e a presença e o tipo de vegetal afetam a produção desta proteína (Wright; Anderson, 2000; Bird et al., 2002; Rillig et al., 2002). O uso de FMA com maior potencial para produção desta proteína no solo é indicado por melhorar as condições edáficas e o crescimento do hospedeiro (Piotrowski et al., 2004; Rillig, 2004; Mergulhão et al., 2008).

Referências bibliográficas

- ALMEIDA, R.T.; VASCONCELOS, I.; SABADIA, F.R.B. Efeito da infecção de fungos micorrizicos VA em feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* [L.] Walp. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 16, julho, p. 23-26, 1985.
- ANDREEVA, I.N.; MANDKHAN, K.; RED'KINA, T.V.; MISHUSTIN, E.N.; IZMAILOV, S.F. Effect of *Azospirillum brasilense* on formation and nitrogenfixing activity of bean and soybean nodules. **Soviet Plant Physiology**, New York, v. 38, p.897-904, 1991.
- BAHAT-SAMET, E.; CASTRO-SOWINSKI, S.; OKON, Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p.195-203, 2004.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485-491, 2001.
- BIRD, S.B.; HERRICK, J.E.; WANDER, M.M.; WRIGHT, S.F. Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. **Environmental Pollution**, v. 116, p. 445-455, 2002.
- BORIE, F., RUBIO, R. Effects of arbuscular-mycorrhizae and liming on growth and mineral acquisition of Aluminum-tolerant and Aluminum-sensitive barley cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v. 22, p. 121-137, 1999.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BAUER, W.D. Enhanced nodule initiation on alfafa by wild-type *Rhizobium meliloti* co-inoculated with *nod* gene mutants and other bacteria. **Planta**, Berlin, v. 174, p. 385-395, 1988.
- CARAVACA, F. ALGUALCIL, M.M., BAREA, J.M., ROLDÁN, A. Survival of inocula and native AMF fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 227-233, 2005.
- CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, 360p.
- CATTELAN, A.J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. p. 36.
- COSTA, R.C.L.; LOPES, N.F.; OLIVA, M.A.; BARROS, N.F.. Crescimento e conversão de energia solar em Feijoo submetido a três doses de nitrogênio e dois regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 12, p. 1439-1450, 1989.
- DAKORA, F. D. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. **New Phytologist**, v.158, p. 39-49, 2003.
- ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOEPPER, J.W. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedling. **Forest Science**, Bethesda v.44, n.1, p.139-144, 1998.
- FIGUEIREDO, M.V.B; BURITY, HA, MARTINEZ, C.R.; CHANWAY, C.P. Drought stress response on some key enzymes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) nodule metabolism, **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 187-193, 2007.
- FREITAS, A. D. S. de; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. de R. e S. et al. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino no Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.
- HALVERSON, L.J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2767-2770, 1991.
- HARNER, M.J., RAMSEY, P.W., RILLIG, M.C. Protein accumulation and distribution in floodplain and river foam. **Ecology Letters**, v. 7, p. 829-836, 2005.

- HAMAOU, B.; ABBADI, J.M.; BURDMAN, S.; RASHID, A.; SARIG, S.; OKON, Y. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. **Agronomie**, n. 21, p. 553-560, 2001.
- HOFFMANN, L.V.; LUCENA, V.S. **Para Entender Micorrizas Arbusculares**. Campina Grande: EMBRAPA ALGODÃO, 2006. 22 p. (EMBRAPA ALGODÃO. Documentos, 156).
- HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 542 p.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology Biochemistry**, v. 32, p.1515-1528, 2000.
- JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, p. 197-209, 2000.
- JENSEN, E.S.; HAUGGAARD-NIELSEN, H. How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? **Plant and Soil**, v. 252, p. 177-186, 2003.
- JEFFRIES, P.; GIANINAZZI, S.; PEROTTO, S.; TURNAU, K.; BAREA, J.M. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. **Biology and Fertility of Soil**, v. 37, p. 1-16, 2003.
- KAPULNIK, Y. Plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A; KAFKAFI, U (ed.). **Plant roots: the hidden half**, New York: Marcel Dekker, 1996. Cap.37, p.757-768.
- KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. **Trends Biotechnology**, v. 7, p. 39-43, 1989.
- LI, D.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, v. 108, p. 211-219, 1988.
- LODEIRO, A. R.; GONZÁLEZ, P.; HERNÁNDEZ, A.; BALAGUÉ, L.J.; DAVELUKES, G. Comparison of drought tolerance in nitrogen-fixing and inorganic nitrogen-grow common beans. **Plant Science**, v. 154, p. 31-41, 2000.
- MARIANO, R.L.R.; KLOEPPER, J.W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 121-137, 2000.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. Mancha aquosa: importante bacteriose do meloeiro no Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 79-88, 2004.
- McCULLY, M. E. Roots in soil: unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 695-718, 1999.
- MELO, I.S.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, Cap.1, p. 15-60, 1998.
- MENDOZA, J., BORIE, F. Effect of *Glomus etunicatum* inoculation on aluminum, phosphorus, calcium, and magnesium uptake of two barley genotypes with different aluminum tolerance. **Commun. Soil Science. Plant Anal.** v. 29, p. 5-6, 1998.
- MERGULHÃO, A.C.E.S. **Aspectos ecológicos e moleculares de fungos micorrízicos arbusculares**. 2006. 152p. Tese (Doutorado Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- MERGULHÃO, A.C.E.S.; BURITY, H.A.; MAIA, L.C.; SILVA, F.S.B. Glomalina: a glicoproteína dos fungos micorrízicos arbusculares. Parte II – Microrganismos Promotores de Crescimento em Plantas. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY,

- H.A.; STAMFORD, N.P. & SANTOS, C.E. de R. e S. Microorganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura. 1.ed. Guaíba, Agrolivros. 2008. p 333–347.
- MERRIMAN, P.R.; PRICE, R.D.; KOLLMORGEN, J.F.; PIGGOTT, T.; RIDGE, E.H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. **Journal of Agriculture Research**, series A, v. 25, p. 219-226, 1974.
- MIRANDA, P. et al.. **Deficiência hídrica na cultura do feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. In: EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Recife-PE): Programa feijão; relatório final de pesquisa. Recife, 1985. p. 93-103.
- MOULIN, L., CHEN, W-M., BÉNA, G., DREYFUS, B., BOIVIN-MASSON, C. **Rhizobia: the family is expanding**. in: Nitrogen Fixation: Global Perspectives. T. Finan, M. O'Brian, D. Layzell, K. Vessey, and W. Newton, eds. CAB International, p. 61-65, 2002.
- MOREIRA F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2rd Ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.
- NEVES, M.C.P. Como os microrganismos do solo obtêm energia e nutrientes. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Brasília: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. p. 17-31.
- NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. **Ecologia do rizóbio nos solos tropicais**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1996, 27p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, Rio de Janeiro).
- NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 889-895, 1997.
- NEWSHAM, K.K., FITTER, A.H., WATTERSON, A.R. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. **Journal of Ecology**, v. 3, p. 991-1000, 1995.
- OLIVEIRA, I.P.; CARVALHO, A.M.A cultura do caupi nas condições de clima e de solo dos trópicos úmidos e semi-áridos do Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CNPAB, 1998. p. 60-96.
- PIOTROWSKI, J.S.; DENICH, T.; KLIRONOMOS, J.N.; GRAHAM, J.M.; RILLIG, M.C. The effects of arbuscular mycorrhizas on soil aggregation depends on the interaction between plant and fungal species. **New Phytologist**. v. 164, p. 365-373, 2004.
- RILLIG, M.C.; WRIGHT, S.F.; EVINER, V. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. **Plant and Soil**, v. 238, n. 2, p. 325-333, 2002.
- RILLIG, M.C.; RAMSEY, P.W.; MORRIS, S.; PAUL, E.A. Glomalin, an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein, responds to soil-use change. **Plant and Soil**, v. 253, p. 293-299, 2003.
- RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 28, n. 4, p. 355-363, 2004.
- RILLIG, M.C. A connection between fungal hydrophobins and soil water repellency? **Pedobiology**, v. 49, p. 395-399, 2005.
- RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N.S.; MATEOS, P.F.; GILLIS, M.; DAZZO, F.B.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) **Druce Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5217-5222, 2002.

- ROCHA, M.M. **O feijão-caupi combatendo a desnutrição.** Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&idT=1155>. Acesso em: 01 nov. 2007.
- RUIZ-LOZANO, J.M., AZCÓN, R. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. **Physiology Plantarum**, v. 95, p. 472-478, 1995.
- RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. **Inoculação do feijão-caupi: uma tecnologia que garante aumento real na produtividade.** Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&idT=883>. Acesso em: 01 nov. 2007.
- SCHÜSSLER, D., SCHWARZOTT, A., WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, p. 1413-1421, 2001.
- SIQUEIRA, J.O. Efeito da formononetina (7Hidroxi, 4 Metoxi Isoflavona) na colonização micorrízica e crescimento do milho em solo contendo excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 561-568, 1999.
- SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; FIGUEIREDO, M.V.B. Atuação de rizóbios com rizobactérias promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Acta Science Agronomy**, v. 28, p. 407-412, 2006.
- SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; MARTÍNEZ, C.R.; SELDIN, L.; BURITY, H.A.; FIGUEIREDO, M.V.B. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi. **Acta Science Agronomy**, v. 29, p. 331-338, 2007.
- SILVEIRA, J.A.G. DA; COSTA, R.C.L. DA; OLIVEIRA, J.T.A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 187-194, 2001.
- SOUZA, L.V. **Efeito da deficiência hídrica sobre o crescimento, a fixação do dinitrogênio e a produção de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.).** 1991. 98p. Dissertação (Mestrado Agronomia Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1991.
- STAMFORD, N.P.; FREITAS, A.D.S.; FERRAZ, D S.; MONTENEGRO, A.; SANTOS, C.E.R.S. Nitrogen fixation and growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) in a sodic soil as affected by gypsum and sulphur inoculated with *Thiobacillus* and rhizobial inoculation. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 37, n. 2, p. 1-9, 2003.
- SUMMERFIELD, R.J.; PATE, J.S.; ROBERTS, E.H.; WIEN, H.C. The physiology cowpea. In: SINGH, S.R.; RACHIE, K.O. (Eds.). **Cowpea research, production and utilization.** Chichester: John Wiley, 1975, p.66-101.
- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 214-220, 2001.
- TEIXEIRA, S.M.; MAY, P.H.; SANTANA, A.C. de. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: ARAUJO, J.P.P. de; WATT, E.E. (Org.). **O caupi no Brasil.** Brasília : IITA/Embrapa, 1988. p. 99-136.
- TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factores relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. **Plant Disease**, v. 75, p. 347-353, 1991.
- URIBE, L., Formacion de nodulos de Rhizobium: Factores que pueden conferir ventaja competitiva. **Agronomia Costarricense**, v. 18, n. 1, p. 121-131, 1994.
- VAN BERKUM, P.; EARDLY, B.D. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. In: Spaink, H. P.; Kondorosi, A.; Hooykaas, P. J. J. **The Rhizobiaceae:**

- Molecular Biology of Plant-associated Bacteria**, Editado por: Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p. 1-24.
- VAN BERKUM, P.; EARDLY, B.D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1132-1136, 2002.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; KLIRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability, and productivity. **Nature**, v. 396, p. 69-72, 1998.
- WRIGHT, S.F., UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science**, v. 161, p. 575-586, 1996.
- WRIGHT, S.F.; ANDERSON, R.L. Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the Central Great Planus. **Biology and Fertility of Soil**, v. 31, n. 249-253, 2000.
- YOUNG J.P.W. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 186, p. 45-52, 1996.

**CAPITULO 1 – CO-INOCULAÇÃO *BACILLUS*, *BREVIBACILLUS* E/OU
PAENIBACILLUS NA SIMBIOSE *BRADYRHIZOBIUM*-CAUPI: ESTUDO DO
SINERGISMO**

**CO-INOCULAÇÃO *BACILLUS*, *BREVIBACILLUS* E/OU *PAENIBACILLUS* NA
SIMBIOSE *BRADYRHIZOBIUM*-CAUPI: ESTUDO DO SINERGISMO ⁽¹⁾**

**André Suêlto Tavares de Lima⁽²⁾, Maria do Carmo Silva Barreto⁽³⁾, Janete Magali
Araújo⁽⁴⁾, Lucy Seldin⁽⁵⁾, Hélio Almeida Burity⁽⁶⁾, Márcia do Vale Barreto
Figueiredo⁽⁷⁾**

RESUMO

O feijão caupi *Vigna unguiculata* [L.] Walp. é a principal cultura de subsistência do semi-árido brasileiro, sendo uma fonte de proteínas de baixo custo, notadamente, para as populações carentes. A produção desta cultura no Nordeste é baixa devido a não utilização de insumos agrícolas dentre eles, o fertilizante nitrogenado. Por outro lado, bactérias promotoras de crescimento em plantas vêm sendo estudadas, de forma a maximizar a fixação de N₂, disponibilizar nutrientes como P ou fitohormônios e inibir doenças. Os objetivos deste trabalho foram verificar a viabilidade da co-infecção das sementes de caupi pela co-inoculação *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e/ou *Bacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi; caracterizar as estirpes quanto à produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato, assim como avaliar o sinergismo entre os microrganismos como alternativa para otimizar a FBN. Os experimentos foram conduzidos em laboratório e em casa de vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), utilizando o caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv. “IPA – 206”. As estirpes de *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* utilizadas foram: *Bacillus* sp. – ANBE 31, 449, 450, 451 e 461, *B. cereus* – 440, *B. subtilis* – 438, 441, 454, 455 e 459, *B. pumilus* – 444, 445 e 448, *B. megaterium* – 462 e *Brevibacillus brevis* – 447, *Paenibacillus brasilensis* – 24, 172 e 177, *P. graminis* – MC 04.21, MC 22.13 e BR 60106, *P. polymyxa* – S21 e *P. durus* – RBN4. O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso com 24 estirpes e/ou isolados de BPCPs co-inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e um tratamento controle, com 3 repetições. Os microrganismos não apresentaram capacidade para produzir AIA e nem solubilizar fosfato. Foi verificado sinergismo entre as

⁽¹⁾ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

⁽²⁾ Mestrando do PPGCS da Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP: 52171-900, andresueldo@ig.com.br.

⁽³⁾ Bolsista do IPA.

⁽⁴⁾ Professora do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

⁽⁵⁾ Professora do Departamento de Microbiologia Geral da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

⁽⁶⁾ Pesquisador do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA/EMBRAPA).

⁽⁷⁾ Pesquisadora do IPA/CARHP e Professora do PPGCS.

estirpes de *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* co-inoculadas com *Bradyrhizobium* no caupi. *Paenibacillus brasilensis* (24), foi superior em relação as demais estirpes proporcionando uma melhor performance simbiótica. A co-inoculação *Bradyrhizobium* e *Bacillus pumilus* – 444 inibiu a eficiência simbiótica do caupi.

Termos de indexação: promoção crescimento, solubilização de fosfato, *Vigna unguiculata* [L.] Walp., AIA, nodulação.

CO-INOCULATION OF *BACILLUS*, *BREVIBACILLUS* AND / OR *PAENIBACILLUS* IN THE *BRADYRHIZOBIUM*-COWPEA SYMBIOSIS: STUDY OF THE SYNERGISM

SUMMARY

The cowpea *Vigna unguiculata* [L.] Walp. is the main livelihood culture of the semi-arid and a low-cost protein source, especially for the poor population. The production of this crop in the Northeast is low due to the non use of agricultural inputs, among them, the nitrogen. Bacteria enhancing plants growth are being studied in order to maximize the fixation of N₂, provide nutrients such as P or phytohormones and inhibit diseases. The objectives of this study were to verify the viability of co-infection of cowpea seeds by co-inoculation *Paenibacillus*, *Brevibacillus* and / or *Bacillus* in the *Bradyrhizobium*-cowpea symbiosis; characterize the strains on the production of indol acetic acid (IAA) and phosphate solubilization as well as to evaluate the synergism among microorganisms as an alternative to optimize the BNF. The experiments were conducted in laboratory and in the greenhouse of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), using the cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cv. "IPA - 206." The strains of *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* used were: *Bacillus* sp. - ANBE 31, 449, 450, 451 and 461, *B. cereus* - 440, *B. subtilis* - 438, 441, 454, 455 and 459, *B. pumilus* - 444, 445 and 448, *B. megaterium* - 462 and *Brevibacillus brevis* - 447, *Paenibacillus brasilensis* - 24, 172 and 177, *P. graminis* - 04.21 MC, MC 22:13 and 60,106 BR, *P. polymyxa* - S21 and *P. durus* - RBN4. The experimental design used was of randomized blocks with 24 strains and / or isolated from BPCPs co-inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and a control, with 3 replicates. The microorganisms present neither capacity to produce IAA and nor solubilize phosphate. Synergism was observed between the strains of *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* co-inoculated with *Bradyrhizobium* in cowpea. *Paenibacillus brasilensis* (24) was higher than the other strains on providing better

symbiotic performance. Co-inoculation *Bradyrhizobium* sp. and *Bacillus pumilus* - 444 inhibited the symbiotic efficiency of cowpea.

Index terms: growth promotion, phosphate solubilization, *Vigna unguiculata* [L.] Walp., IAA, nodulation.

INTRODUÇÃO

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) tem grande importância nutricional, social, econômica e estratégica, com boas perspectivas no agronegócio brasileiro. Além disso, o caupi tem a capacidade de interagir com bactérias fixadoras de N₂, que podem contribuir para aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção (Soares, 2006). As tendências atuais do setor agrícola estão centradas na redução do uso de pesticidas químicos e fertilizantes inorgânicos, obrigando a busca de alternativas que reduzam o custo dos insumos e melhorem a qualidade ambiental (Haggag, 2002; Rodríguez et al., 2006).

A utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas – BPCPs, visando melhoria da produção agrícola, será provavelmente uma das ferramentas mais importante para a atualidade no mundo. Isso se deve à demanda emergente para a diminuição da dependência de fertilizantes químicos e a necessidade de desenvolvimento da agricultura sustentável (Moreira & Siqueira, 2006). Pesquisas vem sendo desenvolvidas no intuito de se conhecer cada vez mais as potencialidades das BPCPs. Rodríguez-Díaz e colaboradores (2004), em estudo realizado na Antártica encontraram três novas espécies de *Paenibacillus* (*P. cineris*, *P. cookii* e *P. wynnii*), fixadores de nitrogênio atmosférico. Seldin (2008) relata que, dentre as 89 espécies e 2 subespécies de *Paenibacillus* descritas na literatura, 14 possuem estirpes com a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, são elas: *P. polymyxa*, *P. macerans*, *P. peoriae*, *P. graminis*, *P. odorifer*, *P. brasiliensis*, *P. durus*, *P. borealis*, *P. wynnii*, *P. massiliensis*, *P. sabinae*, *P. zanthoxyli*, *P. donghaensis* e *P. forsythiae*.

Bactérias em habitats naturais colonizam o interior e exterior de órgãos de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento (Mariano et al. 2004). As BPCPs estimulam diretamente a fixação de nitrogênio (Han et al., 2005), podem ser capazes de solubilizar nutrientes (Rodriguez & Fraga, 1999), produzir hormônios de crescimento através da presença de 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase (Correa et al., 2004); ácido indol acético (AIA) (Cattelan, 1999) e indiretamente por antagonismo a fungos patogênicos a produção de sideróforos, quitinase, β-1,3-glucanase, antibióticos, pigmentos fluorescentes, e cianetos (Renwick et al., 1991). A produção de AIA, um regulador de

crescimento vegetal que aparentemente não funciona como hormônio em células bacterianas, pode ter evoluído devido a sua importância na relação bactéria-planta. Este regulador, quando secretado por bactérias em baixas concentrações, pode promover o crescimento da raiz diretamente pela estimulação da alongação da célula ou divisão celular (Sobral, 2003).

Outro elemento de extrema importância é o fósforo, e apesar de ser abundante nos solos na forma orgânica e inorgânica é o nutriente mais limitante do crescimento vegetal. Isso se deve a formação de compostos insolúveis com alumínio e ferro, bem como matéria orgânica, em solos ácidos. Bactérias podem hidrolisar o fósforo para formas inorgânicas por meio de processos enzimáticos (fosfatases). Além disso, algumas bactérias apresentam capacidade de solubilizar P inorgânico, dissolvendo o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou pela diminuição do pH, podendo ser disponibilizado a planta (Cerigioli, 2005).

A co-inoculação de rizóbio com outras bactérias promotoras de crescimento vegetal tem mostrado potencial para aumentar o crescimento vegetal, a nodulação e fixação de nitrogênio em várias leguminosas. A dupla inoculação com *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp. ou *Paenibacillus* e estirpes de rizóbio apresentaram um efeito sinérgico na nodulação, crescimento das plantas, rendimento e captação de N nas culturas da soja, trevo, amendoim e feijão (Burns et al., 1981; Raverker & Konde, 1988; Burdman et al., 1997; Figueiredo et al., 2008a). Da mesma forma, a co-inoculação *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium* spp. foi relatada para melhorar a nodulação e fixação de nitrogênio, biomassa vegetal e produção de grãos em várias espécies de leguminosas como alfafa (Bolton et al., 1990), soja (Dashti et al., 1998), feijão-mungo-verde (Sindhu et al., 1999) e grão de bico (Goel et al., 2002). A co-inoculação com *Bacillus* spp. e *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* spp. pode melhorar a nodulação e crescimento de plantas de feijão e soja, respectivamente (Srinivasan et al., 1997; Camacho et al., 2001; Bai et al., 2003).

Os mecanismos utilizados pelas rizobactérias para promover nodulação e fixação de nitrogênio são, na sua maioria desconhecidos ou permanecem ambíguos. Maior desenvolvimento radicular, absorção induzida de nutrientes pela BPCP e seus metabólitos (revisto pelo Lugtenberg et al., 2002; Persello-Cartieaux et al., 2003, Lacava et al., 2008), pode contribuir indiretamente para nodulação e fixação de nitrogênio (Vessey & Buss, 2002). Thilak et al. (2006) mostrou que a presença de *Pseudomonas putida* co-inoculada com rizóbio aumenta a ocupação de nódulos na cultura do guandu. Provas para um maior efeito direto sobre nodulação foram descrito por Silva et al. (2007) e Figueiredo et al. (2008a).

Os objetivos deste trabalho foram verificar a viabilidade da co-infecção das sementes de caupi pela co-inoculação *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e/ou *Bacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi; caracterizar as estirpes quanto à produção de ácido indol acético e solubilização de fosfato, assim como avaliar o sinergismo entre os microrganismos como alternativa para otimizar a FBN.

MATERIAL E MÉTODOS

Para os experimentos de laboratório (caracterização das estirpes quanto à produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato) e casa de vegetação (viabilidade da co-inoculação com BPCPs na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi) foram utilizadas as estirpes de *Bacillus* e *Brevibacillus*, cedidas pela Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos – UFPEDA: *Bacillus* sp. – ANBE 31, 449, 450, 451 e 461, *B. cereus* – 440, *B. subtilis* – 438, 441, 454, 455 e 459, *B. pumilus* – 444, 445 e 448, *B. megaterium* – 462 e *Brevibacillus brevis* – 447, todas isoladas do mosto de fermentação da cana-de-açúcar (oriundo de usinas da Zona da Mata de Pernambuco) com exceção da ANBE 31 que foi isolada na filosfera da leguminosa *Atriplex nummularia* L.. As estirpes de *Paenibacillus* utilizadas foram cedidas pelo Instituto de Microbiologia da UFRJ: *Paenibacillus brasiliensis* – 24, 172 e 177, *P. graminis* – MC 04.21, MC 22.13 e BR 60106, isoladas da rizosfera de milho (*Zea mays* L.) de um solo do Cerrado, *P. polymyxa* – S21, isolada no solo de Seropédica - RJ e *P. durus* – RBN4, isolada em raízes de bananeira (*Musa* spp.)

As estirpes de *Bacillus* e *Brevibacillus* foram crescidas em meio Nutrient broth (NB) e as de *Paenibacillus* em meio Trypticase soy broth (TSB) a temperatura de 32 °C. A avaliação das bactérias quanto à produção do AIA e solubilização de fosfato foi de acordo com metodologias descritas por Cattelan (1999).

Para avaliação do AIA, as bactérias foram repicadas para placa contendo 1/10 TSA (*Paenibacillus*) ou NA (*Bacillus* e *Brevibacillus*) enriquecido com 5 mM de L-triptofano (1,021 g L⁻¹). Foram testadas quatro estirpes por placa em três repetições. Após a transferência, cobriu-se o meio com uma membrana de nitrocelulose de ≈ 9 cm e incubou-se a 28 – 30 °C por 24h. Após este período as membranas foram removidas para outra placa e saturadas com a solução de Salkowski (Gordon & Weber, 1951) e incubadas a temperatura ambiente. As estirpes que formaram halo avermelhado na membrana, no período entre 30 min e 2 h, foram consideradas produtores de AIA. Para o controle positivo, na produção do AIA, foi utilizado a estirpe *Pantoea agglomerans* (601).

Para solubilização de fosfatos foi utilizado o meio 1/10 TSA ou NA de acordo com a bactéria, acrescido de CaHPO_4 resultante da reação de 50 mL da solução de K_2HPO_4 0,57 M e de 100 mL da solução de CaCl_2 0,90 M adicionados a 850 mL de 1/10 TSA. As soluções e o meio foram autoclavados separadamente. O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH 1N, estéril. Foi transferida uma estirpe por placa sendo esta incubada posteriormente a 28 – 30 °C, por sete dias. As colônias que formaram halo claro ao seu redor foram consideradas solubilizadoras de fosfatos. Para o controle positivo, na solubilização de fosfato, foi utilizada a estirpe *Pseudomonas* sp. (234).

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia do Solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, em delineamento experimental inteiramente casualizado com 25 tratamentos (estirpes e/ou isolados de BPCPs) com 3 blocos.

Para o experimento de viabilidade da co-inoculação com *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi utilizou-se a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) cedida pela CNPAB – Seropédica – Km 47 – RJ, recomendada pela RELARE. As estirpes de *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* utilizadas estão descritas acima.

A estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) foi crescida em duplicata em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio líquido (YM - manitol extrato de levedura, Vincent, 1970) a 250 rpm e 28 °C durante 5 dias. As estirpes de *Bacillus* e *Brevibacillus* foram crescidas em meio Nutrient broth e as de *Paenibacillus* em meio Trypticase soy broth por 24 - 48 horas (250 rpm; 32 °C). A concentração de bactérias utilizada foi de 10^7 UFC mL⁻¹ para *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* e de 10^8 UFC mL⁻¹ para *Bradyrhizobium*.

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação do IPA e a cultivar de caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) utilizada foi a “IPA – 206”. As sementes foram desinfestadas segundo metodologia de Vincent, 1970. Para cultivo das plantas foram utilizados vasos Leonard contendo areia + vermiculita (pH 6,8) na proporção 2:1 autoclavado por 1 hora, à temperatura de 120 °C, a 101kPa. Cada semente foi inoculada com 1 mL do meio contendo *Bradyrhizobium* e 1 mL do meio contendo *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus*. Uma semana após semeadura, foi efetuado o desbaste deixando duas plantas por vaso.

A irrigação foi efetuada por capilaridade utilizando a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada conforme Silveira et al. (1998). A colheita foi realizada aos 40 dias após plantio (DAP) e foram avaliados: altura de plantas, comprimento da raiz, matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e dos nódulos (MSN), relação MSPA/MSR, número e tamanho de nódulos, nitrogênio acumulado na MSPA pelo método de Kjeldahl segundo Bremner (1965), eficiência da fixação de N_2 (EFN₂) e nodulação específica.

O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso com 25 tratamentos (estirpes e/ou isolados de BPCPs co-inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e um tratamento controle inoculado apenas com *Bradyrhizobium* sp.) com 3 blocos. Os dados foram submetidos a análise de variância, utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7.5 beta (Silva, 2008), com níveis de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as bactérias cresceram nos meios estudados e de acordo com a análise das reações, foi observado que nenhuma das estirpes testadas apresentaram capacidade em produzir ácido indol acético (AIA) ou solubilizar fosfato. Estes resultados corroboram com os achados de Hameeda et al. (2006), que testando *Bacillus* (*B. licheniformis* (EB 13 e CDB 47) e *B. circulans* (EB 35) também não encontraram bactérias positivas para ambos os testes. Sobral (2003), estudando BPCPs endofíticas e epifíticas na cultura da soja, relatou que os grupos bacterianos mais freqüentes, apresentando estas duas características, foram *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*. Mendonça (1995), avaliando algumas das estirpes de *Bacillus* e *Brevibacillus* estudadas neste trabalho encontrou resultados positivos quanto à produção de proteases, evidenciando assim que outros testes não avaliados neste experimento podem demonstrar outras qualidades de interesse benéficas à planta como produção de quitinase, citocininas, giberelina, dentre outros metabólicos.

A maioria das pesquisas com BPCPs utiliza grande número de isolados em seleções preliminares, principalmente porque menos de 1% das rizobactérias são capazes de promover crescimento em plantas (Chen et al., 1996).

No experimento de viabilidade da co-inoculação com *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi, não foram encontradas diferenças significativas na altura das plantas (Tabela 1), entretanto a co-inoculação do *Bradyrhizobium* sp. (BR3267) com as estirpes de *Paenibacillus brasilensis* (172), *P. polymyxa* (S21) *P. durus* (RBN4) e *Bacillus* sp. (451) obtiveram médias superiores ao tratamento controle (inoculado apenas com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) estes dados corroboram com os encontrados por Figueiredo et al. (2008b) e Pereira (2008). As plantas atingiram uma altura máxima de 184,50 cm, valor este bem superior ao descrito por Silva (2003), em estudo semelhante de co-inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001) com BPCPs. Neste trabalho a maior média apresentada foi de 156,70 cm aos 45 dias de plantio. Este dado indica que a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267), tem maior eficiência simbiótica com a cultura do

caupi. O tratamento com a estirpe *B. pumilus* – 448 (122,6 cm) reduziu em 42,6% a altura das plantas.

Com relação ao comprimento da raiz (CR) (Tabela 1), não houve diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os tratamentos. Duas hipóteses podem ser lançadas para explicar este resultado. A primeira é que a unidade experimental (vaso) é limitada, afetando CR em profundidade e a segunda seria devido a não produção de AIA pelas estirpes co-inoculadas, já que este hormônio atua principalmente no crescimento radicular.

Quando o tratamento foi co-inoculado com *Paenibacillus brasilensis* (24), *P. brasilensis* (177), *P. durus* (RBN4) e *B. megaterium* (462) as plantas apresentaram maiores médias de MSPA em relação ao controle *Bradyrhizobium* sp. (9,55 g) (Tabela 1). Esse incremento sugere maior efeito sinérgico destas bactérias junto à estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) nas plantas de caupi. Entretanto, o mesmo não ocorreu com o tratamento co-inoculado com *B. pumilus* – 444 (5,56 g), evidenciando que o uso dessa bactéria inibiu a eficiência simbiótica. Mantovanello & Mello (1994), utilizando rizobactérias do gênero *Pseudomonas* obtiveram aumentos de matéria seca da parte aérea (138,5%) e raízes (119%) de plântulas de tomateiro, em solo autoclavado.

Em relação à matéria seca da parte aérea/raiz (MSPA/MSR) e número de nódulos (Tabela 1), não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Entretanto podem-se observar um aumento superior a 23% dos tratamentos co-inoculados com *Bacillus subtilis* (455) na relação MSPA/MSR e *Brevibacillus brevis* (447) no número de nódulos em relação ao controle *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267).

Para a matéria seca dos nódulos (MSN) nas plantas de caupi (Tabela 1), os tratamentos co-inoculados com *Paenibacillus brasilensis* (24), *P. graminis* (MC 22.13) e *Bacillus subtilis* (438), superou em quase 22% o tratamento inoculado apenas com *Bradyrhizobium* sp., corroborando com o resultado encontrado por Araújo & Hungria (1999) e Miranda (2001). Zhang e colaboradores (1996) observaram que algumas BPCPs podem diminuir a MSN, como ocorreu com o tratamento co-inoculado com *Bacillus* sp. (449), evidenciando assim que algumas BPCPs podem proporcionar competição na colonização das raízes da planta hospedeira em busca dos sítios de infecção, restringindo o acesso para o rizóbio.

Em relação ao tamanho do nódulo (Tabela 2) os resultados revelaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos co-inoculados com *Bacillus* sp. - 449 (2,57) e *B. subtilis* – 441 (9,20). Silveira et al. (2001), mostram que efeitos ambientais nos nódulos, após sua formação, podem também levar à redução no tamanho e número de nódulos como ocorreu

com tratamentos co-inoculados com *Bacillus* sp. (449) e *Bacillus cereus* (440) respectivamente.

Segundo Dobereiner (1966) há correlação positiva entre a massa nodular e a quantidade de N acumulado em leguminosas, e essa correlação positiva foi encontrada por Wadisirisuk & Weaver (1985) em feijão-caupi. Isso sugere que plantas com maior número de nódulos fixam mais N, embora, de acordo com Hansen et al. (1983), essa correlação não seja linear e, portanto, é necessário não só muitos nódulos, mas nódulos grandes, com maior eficiência relativa.

Na Tabela 2 pode-se observar que o teor de nitrogênio nas plantas de caupi inoculadas apenas com *Bradyrhizobium* sp. e co-inoculadas com *Bacillus*, *Brevibacillus* e/ou *Paenibacillus* não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Estes dados corroboram com os achados de Silva (2003). Segundo Silva et al. (2007) existem limitações dependentes de BPCPs para fixação do N_2 . Trabalhos conduzidos por Zhang et al. (1996) relatam que a inoculação com *Pseudomonas putida* em soja aumentou em até 25% estes teores de nitrogênio em plantas.

Em relação ao nitrogênio acumulado na MSPA do caupi (Tabela 2), a co-inoculação *Bradyrhizobium* – BR 3267 e *Paenibacillus brasilensis* (24) apresentou a maior média (423,40 mg N vaso⁻¹), superando em até 11,5% o tratamento inoculado apenas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (379,66 mg N vaso⁻¹) e em mais de 75% para o tratamento co-inoculado com *Bacillus pumilus* – 444 (241,98 mg N vaso⁻¹).

No que se refere à eficiência da fixação do N_2 (EFN₂) (Tabela 2) a co-inoculação *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. – 449 (818,24 mg N g MSN⁻¹) superaram em mais de 100% o tratamento inoculado apenas com *Bradyrhizobium* sp. – BR 3267 (403,39 mg N g MSN⁻¹).

Quanto à nodulação específica (NE) (Tabela 2) não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, entretanto o tratamento inoculado apenas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) quando comparado ao co-inoculado com *Bacillus cereus* (440) diminuiu 95,30% a nodulação específica enquanto o *B. subtilis* (455) aumentou em 35% a média desta variável.

A co-inoculação *Bradyrhizobium* sp. + *Bacillus* sp. (449), apresentou menores médias de biomassa e tamanho do nódulo, entretanto foi o tratamento com melhor eficiência na fixação de N_2 (Tabela 2) indicando assim a importância da eficiência relativa, descrita por Xavier (2007). O número, a biomassa e o tamanho dos nódulos (Tabela 1 e 2) são indicadores usuais de nodulação (Ferreira & Castro, 1995), e constituem critérios frequentemente utilizados para avaliação da simbiose rizóbios-leguminosas, fazendo parte, inclusive, do

protocolo para avaliação da eficiência agrônômica de estirpes no Brasil pela RELARE (Rede de Laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola) (Xavier et al., 2006).

Como exemplos dos efeitos de BPCPs na produção podemos citar aumento de até 37% na produção e nodulação do amendoim com a inoculação de *Bacillus subtilis* (Turner & Backman, 1991). Li & Alexander (1988) conseguiram incrementar a colonização e a nodulação de soja, através da co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com bactérias do gênero *Bacillus* spp., produtoras de antibióticos. Outros relatos demonstram efeitos positivos na nodulação pela co-inoculação de rizóbio com diversas espécies de bactérias (Stamford et al., 2003; Silva et al., 2007; Figueiredo et al., 2008a; 2008b). Essa contribuição foi relacionada com a produção de fitohormônios, pectinase ou sinais moleculares por *Bacillus cereus* (Halverson & Handelsman, 1991) e outras espécies de microrganismos (Dakora, 2003).

Segundo Catellan (1999) existe um sinergismo entre bactérias promotoras de crescimento em plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas, corroborando assim com os resultados apresentados neste trabalho, observando-se efeito positivo da co-inoculação *Bradyrhizobium* sp. vs BPCPs na MSPA, MSN, Nac, EFN₂ e tamanho de nódulo em relação ao controle. Sindhu et al. (2002) estudando a interação entre microrganismos relatam que *Bacillus* sp. co-inoculado com *Bradyrhizobium* sp. melhora a nodulação e o crescimento das plantas de grama verde (*Vigna radiate* [L.] Wilzeck.). A simbiose entre *Bradyrhizobium* e caupi, juntamente com as RPCP (Loutit (L) e LBF-410, estimula a nodulação e pode promover melhor eficiência na fixação do N₂ (Silva, 2007).

Gomes et al. (2003) testando inoculação de *Bacillus pumillus* e *B. thuringiensis* subvar, kenya em mudas de alface, observaram incremento na matéria fresca da parte aérea e raiz por estas bactérias. E em estudo *in vitro*, não encontrou nenhuma bactéria capaz de produzir AIA ou solubilizar fosfato, sugerindo que esses mecanismos não foram responsáveis pela promoção de crescimento nas plantas.

Estudos desenvolvidos por Cardoso (1999), mostram que para um microrganismo ser denominado de BPCP só precisa ter atuação positiva no desenvolvimento e produção vegetal, que pode ser resultado de vários mecanismos fisiológicos, tais como produção de hormônios. Segundo Min-Ryu et al. (2005) e Araújo (2008), o modo de ação e a própria ocorrência do benefício de BPCPs variam com a espécie de planta e/ou bactéria. Por isso, se fazem necessários estudos para o reconhecimento de mecanismos de ação das bactérias promotoras

de crescimento em plantas, os quais definirão a melhor utilização dos isolados para cada interação planta-bactéria.

CONCLUSÕES

1. As estirpes de *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e *Bacillus* nas condições testadas não apresentaram capacidade para produzir ácido indol acético (AIA) e nem solubilizar fosfato.
2. Ocorreu sinergismo entre as estirpes de *Bacillus* e *Paenibacillus* co-inoculados com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) no caupi.
3. A estirpe de *Paenibacillus brasilensis* (24) foi superior em relação às demais estirpes avaliadas na produção de nitrogênio acumulado na matéria seca da parte aérea do caupi proporcionando uma melhor performance simbiótica.
4. A co-inoculação das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus* (440) inibiu a nodulação específica no caupi.
5. A co-inoculação das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. e *B. pumilus* (444) inibiu a promoção do crescimento no caupi.

LITERATURA CITADA

- ARAÚJO, F.F. & HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. Pesq. Agropec. Bras., 34:1633-1643, 1999.
- ARAÚJO, F.F. Rizobactérias e indução de resistência a doenças em plantas. Parte II – Microrganismos Promotores de Crescimento em Plantas. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P. & SANTOS, C.E.R. e S. Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura. 1.ed. Guaíba, Agrolivros. 2008. p.197-210.
- BAI, Y.; ZHOU, X. & SMITH, D. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. Crop Sci., 43:1174–1781, 2003.
- BOLTON, H.; ELLIOTT, L.F.; TURCO, R.F. & KENNEDY, A.C. Rhizoplane colonization of pea seedlings by *Rhizobium leguminosarum* and a deleterious root colonizing *Pseudomonas* sp. and effects on plant growth. Plant Soil, 123:121–124, 1990.
- BREMNER, J.M., Total nitrogen. In: Black, C.A. (Ed.), Methods of soil analysis chemical and microbiological properties, Part 2. American Society of Agronomy, Madison, pp. 1149–1178, 1965.
- BURDMAN, S.; KIGEL, J. & OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Biol. Bioch., 29:923–929, 1997.
- BURNS, T.A.; BISHOP, P.E. & ISRAEL, D.W. Enhanced nodulation of leguminous plant roots by mixed cultures of *Azotobacter vinelandii* and damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. Appt. Env. Microbiol., 62:865–871, 1981.

- CAMACHO, M.; SANTAMARIA, C.; TEMPRANO, F.; RODRIGUEZ- NAVARRO, D. N. & DAZA, A. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. *Can. J. Microbiol.*, 47:1058–1062, 2001.
- CATTELAN, A.J. Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. 1.ed. Londrina, Embrapa Soja. 1999. 36p.
- CARDOSO, E.J.B.N. Curso de especialização em manejo do solo. 3º Módulo: Biologia e poluição do solo/recuperação de solos degradados e/ou contaminados. Piracicaba: São Paulo. 1999. 51p.
- CERIGIOLI, M.M. Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. São Carlos. Universidade Federal de São Carlos, 2005. 132p. (Tese de Doutorado).
- CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L. & KLOEPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R.S.; GUPTA, V.K. Management of soil born diseases. 1.ed. Ludhiana, Kalyani, 1996. p.165-184.
- CORREA J.D.; BARRIOS M.L. & GALDONA, R.P. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant Soil*, 266:75–84, 2004.
- DAKORA, F.D. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytol.*, 158:39–49, 2003.
- DASHTI, N.; ZHANG, F.; HYNES, R. & SMITH, D.L. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. *Plant Soil*, 200:205–213, 1998.
- DOBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. *Nature*, 210:850–852, 1966.
- FERREIRA, E.M. & CASTRO, I.V. Nodulation and growth of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in soils previously treated with sewage sludge. *Soil Biol. and Biochem.*, 27:1177–1183, 1995.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; MARTINEZ, C.R. & CHANWAY, C.P. Alleviation of water stress effects in common bean (*Phaseolus vulgaris* L. by co-inoculation *Paenibacillus* x *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.*, 40:182–188, 2008a.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; MARTINEZ, C.R.; BURITY, H.A. & CHANWAY, C.P. Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *W. J. Microbiol. Biotech.*, 24:1187-1193, 2008b.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; MARTINEZ, C.R. & CHANWAY, C.P. Drought stress response on some key enzyme of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) nodule metabolism. *W. J. Microbiol. Biotech.*, 23:187-193, 2007.
- GOEL, A.K.; SINDHU, S.S. & DADARWAL, K.R. Stimulation of nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Pseudomonas* spp. antagonistic to fungal pathogens. *Biol. Fert. Soils*, 36:391–396, 2002.
- GOMES, A.M.A.; MARIANO R.L.R.; SILVEIRA, E.B. & MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. *Hortic. Bras.*, 21: 699–703, 2003.
- GORDON, S.A. & WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.*, 26:192-195, 1951.
- HAGGAG, W.M. Sustainable agriculture management of plant diseases. *J. Biol. Sci.*, 2:280–284, 2002.
- HALVERSON, L.J. & HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. *Appt. Envir. Microbiol.*, 57:2767-2770, 1991.

- HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y. & SONG, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. *Syst Appt. Microbiol.*, 28:66–76, 2005.
- HANSEN, A.P.; YONEYAMA, T.; KOUCHI, H. & MARTIN, P. Respiration and nitrogen fixation of hydroponically cultured *Phaseolus vulgaris* L. cv OAC Rico and supernodulant mutant I. Growth, mineral composition and effect of sink removal. *Planta*, 189:538–545, 1983.
- HAMEEDA, B.; RUPELA, O. P.; GOPAL REDDY. & SATYAVANI, K. Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Biol. Fert. Soils*, 43:221–227, 2006.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. ed. University of California, Berkeley, 1950. 32p.
- LACAIVA, P.T.; ANDREOTE, F.D. & AZEVEDO, J.L. Metabólicos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. Parte II – Microrganismos Promotores de Crescimento em Plantas. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P. & SANTOS, C.E. de R. e S. Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura. 1.ed. Guaíba, Agrolivros. 2008. p 211–232.
- LI, D. & ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant and Soil*, 108:211–219, 1988.
- LUGTENBERG, B.J.J.; CHIN-A-WOENG, T.F.C. & BLOEMBERG, G.V. Microbe-plant interactions: Principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 81:373–383, 2002.
- MANTOVANELLO, C.M. & MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Summ. Phytop.*, 20:123–126, 1994.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.P. & DONATO, V.M.T.S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. In: Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, 2004. p.89–111.
- MENDONÇA, A.L.L. *Bacillus* spp. Produtores de proteases: isolamento, caracterização e melhoramento de *B. cereus* (C124) Frankland & Frankland. Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1995. 95p. (Dissertação de Mestrado).
- MIN-RYU, C.; HUI-HU, C.; LOCY, R.D. & KLOPPER, J.W. Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and soil*, 268:285–292, 2005.
- MIRANDA, R.C.M. Isolamento, seleção e caracterização de bactérias halotolerantes com atividade antimicrobiana. Recife. Universidade Federal de Pernambuco, 2001. 74p. (Dissertação de Mestrado).
- MOREIRA F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras, UFLA, 2006. 729p.
- PEREIRA, J.; MIRIAN, L.; AURELIANO, E.; RODRIGUES, J. LEITE, J.; CARVALHO, F.; SANTOS, M. & DA PAZ, C. Interação de *Rhizobium* com bacterias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) na Cultura de Feijao Caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL 11., 2008. Anais. Fortaleza. CD-ROM.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L. & ROBAGLIA, C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment*, 26:189–199, 2003.

- RAVERKER, K.P. & KONDE, B.K. Effect of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. *Plant Soil*, 106:249–252, 1988.
- RENWICK A.R.; CAMPBELL, R. & COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Physiol.*, 40:524–532, 1991.
- RODRIGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.*, 17:319–339, 1999.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T. & BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287:15–21, 2006.
- RODRÍGUEZ-DÍAZ, M; LOGAN, N.A. & RODELAS, B. *Paenibacillus cineris*, *P. cookii* y *P. wynnii*, três novas espécies fijadoras de nitrógeno atmosférico originarias de la Antártida. Nuevos Confines de la Fijación Biológica de Nitrógeno. In: REUNIÓN NACIONAL DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO, 10., Granada, 2004. Anais. Granada., 2004. p.15–18.
- SELDIN, L. *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio. Parte II – Microrganismos Promotores de Crescimento em Plantas. IN: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P. & SANTOS, C.E. de R. e S. Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura. 1.ed. Guaíba, Agrolivros, 2008. 259–276 p.
- SILVA, L.E.S.F. Fixação do N₂ no caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) pela interação *Bradyrhizobium* sp. x *Glomus clarum*. sob condições de estresse hídrico. Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2003. 100p. (Dissertação de Mestrado).
- SILVA, V.N. SILVA, L.E.S.F.; MARTÍNEZ, C.R.; SELDIN, L.; BURITY, H.A. & FIGUEIREDO, M.V.B. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi. *Acta Sci. Agron.*, 29:331–338, 2007.
- SILVA, F.A.S. Assistat - Assistência Estatística. Disponível em: <<http://www.assistat.com/indexp.html#down>> Acesso em: 29 jun. 2008.
- SILVEIRA, J.A.G.; CONTADO, J.L.; MAZZA, J.L.M. & OLIVEIRA, J.T.A. de. Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. *Rev. Bras. Fisiol. Veget.*, 10:9–23, 1998.
- SILVEIRA, J.A.G.; COSTA, R.C.L. & OLIVEIRA, J.T.A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. *Braz. J. Microbiol.*, 32:187–194, 2001.
- SINDHU, S.S., GUPTA, S.K. & DADARWAL, K.R. Antagonistic effect of *Pseudomonas* spp. on pathogenic fungi and enhancement of plant growth in green gram (*Vigna radiata*). *Biol. Fertil. Soils.*, 29:62–68, 1999.
- SINDHU, S.S.; GUPTA, S.K.; SUNEJA, S. & DADARWAL, K.R. Enhancement of green gram nodulation and growth by *Bacillus* species. *Biol. Plant. Prague.*, 45:117–120, 2002.
- SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B. & MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG), 1 – caupi. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.*, 30:795–802, 2006.
- SOBRAL, J.K. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003. 137p. (Tese de Doutorado).
- SRINIVASAN, M., PETERSEN, D.J. & HOLL, F.B. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.*, 42:1006–1014, 1997.

- STAMFORD, N.P.; FREITAS, A.D.S.; FERRAZ, D.S.; MONTENEGRO, A. & SANTOS, C.E.R.S. Nitrogenfixation and growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) in a sodic soil as affected by gypsum and sulphur inoculated with *Thiobacillus* and rhizobial inoculation. *Trop. Grasslands*, 37:1–9, 2003.
- THILAK, K.V.B.R.; RANGANAYAKI, N. & MANOHARACHARI, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Europ. J. Soil Sci.*, 57:67–71, 2006.
- TURNER, J. T.; BACKMAN, P. A. Factores relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. *Plant Disease*, v.75, p.347-353, 1991.
- VESSEY, K. & BUSS, T.J. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes – Controlled-environment studies. *Can. J. Plant Sci.*, 82:282–290, 2002.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule-bacteria. 1.ed. Oxford, Blackwells Scientific Publications, 1970. 164p.
- WADISIRISUK, P. & WEAVER, R.W. Importance of bacteroid number in nodules and effective nodule mass to dinitrogen fixation by cowpeas. *Plant and Soil*, 87:223–231, 1985.
- XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; RIBEIRO, J.R. de A. & RUMJANEK, N.G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Caatinga*, 19:25–33, 2006.
- XAVIER, T.F.; ARAUJO, A.S.F.; SANTOS, V.B. & CAMPO, F.L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. *Cienc. Rur.*, 37:561–564, 2007.
- ZHANG, F.; DASHTI, N.; HYNES, R.K. & SMITH, D.L. Plant growth-promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Ann. Bot. Comp.*, 77:453-460, 1996.

Tabela 1 – Altura da planta (AP), comprimento da raiz (CR), matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e nódulo (MSN) e relação MSPA/MSR e número de nódulos (N° nód.) de plantas de caupi co-inoculadas com *Bacillus*, *Brevibacillus* e/ou *Paenibacillus* vs. *Bradyrhizobium* sp.

Tratamentos*	AP (cm)	CR (cm)	MSPA (g vaso ⁻¹)	MSR (g vaso ⁻¹)	MSN (g vaso ⁻¹)	MSPA/ MSR	N°nód. (vaso ⁻¹)
BR 3267	174,00 a	23,00 a	9,55 a	1,25 a	1,02 ab	7,90 a	206 a
BR 3267 + ANBE 31	159,00 a	19,66 a	9,53 a	1,29 a	1,08 ab	8,49 a	188 a
BR 3267 + 24	161,00 a	18,00 a	10,73 a	1,45 a	1,23 a	7,42 a	226 a
BR 3267 + 172	177,00 a	18,00 a	8,30 ab	1,30 a	1,10 ab	6,35 a	195 a
BR 3267 + 177	142,00 a	17,83 a	9,80 a	1,33 a	1,05 ab	7,44 a	131 a
BR 3267 + MC 04.21	173,33 a	15,66 a	7,39 ab	1,07 a	1,10 ab	6,92 a	176 a
BR 3267 + MC 22.13	148,33 a	18,50 a	7,97 ab	1,21 a	1,23 a	6,54 a	246 a
BR 3267 + BR 60106	170,00 a	17,50 a	9,14 ab	1,33 a	0,75 ab	6,90 a	242 a
BR 3267 + S21	175,66 a	20,00 a	8,22 ab	1,09 a	1,04 ab	7,73 a	171 a
BR 3267 + RBN4	184,50 a	20,16 a	10,00 a	1,15 a	0,86 ab	9,10 a	178 a
BR 3267 + 438	152,00 a	16,50 a	9,29 ab	1,62 a	1,24 a	6,43 a	176 a
BR 3267 + 440	145,33 a	20,83 a	7,85 ab	1,18 a	0,63 ab	7,00 a	97 a
BR 3267 + 441	157,50 a	19,33 a	8,99 ab	0,98 a	1,12 ab	9,36 a	139 a
BR 3267 + 444	127,00 a	19,83 a	5,56 b	0,74 a	0,59 ab	7,71 a	159 a
BR 3267 + 445	152,66 a	19,66 a	7,71 ab	1,14 a	0,92 ab	6,83 a	185 a
BR 3267 + 447	167,33 a	20,00 a	8,08 ab	1,34 a	0,81 ab	6,39 a	255 a
BR 3267 + 448	122,66 a	16,00 a	8,53 ab	1,17 a	1,08 ab	8,12 a	182 a
BR 3267 + 449	147,50 a	17,00 a	7,12 ab	1,19 a	0,44 b	6,11 a	178 a
BR 3267 + 450	157,00 a	17,83 a	8,28 ab	1,30 a	1,08 ab	6,26 a	193 a
BR 3267 + 451	176,00 a	17,16 a	8,79 ab	1,29 a	0,92 ab	6,83 a	160 a
BR 3267 + 454	156,00 a	17,66 a	9,23 ab	1,30 a	1,14 ab	7,39 a	185 a
BR 3267 + 455	136,00 a	16,16 a	7,46 ab	0,85 a	1,04 ab	9,91 a	199 a
BR 3267 + 459	144,00 a	18,66 a	8,83 ab	1,26 a	1,02 ab	7,17 a	145 a
BR 3267 + 461	167,66 a	16,50 a	7,92 ab	1,10 a	1,05 ab	7,39 a	143 a
BR 3267 + 462	171,66 a	21,50 a	9,61 a	1,30 a	1,10 ab	7,36 a	205 a
CV (%)	18,04	16,22	13,89	27,54	22,88	25,71	17,71

Na coluna, médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Bradyrhizobium* sp. (BR 3267), *Bacillus* sp. (ANBE 31, 449, 450, 451 e 461), *B. cereus* (440), *B. subtilis* (438, 441, 454, 455 e 459), *B. pumilus* (444, 445 e 448), *B. megaterium* (462); *Brevibacillus brevis* (447); *Paenibacillus brasiliensis* (24, 172 e 177), *P. graminis* (MC 04.21, MC 22.13 e BR 60106), *P. polymyxa* (S21) e *P. durus* (RBN4).

Tabela 2 – Tamanho de nódulo (T nód), teor de nitrogênio na matéria seca da parte aérea (Teor N), nitrogênio acumulado na MSPA (N_{ac}), eficiência da fixação de N₂ (EFN₂) e nodulação específica (NE) de plantas de caupi co-inoculadas com *Bacillus*, *Brevibacillus* e/ou *Paenibacillus* vs *Bradyrhizobium* sp.

Tratamentos*	T nód. (g nódulo ⁻¹)	Teor N (mg g ⁻¹ vaso ⁻¹)	N _{ac} (mg N vaso ⁻¹)	EFN ₂ (mg N g MSN ⁻¹)	NE (n° nod g MSR ⁻¹)
BR 3267	5,10 ab	39,74 a	379,66 ab	403,39 b	168,41 a
BR 3267 + ANBE 31	5,60 ab	38,65 a	385,09 ab	415,73 b	157,35 a
BR 3267 + 24	5,60 ab	39,43 a	423,40 a	343,19 b	155,22 a
BR 3267 + 172	5,77 ab	37,17 a	311,83 ab	280,98 b	153,25 a
BR 3267 + 177	8,53 ab	33,67 a	331,82 ab	315,66 b	96,49 a
BR 3267 + MC 04.21	6,23 ab	39,51 a	294,08 ab	266,44 b	167,35 a
BR 3267 + MC 22.13	5,13 ab	37,49 a	300,61 ab	246,89 b	202,39 a
BR 3267 + BR 60106	3,63 ab	36,86 a	332,78 ab	460,00 ab	180,29 a
BR 3267 + S21	6,03 ab	40,44 a	333,47 ab	329,88 b	163,18 a
BR 3267 + RBN4	6,60 ab	37,57 a	376,68 ab	454,66 ab	175,09 a
BR 3267 + 438	7,00 ab	41,07 a	382,27 ab	323,51 b	122,43 a
BR 3267 + 440	6,33 ab	38,26 a	299,10 ab	519,20 ab	86,23 a
BR 3267 + 441	9,20 a	39,51 a	354,04 ab	318,41 b	142,59 a
BR 3267 + 444	4,73 ab	43,16 a	241,98 b	409,96 b	222,91 a
BR 3267 + 445	5,10 ab	42,31 a	326,13 ab	321,97 b	161,29 a
BR 3267 + 447	3,43 ab	39,97 a	322,77 ab	403,55 b	201,41 a
BR 3267 + 448	6,10 ab	38,89 a	333,48 ab	303,89 b	189,82 a
BR 3267 + 449	2,57 b	39,12 a	278,59 ab	818,24 a	144,95 a
BR 3267 + 450	5,90 ab	40,29 a	333,63 ab	310,73 b	148,13 a
BR 3267 + 451	5,90 ab	37,41 a	331,41 ab	370,93 b	128,91 a
BR 3267 + 454	6,73 ab	39,20 a	362,00 ab	318,93 b	157,26 a
BR 3267 + 455	6,30 ab	39,04 a	291,30 ab	279,92 b	227,52 a
BR 3267 + 459	7,10 ab	36,94 a	326,94 ab	319,86 b	120,37 a
BR 3267 + 461	7,53 ab	40,29 a	317,03 ab	308,68 b	133,58 a
BR 3267 + 462	5,57 ab	39,04 a	375,17 ab	340,62 b	158,88 a
CV (%)	34,29	8,09	15,15	32,11	44,80

Na coluna, médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Bradyrhizobium* sp. (BR 3267), *Bacillus* sp. (ANBE 31, 449, 450, 451 e 461), *B. cereus* (440), *B. subtilis* (438, 441, 454, 455 e 459), *B. pumilus* (444, 445 e 448), *B. megaterium* (462); *Brevibacillus brevis* (447); *Paenibacillus brasilensis* (24, 172 e 177), *P. graminis* (MC 04.21, MC 22.13 e BR 60106), *P. polymyxa* (S21) e *P. durus* (RBN4).

**CAPITULO 2 – RESPONSE OF THE TRIPLE INOCULATION OF
BRADYRHIZOBIUM X GLOMUS X PAENIBACILLUS IN THE SYMBIOTIC
EFFICIENCY AND COWPEA DEVELOPMENT**

**RESPONSE OF THE TRIPLE INOCULATION OF *BRADYRHIZOBIUM* x *GLOMUS*
x *PAENIBACILLUS* IN THE SYMBIOTIC EFFICIENCY AND COWPEA
DEVELOPMENT⁽¹⁾**

**André Suêlto Tavares de Lima⁽²⁾, Terezinha Ferreira Xavier⁽³⁾, José de Paula
Oliveira⁽⁴⁾ Hélio Almeida Burity⁽⁵⁾, Adália Cavalcanti do Espírito Santo
Mergulhão⁽⁶⁾, Márcia do Vale Barreto Figueiredo⁽⁷⁾**

ABSTRACT

The use of microorganisms with the aim of improving the availability of nutrients for plants is a practice of great importance and necessary for agriculture. Among the biological systems involving plants and microorganisms, rhizobia-legume symbioses present with more economical expression, and the arbuscula mycorrhizal fungi-legume (AMF). In this context, the soil microbiology and its related areas take strategic role in the construction of alternative models of agricultural production requiring development of technologies and processes to increase sustainable crop production. This study aimed to evaluate the response of the triple inoculation (*Glomus Bradyrhizobium* x *Paenibacillus*) in promoting the cowpea growth, as well as maximizing the biological nitrogen fixation (BNF). The experiment was conducted in a greenhouse of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), using the cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cv."IPA 206". The treatments were the following: strains of *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267 and EI – 6) inoculated singly; inoculation in mixture with the strains (BR 3267 + EI - 6); absolute control (TA) and nitrogen (TN), combined with the presence and absence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF - *Glomus etunicatum*) and plants growth-promoting bacteria (PGPB - *Paenibacillus brasilensis*-24) in a 5x2x2 factorial. Contrasts were performed to study the treatment of variables. The results showed that inoculation with *Bradyrhizobium* sp. (BR3267 and EI 6) x *Glomus etunicatum* favored the nitrogen acquisition and phosphorus availability to the cowpea plant and inoculation with *Paenibacillus brasilensis* (24), increased the process of infection by *Bradyrhizobium* sp. and

⁽¹⁾ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

⁽²⁾ Mestrando do PPGCS da UFRPE, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP: 52171-900, andresueldo@ig.com.br.

⁽³⁾ Mestranda do PPGCS.

⁽⁴⁾ Pesquisador do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

⁽⁵⁾ Pesquisador do IPA.

⁽⁶⁾ Pesquisadora do IPA.

⁽⁷⁾ Pesquisadora do IPA/CARHP e Professora do PPGCS.

Glomus etunicatum, and increased the promotion of cowpea growth. It is important to report that the nitrogen from symbiosis was sufficient to supply the needs of the plants.

Keywords: Symbiosis, *Vigna unguiculata* [L.] Walp., AMF, PGPB, co-inoculation, rhizobia.

INTRODUCTION

The cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) is a very rustic culture adapted to the Northeast region of Brazil, food source rich in nutrients, planted mainly by small and medium farmers, who sell their surplus production to generate family income (Rumjanek et al., 2006). However, the low productivity of this culture is linked to the low technological level used in its production, especially the low water availability, seeds with low genetics quality and low use of inputs such as fertilizers and rhizobian inoculants (Costa, 1989).

The use of microorganisms with the aim of improving nutrients availability for plants is a great important practice and very necessary for agriculture (Freitas et al., 2007). Nowadays there is an emerging demand to decrease the dependence on chemical fertilizers and search for sustainable agriculture (Moreira and Siqueira, 2006). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), plant growth promoting bacteria (PGPB) and the association of rhizobia with leguminous plants are mutualistic symbioses of great economic importance for increasing agricultural production.

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligatory biotrophic, only multiplying in metabolically active roots, which makes that their large-scale use in agriculture is limited by the lack of commercially accepted inoculant and an official standard for their quality control (Monteiro, 1990). Their hyphae can be compared to roots extensions of the host plant, because they absorb water and nutrients supplied to the plant through arbuscules, ramifications formed by the hyphae internal to the host's cells (Cardoso and Hoffmann, 2001).

Phosphorus is the most important nutrient obtained, due to its scarcity and low mobility in soil (Barea et al., 1992 and Silveira, 1992). Also according to Barea et al. (1992), the process of nitrogen biological fixation (BNF) is highly demanding in ATP energy, in such way that the adequate P supply offered by the AMF benefits the nodules formation. Concerning the nitrogen, it is one of the most limiting nutrients for agricultural production in tropical regions of Brazil. Therefore, the BNF has great economic and environmental importance for crop production (Zilli et al., 2006). The rhizobia, when in symbiotic association with leguminous plants, convert atmospheric N₂ to NH₃, which is incorporated in

various forms of organic N to be used by the plant (Freire, 1992 and Moreira and Siqueira, 2006). Thus, this combination may represent an alternative to chemical nitrogen fertilizers, with the advantage of being more economically viable and does not pollute the environment (Santos, et al. 2008). Santos et al., 2005 report that the plant growth promoting bacteria (PGPB), colonize different organs of plants and exert beneficial effects on them. These bacteria act indirectly by suppression of diseases and directly by production or modification of the phytohormones concentration, nitrogen fixation, solubilization of minerals phosphate or other nutrients from soil, S oxidation, increasing the roots permeability, and production of siderophores (Cattelan, 1999 and Mariano and Kloepper, 2000). Thus, the phosphate solubilizing bacteria can act as "mycorrhiza helper bacteria", improving the establishment of mycorrhizal fungi (Toro et al., 1997 and Lima et al., 2007).

The objective of this study was to evaluate the response of the triple inoculation (*Glomus* x *Bradyrhizobium* x *Paenibacillus*) in promoting the cowpea growth, as well as maximizing the biological nitrogen fixation (BNF).

MATERIAL AND METHODS

The soil used for conducting the experiment was classified as Yellow Argisol (Embrapa, 1999) being from the Experimental Station of the Agronomic Institute of Itapirema Pernambuco – IPA, located in the BR 101 Norte, km 53, latitude 07°34'00", longitude 35°00'00" and 14m height.

The soil was collected in the surface layer (0-20cm), after drying in air it was sieved (2.0 mm diameter mesh sieve) and homogenized. Samples were separated for determination of chemical characteristics, fertility and soil physics (Embrapa, 1997) (Tables 1 and 2) as well as the native population of rhizobia (Hungria and Araújo, 1994) and the number of native spores of *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann (Gerdemann and Nicolson, 1963) were also evaluated, presenting $1.5 \cdot 10^3$ UFC.mL⁻¹ and 9 spores. 50 g of soil⁻¹, respectively. The leguminous used was the cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv. "IPA - 206" from the seed laboratory of the IPA. The seeds were disinfected by immersion in alcohol 70% for 30 seconds, which acts as a surfactant, altering the surface tension, in 2% sodium hypochlorite for 1 minute and then rinsed with sterile distilled water for 7 times (Vincent, 1970).

The strains of *Bradyrhizobium* sp. used were BR 3267 (recommended by RELARE, from the CNPAB (National Center for Research in Agrobiolgy (km 47 - Seropédica - RJ) and EI - 6 from the IPA - Laboratory of Soil Biology, and mixture of strains (BR 3267 + EI - 6) grown separately. The bacteria were purified in YMA medium (agar, mannitol and yeast

extract) using the congo red indicator (Vincent, 1970). Afterwards, the strain was replated in duplicate for 250 mL Erlenmeyer flasks with YM medium (mannitol - extract of yeast), using a rotator shaker at 28 °C during 3 to 6 days according to the bacteria growth. The strain of *Paenibacillus brasilensis* (24 - isolated from maize's rhizosphere from Cerrado's soil) used was provided by the Institute of Microbiology, UFRJ being replated in duplicate for 250 mL Erlenmeyer flasks with TSB medium (Trypticase soy Broth), using a rotator shaker at 28 °C for 24 hours. The spores of *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann were multiplied in pots containing vermiculite + ground (in 1:1 proportion), autoclaved for 1 hour at 120 °C and 101 kPa, with intervals of 24 hours for 3 consecutive days, using the panic as host plant (*Panicum miliaceum*). The experiment was conducted in a greenhouse at the IPA, in 8 kg pots being used 6 kg soil. pot⁻¹. A total of 7 seeds.pot⁻¹ were used in the planting. At the sowing, each seed was inoculated with 2 mL of the YM medium containing 10⁸ CFU mL⁻¹ for each strain of *Rhizobium* and 2 mL of the TSB medium containing 10⁷ CFU mL⁻¹ for the PGPR and 1.0 mL seed⁻¹ of each liquid culture of strains of *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267 and EI - 6) providing the mixture (Bangel et al., 2001). In the inoculation with *G. etunicatum*, 120 spores.pot⁻¹ were used.

After the thinning at the 7 days, 2 plants per pot were kept and the application of nutrient solution of Hoagland and Arnon (1950) without N and P were weekly performed using 2 mL kg soil⁻¹. In the nitrogen treatment, ammonium sulfate was used in the concentration of 20 kg ha⁻¹ distributed in 3 applications: 10, 20 and 30 days after germination. The pots were irrigated with distilled water until obtaining the pot capacity. The harvest was performed 40 days after sowing.

The following variables were evaluated: plant height at 10, 20, 30 and 40 days after sowing, root length (RL), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM) and nodule dry matter (NDM), SDM/RDM ratio, nitrogen content by the Kjeldahl method according to Bremner (1965), nitrogen accumulation (Nac) in the SDM, specific nodulation, N₂ efficiency (N₂FE), phosphorus content in the SDM by the vanadate colorimetric method according to Malavolta et al. (1989), leghemoglobin content (LHb) measured by spectrophotometer (540nm) according to Wilson and Reisenauer (1963), number of spores by the method of Gerdemann and Nicolson (1963) and easily extractable glomalin (EEG) according to the method of Wright and Upadhyay (1996).

The experimental design with randomized blocks and treatments in 5x2x2 factorial present the following levels in the first factor: inoculation with the strains *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267), and *Bradyrhizobium* sp. (EI - 6) inoculated separately and in combination (BR

3267 + EI - 6), absolute and nitrogen controls (TA and TN), without inoculation and without nitrogen (TA) and without inoculation and with mineral nitrogen (TN). The second and third factor comprises a combination of absence and presence of AMF - *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann and PGPB - *Paenibacillus brasilensis* (24), a total of 20 treatments (Table 3) with 3 replications, totaling 60 pots.

The data were submitted to the analysis of variance, for each variable were performed contrasts, using the statistical program SANEST (Zonta et al., 1984), with levels of significance of 5% by F test, and the means were compared using the Tukey test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Statistical analysis by the F test revealed significance for the isolated effects of the 1st factor (strains of *Bradyrhizobium* sp. BR 3267, EI - 6 inoculated separately and in combination (BR 3267 + EI - 6), TA and TN, the 2nd factor (presence and absence of inoculation with *G. etunicatum*) and 3rd factor (presence and absence of inoculation with *P. brasilensis* (24)). Only the shoot dry matter (SDM) of cowpea showed interaction between factors 1 and 2.

Treatments inoculated with *Bradyrhizobium* sp. (strains BR 3267 and EI - 6; combination (BR 3267 + EI - 6), control without inoculation and without nitrogen (TA) and control without inoculation and with nitrogen (TN), showed significant differences ($p < 0.05$) by Tukey test for variables SDM and accumulation nitrogen (N ac) in cowpea plants and glomalin easily extractable in soil (Table 3). The results showed that inoculation of cowpea with strains of *Bradyrhizobium* sp. either applied separately or in mixture, provided a SDM similar to the control nitrogen (TN).

The treatment in mixture (BR 3267 + EI - 6), provided an increase on the N ac when compared to the absolute control (TA). The inoculation with the strain of *Bradyrhizobium* sp. EI - 6 did not favor the production of glomalin obtaining lower mean (0.4595 mg glomalin g⁻¹ aggregates 1-2 mm).

The inoculation of cowpea plants with *G. etunicatum* provided higher mean for SDM treatments inoculated only with rhizobia EI - 6 and/or in mixture (BR 3267 + EI - 6). These results corroborate with those found by Jesus et al. (2005) that testing the co-inoculation Rhizobia x AMF in *Piptadenia gonoacantha* obtained significant differences. The absolute control was also aided by the presence of the fungus (Table 4). Results cited in the paper report that the treatments inoculated with *G. etunicatum* did not differ significantly ($p < 0.05$), however the inoculation with AMF favored the increase on SDM on cowpea plants.

Results cited in the literature report that the dual inoculation of AMF x rhizobia provide significantly the increase on SDM, nitrogen and phosphorus content in the SDM, as well as favored the root length, nodulation, root colonization by AMF and improvement in height and diameter of plants' growth (Della-Cruz et al., 1988 and Manjunath et al., 1984 and Marques et al., 1997 and Herrera et al., 1993).

The effect of mycorrhizal association and the symbiosis with *Bradyrhizobium* sp. can be autocatalytic and synergistic, since the processes contribute to increase the photosynthetic rate of the microsymbiont, reducing the risk of photosynthates drain, led by microsymbionts that can cause reduction in crop productivity (Mergulhão et al., 2001). According Burity et al. (2000) and Moreira and Siqueira (2006), dual inoculation is capable of reducing the costs of nitrogenous and phosphate fertilizers, and give the plants greater ability to absorb nutrients, leading to increase in productivity.

The inoculation of *G. etunicatum* favored the cowpea growth, with differences being significant ($p < 0.05$) by the Tukey test for the variables: shoot dry matter (SDM) and root (RDM), SDM/RDM ratio, nitrogen accumulation (Nac) N_2 efficiency (N_2FE) in cowpea plants and number of spores in soil (Table 5). The plant height over time (10, 20, 30 and 40 days), root length and glomalin did not differ significantly ($p < 0.05$) for treatments inoculated with and without *G. etunicatum*.

Probably, this fact was due to the cowpea crop has not completed its cycle, since the sporulation of AMF occurs more at the end of the plant cycle (Moltocaró, 2007). Bever et al. (1996) mention that the host plant can be one of the main factors regulating the composition and structure of the AMF communities, as each phase of development, and spores germination, hyphae growth, root colonization and sporulation are influenced by the roots of plants. The SDM and the SDM/RDM ratio were higher for the treatment inoculated with *G. etunicatum*. This result is in agreement with Tilke et al. (1991) which state that the presence of AMF increases SDM.

The treatments with the presence and absence of *G. etunicatum* not differ on NDM and LHb. Mergulhão et al. (2001) tested *G. etunicatum* x *Rhizobium* co-inoculation in sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) plants in a sandy soil, also found no significant differences ($p < 0.05$) in the NDM. The Nac and N_2FE were higher when inoculated with *G. etunicatum*. Plants when inoculated usually have higher metabolism than the non mycorrhizal being able to provide greater amount of carbohydrates to the rhizobia consequently presenting more efficient nodulation. Thus, the results show that inoculation with *G. etunicatum*, despite not having made a significant difference for NDM and LHb, increased nitrogen accumulation in

the SDM and improved the N₂ efficiency in cowpea plants, suggesting effect of the AMF in the N acquisition by rhizobia and consequently greater symbiotic efficiency.

The inoculation with *G. etunicatum* increased the number of spores in the soil and in the phosphorus content of the SDM, however the latter variable showed no significant difference ($p < 0.05$) by Tukey test. Decrease or increase in phosphorus concentrations is reported by different researchers, according to gender, variety and plant cultivar. Thus, Bhivare and Nimbalkar (1984) observed increases in P concentrations in the shoots of the bean cv. Vaghia. Joshi (1984) reported reduction of this element in pigeonpea var. C-11, while Flores-Aylas (2003) observed no significant difference ($p < 0.05$) in the aroeira (*Schinus terebinthifolius*) and trema (*Trema micrantha*) cultivations. The results of this study corroborate with those found by Moltocaró (2007) which evaluating the pea culture inoculated with the same fungus, observed no significant difference in phosphorus concentrations in the SDM. According to the author, probably the AMF natives from soil were as efficient as the *G. etunicatum* inoculated in using the P soil available to plant. Brundrett (1991) describes that fungi form complex communities in the roots of plants in the field.

Thus, experiments involving soils with diversity of AMF in a single host will probably reflect better those processes that naturally occur (Sturmer, 2004). Interspecific competition has been measured as a function of sporulation differentiated by these fungi (Daft, 1983 and Daft and Hogarth, 1983) and the formation of entry points into roots being colonized (Wilson, 1984). Despite these interactions, a combination of fungal isolates (native + tested) has been shown to provide a greater benefit in growth than when only a single fungus colonizes the roots of the plant (Daft, 1983), thus, this study is closer to field reality.

The co-inoculation with *Paenibacillus brasilensis* (24) favored the cowpea development (Table 6). Significant difference was observed ($p < 0.05$) by Tukey test for the variables plant height at 10, 20, 30 and 40 days; SDM; RDM and NDM, ratio SDM/RDM ratio, Nac and N content in cowpea plants.

The plant height over time (10, 20, 30 and 40 days) was higher for the treatments inoculated with *P. brasilensis* (24). Sivaramaiah et al. (2007) studying the inoculation with different strains of *Bacillus* sp. in chickpea noted that these bacteria provide stimulatory effect on shoots' growth at 10 days of observation if compared to the control. The fact that a strain isolated from maize's rhizosphere from a Cerrado' soil has promoted growth in cowpea plants suggests the non-specificity, as reported by Quadt-Hallmann and Kloepper (1996) and Santos et al. (2005), who described that original isolates from a host can easily colonize other hosts

of different species, even with greater intensity. Thus, the authors report that when the endophytic bacterium *Enterobacter asburiae*, isolated from cotton JM22, was inoculated on bean and cucumber, and the endophytic bacteria isolated ENF1 from bean was inoculated on plants of helicon, respectively, larger populations were detected when compared to their original host. Similarly, Shish and Chanway (1998) observed that growth promotion in silver firs (*Abies* sp.), resulting from the application of bacteria from the same ecosystem was low and being not therefore necessary to combine other isolates such as *Pseudomonas* with the fir ecotypes (*Abies* sp.) and soil types, for an effective promotion of seedlings growth, thus confirming the non-specificity, as found in this work.

However, some authors emphasize the need for isolated homologous or adapted to the host, justifying a greater colonization capacity, lower risk of introducing exogenous organisms (Khalid et al., 2004) and specificity between the host and isolated PGPR (Enebak et al., 1998).

The root length (RL) showed no difference between treatments co-inoculated with or without *P. brasilensis* (24). This should probably have happened because the experimental unit (pot) was limited, affecting the RL. However the co-inoculated treatment provided greater RDM mean, assuming that the roots grew laterally. The co-inoculation with *P. brasilensis* (24) favored the biomasses of SDM, NDM and RDM in cowpea plants. The Nac was higher for the treatment co-inoculated with *P. brasilensis* (24). The N₂FE, LHb and phosphorus content, showed no significant difference ($p < 0.05$) provided by the co-inoculation of *P. brasilensis* (24), although presenting the highest means. According to Triplett (1990), the co-inoculation of rhizobia with other bacteria such as *Bacillus*, *Azospirillum* and *Agrobacterium* can promote symbiosis with legumes in many ways, being highlighted the influence in increasing competitiveness of the rhizobia inoculated.

The inoculation of *P. brasilensis* (24) showed no significant difference ($p < 0.05$), concerning the number of spores in soil and glomalin. According Treseder et al. (2004), the external hyphae, spores and colonized roots are responsible for the glomalin synthesis. This glicoconjugated is positively related to the extraradicular mycelium production.

CONCLUSIONS

- The nitrogen from symbiosis was sufficient to supply the needs of cowpea plants;
- The N accumulated in cowpea plants inoculated with mixture of strains of *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267 + EI 6) was higher in relation to the inoculation performed separately with the strain BR 3267.

- The dual inoculation *Bradyrhizobium* sp. and *Glomus etunicatum* provided greater increase of nitrogen in cowpea plants.
- The inoculation with *G. etunicatum* increased in shoot dry matter of cowpea plants being higher than the treatments inoculated only with AMF native from soil.
- The inoculation with *Paenibacillus brasiliensis* (24) promoted higher growth to cowpea plants.

REFERENCES

- Bangel, E.V., Meyer, J.V., Silva, C.M., 2001. Coleção de culturas de rizóbio Semia (FEPAGRO – MIRCEN). In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 28; 2001, Londrina; Anais... Londrina: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 68pp.
- Barea J.M., Azcon R., Azcon-Aguilar C., 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen fixing systems. In: Norris, J.R.; Read, D.J.; Varma, A.K. (Eds.). Methods in microbiology: Techniques for the study of Mycorrhizae. London: Academic Press, 24, 391–416pp.
- Bever, J.K., Morton, J.B.; Antonovics, J., Schultz, P.A., 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *J. Ecol.* 84, 71–82.
- Bhivare, V.N., Nimbalkar, J.D., 1984. Salt effects on growth and mineral nutrition of french beans. *Plant and Soil* 80, 91–98.
- Bremner, J.M., 1965. Total nitrogen. In: Black, C.A. (Ed.), Methods of Soil Analysis Chemical and Microbiological Properties, Part 2. American Society of Agronomy, Madison, pp. 1149–1178.
- Brundrett, M.C., 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Adv. Ecol. Res.* 21, 171–213.
- Burity, H.A., Lyra, M.C.C.P., Souza, E.S., Mergulhão, A.C.E.S., Silva, M.L.R.B., 2000. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. *Pesq. Agropec. Bras.* 35, 801–807.
- Cattelan, A.J., 1999. Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Embrapa Soja, Londrina, 36pp.
- Costa, R.C.L., Lopes, N.F., Oliva, M.A., Barros, N.F., 1989. Crescimento e conversão de energia solar em feijão submetido a três doses de nitrogênio e dois regimes hídricos. *Pesq. Agropec. Bras.* 24, 1439–1450.
- Daft, M.J., 1983. The influence of mixed inocula on endomycorrhizal development. *Plant Soil* 71, 331–337.
- Daft, M.J., Hogarth, B.G., 1983. Competitive interactions amongst four species of *Glomus* on maize and onion. *Trans. British Mycol. Soc.* 80, 339–345.
- Dela-Cruz, R.E., Manalo, M.Q., Aggangan, N.S., Tambalo, J.D., 1988. Growth of three legumes trees inoculation with VA mycorrhizal fungi and *Rhizobium*. *Plant and Soil* 108, 111–115.
- Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. Manual de Métodos de Análises do Solo, v. 1. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos, Rio de Janeiro. 212pp.

- Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1999. Sistema brasileiro de classificação de solos, v. 1. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos, Rio de Janeiro. 412pp.
- Enebak, S.A., Wei, G., Klopffer, J.W., 1998. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Forest Sc.* 44, 141–143.
- Flores-Aylas, W.W., Saggin-Junior, O.J., Siqueira, J.O., Davide, A.C., 2003. Efeito de *Glomus etunicatum* e fósforo no crescimento inicial de espécies arbóreas em semeadura direta. *Pesq. Agropec. Bras.* 38, 257–266.
- Freire, J.R.J., 1992. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M., Neves, M.C.P. *Microbiologia do solo*. SBCS, Campinas, PP. 281–296.
- Freitas, A.D.S., Vieira, C.L., Santos, C.E.R.S., Stamford, N.P., Lyra, M.C.C.P., 2007. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino no Estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia* 66, 497–504.
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transact. Brit. Mycol. Soc.* 46, 235–244.
- Herrera, M.A., Salamanca, C. P., Barea, J., 1993. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular Mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean Ecosystems. *Appt. Env. Microbiol.* 59, 129–133.
- Hoffmann, L.V., Cardoso, E.J.B.N., 2001. Inibição da colonização por *Bradyrhizobium elkanii* mas não por *Glomus intraradices* em soja pelo ativador de defesa vegetal BTH. *Scient. Agric.* 58, 795–799.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water culture method of growing plants without soil. University of Califórnia, Berkeley, 32pp.
- Hungria, M., Araújo, R.S., 1994. Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola. EMBRAPA, Brasília, 542pp.
- Jesus, E.C., Schiavo, J.A., Faria, S.M., 2005. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. *Rev. Árv.* 29, 545–552.
- Joshi, S.S., 1984. Effect of salinity stress on organic and mineral constituents in the leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) var. C-11. *Plant and Soil* 82, 69–76.
- Lima, A.S.T., Xavier, T.F., Figueiredo, M.V.B., Freire, M.B.G.S., 2007. Solubilização de fosfatos in vitro por rizóbios In: VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife. Anais da VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão.
- Malavolta, E., Vitti, G.C.B., Oliveira, S.A., 1989. Avaliação do estado nutricional das plantas. Princípios e Aplicação. POTAFOS, Piracicaba, pp135-189.
- Manjunath, A., Bragayaraj, D.J., Gopala-Gowada, H.S., 1984. Dual inoculation with V.A. mycorrhiza and *Rhizobium* is beneficial to *Leucaena*. *Plant and soil* 78, 445–448.
- Marques M.S., Gonçalves, L.M.B., Lemos-Filho, J.P., Rocha, D., Vale, M.T., Scotti, M.R., 1997. Growth of a leguminous tree (*Centropogon tomentosum* Guill ex Benth) inoculated with *Rhizobium* and mycorrhizal fungi. *Rev Arg Microbiol.* 29, 98–102.
- Mariano, R.L.R., Kloepper, J.W., 2000. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. *Rev. An. Patol. Plant.* 8, 121–137.
- Mergulhão, A.C.E.S., Silva, M.L.R.B., Burity, H.A., Stamford, N.P., 2001. Influência da dupla inoculação rizóbio e fungos micorrizas-arbusculares em plantas de sabiá sob solos de diferentes texturas. *Rev. Ecosist.* 26, 42–47.
- Moltocar, R.C.R., 2007. Guandu e micorriza no aproveitamento do fosfato natural pelo arroz em condições de casa-de-vegetação. Campinas. Instituto Agrônomo, 49p. (Dissertação Mestrado).
- Monteiro, E.M.S., 1990. Resposta de leguminosas arbóreas à inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos em solo ácido. Itaguaí, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 221p. (Tese Doutorado).

- Moreira F.M.S., Siqueira, J.O., 2006. Microbiologia e bioquímica do solo. UFPA, Belém, 729pp.
- Quadt-Hallmann, A., Klopffer, J.W., 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Can. J. Microbiol.* 42, 1144–1154.
- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A., 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria improving growth and yield of wheat. *J. Appt. Microbiol.* 96, 473–480.
- Rumjanek, N.G., Xavier, G.R., Martins, L.M.V., Morgado, L.B., Neves, M.C.P., 2006. Feijão caupi tem uma nova estirpe de rizóbio, BR3267, recomendada como inoculante. *EMBRAPA Agrobiologia. Seropédica*, 16pp.
- Santos, C.E.R.S., Freitas, A.D.S., Vieira, I.M.M.B., Colaço, W., 2008. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. Parte I – fixação biológica N₂. In: Figueiredo, M.V.B., Burity, H.A., Stamford, N.P., Santos, C.E.R.S. *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura*. Guaíba. Agrolivros, 568pp.
- Santos, M.H.L.C., Mariano, R.L.R., Camara, T.R., Andrade, A.G., Willadino, L., Lima, G.P.P.L., 2005. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. *Hoehnea* 32, 1-8.
- Silveira, A.P.D., 1992. Micorrizas. In: Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. *Microbiologia do solo*. SBCS. Campinas, 257-282pp.
- Sivaramaiah, N., Malik, D.K., Sindhu, S.S., 2007. Improvement in symbiotic efficiency of chickpea (*Cicer arietinum*) by coinoculation of *Bacillus* strains with *Mesorhizobium* sp. *Cicer*. *Ind. J. Microbiol.* 47, 51–56.
- Shishido, M., Chanway, C.P., 1999. Spruce growth response specificity after treatment with plant growth promoting *Pseudomonas*. *Can. J. Botany.* 77, 22–31.
- Stürmer, S.L., 2004. Efeito de diferentes isolados fúngicos da mesma comunidade micorrízica no crescimento e absorção de fósforo em soja e trevo vermelho. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 28, 611–622.
- Toro, M., Azcón, R., Barea, J. M., 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (P32) and nutrient cycling. *Appt. Env. Microbiol.* 63, 4408–4412.
- Treseder, K.K., Mack, M.C., Cross, A., 2004. Relationships among fires, fungi and soil dynamics in Alaskan boreal forests. *Ecol. Applic.* 14, 1826–1838.
- Triplett, E.W., 1990. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. Saint Paul, v.3, 199–206pp.
- Tylka, G.L., Hussey, R.S., Roncadori, R.W., 1991. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, phosphorus, and *Heterodera glycines* on soybean. *J. Nematol.* 23, 122–133.
- Vincent, J.M., 1970. A manual for the practical study of root-nodule-bacteria. Blackwells Scientific Publications. Oxford, 164pp.
- Wilson, D.O., Reisenauer, H.M., 1963. Determination of leghemoglobin in legume nodules. *Analyt. Bioch.* 6, 27–30.
- Wilson, J.M., 1984. Competition for infection between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 97, 427–435.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A., 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.* 161, 575–586.
- Zilli, J.É., Valicheski, R.R., Rumjanek, N.G., Araújo, J.L.S., Freire Filho, F.R., Neves, M.C.P., 2006. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. *Pesq. Agropec. Bras.* 41, 811-818.

Zonta, E.P., Machado, A.A., Silveira Júnior, P., 1984. Sistema de análise estatística para microcomputadores. Departamento de Matemática e Estatística. Pelotas, 151pp.

Table 1 – Chemical characteristics of the Yellow Argisol soil.

pH (water)	P mg dm ⁻³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Na ⁺	K ⁺	Al ⁺³	H ⁺	S	CTC	V	m
		cmolc dm ⁻³								%	
6,00	10,0	1,10	0,65	0,0	0,05	0,0	1,56	1,80	3,4	54	0

Table 2 – Physical characteristics of the Yellow Argisol soil concerning granulometry, class textural, bulk density (Db), particle density (Dp), total porosity (Pt), field capacity (CF) and the permanent wilting point (PWP).

Concerning granulometry (%)			Class	Db	Dp	Pt	CF	PWP
Sand	Silt	Clay	textural	(g cm ⁻³)			(%)	
87,0	1,0	12,0	Sand loam	1,32	2,65	50,2	5,5	3,5

Table 3 – Shoot dry matter (SDM), nitrogen accumulation (N ac.) in cowpea plants and easily extractable glomalin (EEG) from soil in treatments with strains of *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 and EI – 6 inoculated separately and in combination (BR 3267 + EI - 6), control without inoculation and without nitrogen (TA) and control without inoculation and with nitrogen (TN).

Treatment	SDM (g pots ⁻¹)	N ac. (mg N pots ⁻¹)	EEG (mg g ⁻¹ aggregate 1-2 mm)
TN	7,80 a	234,53 a	0,64 a
BR 3267 + EI – 6	7,73 a	227,49 ab	0,51 ab
BR 3267	7,72 a	202,78 bc	0,48 ab
EI – 6	7,40 ab	212,62 abc	0,46 b
TA	6,62 b	193,47 c	0,57 ab
(%) CV	9,92	10,29	28,81

In each column, means (12 replicates) followed by the same letter do not differ statistically from each other at p<0.05 according to Tukey's test.

Table 4 – Shoot dry matter (SDM) of cowpea plants inoculated with strains of *Bradyrhizobium* sp. BR 3267, EI – 6 separately and in mixture (BR 3267 + EI - 6), absolute control (TA) without inoculation and without nitrogen and nitrogen control (TN) without inoculation and with nitrogen, combined with or without inoculation of AMF - *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann.

Treatment	SDM (g pots ⁻¹)				
	BR 3267	EI - 6	BR 3267 + EI - 6	TA	TN
With <i>G. etunicatum</i>	7,85 a A	7,86 a A	8,28 a A	7,75 a A	8,21 a A
Without <i>G. etunicatum</i>	7,60 a A	6,95 b A	7,17 b A	5,49 b B	7,40 a A
(%) CV	9,92				

In each column, means (6 replicates) followed by the same letter do not differ statistically from each other at p<0.05 according to Tukey's test.

Table 5 – Plant height at 10, 20, 30 and 40 days; root length (RL), shoot dry matter (SDM), root (RDM) and nodule (NDM), SDM/RDM ratio, nitrogen accumulation (N ac.) N content, N₂ efficiency (N₂FE), leghemoglobin (LHb), phosphorus content (P) in the cowpea plants and number of spores (N° esp) and easily extractable glomalin (EEG) in soil with or without inoculation with AMF - *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann.

Treatment	Plant height (cm)				RL (cm)
	10 days	20 days	30 days	40 days	
With <i>G. etunicatum</i>	18,80 a	28,56 a	54,03 a	148,60 a	42,90 a
Without <i>G. etunicatum</i>	18,73 a	28,00 a	47,23 a	143,46 a	42,20 a
(%) CV	8,98	8,42	33,20	18,40	19,82

Treatment	SDM (g pots ⁻¹)	RDM (g pots ⁻¹)	NDM (mg pots ⁻¹)	SDM/RDM
With <i>G. etunicatum</i>	7,99 a	1,90 b	194,06 a	4,31 a
Without <i>G. etunicatum</i>	6,92 b	2,30 a	183,33 a	3,19 b
(%) CV	9,92	33,54	18,29	23,84

Treatment	N ac. (mg N pots ⁻¹)	N Content (mg g ⁻¹ pots ⁻¹)	N ₂ FE (g N g NDM ⁻¹)
With <i>G. etunicatum</i>	231,22 a	29,28 a	1,22 a
Without <i>G. etunicatum</i>	197,09 b	29,34 a	1,10 b
(%) CV	10,29	11,92	17,38

Treatment	LHb (mg g ⁻¹ NFM)	P Content (mg g ⁻¹)	N° spo* (g ⁻¹ solo)	EEG (mg g ⁻¹ aggregate 1-2 mm)
With <i>G. etunicatum</i>	0,50 a	1,47 a	2,28 a	0,54 a
Without <i>G. etunicatum</i>	0,47 a	1,39 a	1,20 b	0,53 a
(%) CV	24,25	17,41	17,03	28,81

In each column, means (30 replicates) followed by the same letter do not differ statistically from each other at $p < 0.05$ according to Tukey's test.

*Original medium processed to $\sqrt{x + 0}$.

Table 6 - Plant height at 10, 20, 30 and 40 days, root length (RL), shoot dry matter (SDM), root (RDM) and node (NDM), SDM/RDM ratio, nitrogen accumulation (N ac.) N content, N₂ efficiency (N₂FE), leghemoglobin (LHb), phosphorus content (P) in the cowpea plant and number of spores (N° esp) and easily extractable glomalin (EEG) in soil with or without inoculation of PGPB - *Paenibacillus brasilensis* (24).

Treatment	Plant height (cm)				RL (cm)
	10 days	20 days	30 days	40 days	
With <i>P. brasilensis</i>	19,40 a	30,00 a	62,95 a	160,76 a	43,70 a
Without <i>P. brasilensis</i>	18,13 b	26,56 b	38,31 b	131,30 b	41,50 a
(%) CV	8,98	8,42	33,20	18,40	19,82

Treatment	SDM (g pots ⁻¹)	RDM (g pots ⁻¹)	NDM (mg pots ⁻¹)	SDM/RDM
With <i>P. brasilensis</i>	8,82 a	2,38 a	209,20 a	3,99 a
Without <i>P. brasilensis</i>	6,09 b	1,82 b	168,20 b	3,52 b
(%) CV	9,92	33,54	18,29	23,84

Treatment	N ac. (mg N pots ⁻¹)	N Content (mg g ⁻¹ pots ⁻¹)	N ₂ FE (g N g NDM ⁻¹)
With <i>P. brasilensis</i>	239,06 a	27,34 b	1,17 a
Without <i>P. brasilensis</i>	189,26 b	31,29 a	1,16 a
(%) CV	10,29	11,92	17,38

Treatment	LHb (mg g ⁻¹ MFN)	P Content (mg g ⁻¹)	N° spo* (g ⁻¹ solo)	EEG (mg g ⁻¹ aggregate 1-2 mm)
With <i>P. brasilensis</i>	0,50 a	1,46 a	1,80 a	0,51 a
Without <i>P. brasilensis</i>	0,47 a	1,40 a	1,59 a	0,56 a
(%) CV	24,25	17,41	17,03	28,21

In each column, means (30 replicates) followed by the same letter do not differ statistically from each other at p<0.05 according to Tukey's test.

*Original medium processed to $\sqrt{x + 0}$.

CONCLUSÕES GERAIS

- As estirpes de *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e *Bacillus* nas condições testadas não apresentaram capacidade para produzir AIA e nem solubilizar fosfato.
- Ocorreu sinergismo entre as estirpes de *Bacillus* e *Paenibacillus* co-inoculados com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) no caupi.
- A estirpe de *Paenibacillus brasiliensis* (24) foi superior em relação às demais estirpes avaliadas na produção de nitrogênio acumulado na matéria seca da parte aérea proporcionando uma melhor performance simbiótica.
- A co-inoculação *Bradyrhizobium* e *Bacillus cereus* (440) inibiu a nodulação específica no caupi.
- A co-inoculação *Bradyrhizobium* e *B. pumilus* (444) inibiu a promoção do crescimento no caupi.
- O nitrogênio proveniente da simbiose foi suficiente para suprir as necessidades das plantas de caupi.
- O N acumulado das plantas de caupi inoculadas com mistura de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR3267 + EI 6) foi superior em relação à inoculação efetuada isoladamente com a estirpe BR 3267.
- A dupla inoculação *Bradyrhizobium* sp. e *Glomus etunicatum* proporcionou maior incremento de nitrogênio nas plantas de caupi.
- A inoculação com o *G. etunicatum* proporcionou aumento na matéria seca da parte aérea das plantas de caupi sendo superior aos tratamentos inoculados apenas com FMA nativo do solo.
- A inoculação com *Paenibacillus brasiliensis* (24) promoveu maior crescimento às plantas de caupi.