Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Influência de aportes de nitrogênio no desenvolvimento inicial de guandu

Everton Lemos Cirino Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Everton Lemos Cirino Silva Zootecnista

Influência de aportes de nitrogênio no desenvolvimento inicial de guandu

Orientadora: Prof^a Dr^a **PATRÍCIA MENEZES SANTOS**

Dissertação apesentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Silva, Everton Lemos Cirino

Influência de aportes de nitrogênio no desenvolvimento inicial de guandu / Everton Lemos Cirino Silva. - - Piracicaba, 2021.

58 p.

Dissertação (Mestrado) -- USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. $\it Cajanus \ cajan \ 2$. Fixação biológica de nitrogênio 3. Inoculação 4. Adubação nitrogenada I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Nair Lemos Francisco Silva e Cicero Cirino da Silva, e irmão Guilherme Lemos Cirino Silva (in memoriam) pelo amor, exemplo e por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as vitórias conquistadas, e por todo amor concedido a mim.

Aos meus pais Nair Lemos Francisco Silva e Cicero Cirino da Silva pela educação, pelo amor e incentivo que permitiram minha chegada até aqui.

À Prof.ª Dra. Patrícia Menezes Santos, pela orientação, ensinamentos, apoio e confiança ao longo do curso. Tenho grande admiração pelo seu trabalho e profissionalismo.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens por me conceder a oportunidade e privilégio para realizar o curso de mestrado nessa instituição.

À Embrapa Pecuária Sudeste pela disponibilização de áreas, equipamentos e funcionários para realização deste trabalho.

Aos membros do comitê de orientação Dra. Patrícia Perondi Anchão de Oliveira e Dr. Rodolfo Godoy, pelas contribuições e apoio ao longo do trabalho.

À Dra. Tsai Siu Mui, pelas sugestões e apoio à realização das análises de qPCR.

À Prof.^a Dra. Taciana Savian e a amiga Larissa Augusto pelo apoio nas análises estatísticas.

A todos os professores pelos ensinamentos durante as disciplinas.

Aos colegas Aline Giovana da França, Andressa Monteiro Venturini e Clóvis Daniel Borges do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP) pelo apoio nas coletas, análises de qPCR e análise dos dados.

Aos colegas de orientação Lucas Balcão e Henrique Brunetti, as estagiárias Renata e Vanessa, e aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, Adilson Malagutti, Mineiro e Lívia de Castro por todas as discussões e ajuda na condução da projeto, tornando concreta sua realização.

Aos amigos Juliana Assis, Luana Menegassi, Maria Eduarda Demiciano, Ana Clara Rocha e todos os outros que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e tornaram a jornada mais leve.

À UNIPASTO (Associação para o fomento à pesquisa de melhoramento de forrageiras) pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
Referências	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Guandu	15
2.2. Aportes de nitrogênio para as plantas	16
2.3. A tecnologia de inoculação de rizóbios	18
2.4. Efeito da fertilização nitrogenada na FBN de leguminosas	20
Referências	21
3. APORTES DE NITROGÊNIO NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE	LINHAGENS
DE GUANDU	25
Resumo	25
Abstract	25
3.1. Introdução	25
3.2. Material e Métodos	26
3.2.1. Características da área experimental	26
3.2.2. Tratamentos e delineamento experimental	28
3.2.3. Inoculação das sementes e semeadura	28
3.2.4. Parâmetros de crescimento	29
3.2.5. Análise estatística	30
3.3. Resultados e Discussão	31
3.4. Conclusões	34
Referências	34
4. ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS DE GUANDU SOB A	PORTES DE
NITROGÊNIO BIOLÓGICO E MINERAL E SUA INFLUÊN	CIA SOBRE
COMUNIDADES MICROBIANAS RIZOSFÉRICAS	37
RESUMO	37
ABSTRACT	37
4.1. Introdução	38
4.2. Material e Métodos	38

4.2.1. Local do experimento	38
4.2.2. Tratamentos e delineamento experimental	39
4.2.3. Inoculação das sementes e semeadura	4 0
4.2.4. Parâmetros de crescimento e nodulação	41
4.2.5. Extração e quantificação do DNA total das amostras de solo	42
4.2.6. PCR quantitativo em tempo real	43
4.2.7. Análise estatística	43
4.3. Resultados e Discussão	45
4.3.1. Efeito das linhagens e aportes de N sobre as características agronômicas e	de
nodulação de guandu	45
4.3.2. Efeito das linhagens de guandu e aportes de N sobre a abundância de bactérias	s e
arquéias totais, AOB e AOA	50
4.4. Conclusões	54
Referências	55

RESUMO

Influência de aportes de nitrogênio no desenvolvimento inicial de guandu

O projeto foi desenvolvido na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos/SP) e dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu em um experimento em campo, onde avaliou-se a influência da inoculação com rizóbios específicos, não específicos e fertilização nitrogenada no desenvolvimento inicial de duas linhagens de guandu. Os tratamentos foram representados por inoculação de sementes com estirpes de Bradyrhizobium SEMIA 6156, recomendada para guandu; estirpes de Bradyrhizobium SEMIA 5079 5080, recomendada para cultura da soja; fertilização nitrogenada na dose de 50 kg.ha⁻¹ N; e tratamento testemunha, aplicados na linhagem g6-95 e cultivar BRS Mandarim. As plantas foram colhidas aos 40 dias após emergência, e avaliadas quanto aos parâmetros de crescimento e acúmulo de N na parte aérea. A segunda etapa foi representada por um experimento em casa de vegetação, com objetivo de avaliar as características relacionadas ao desenvolvimento vegetativo de duas linhagens de guandu sob influência de inoculação com rizóbios específicos, não específicos e doses de adubação nitrogenada combinadas ou não com a inoculação, e seus efeitos sobre a abundância de micro-organismos rizosféricos. Os tratamentos consistiram em duas linhagens de guandu, inoculadas com estirpes SEMIA 6156; estirpes SEMIA 5079 5080; doses de 10 kg.ha⁻¹ N combinadas aos inoculantes; fertilização nitrogenada na dose de 50 kg.ha⁻¹ N; e tratamento testemunha. As plantas foram avaliadas aos 90 dias após emergência, e avaliadas quanto aos parâmetros de crescimento e nodulação. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre as linhagens e estirpes avaliadas, indicando as plantas inoculadas com SEMIA 5079 5080, produzem tanto quanto as plantas inoculadas com rizóbio específico, e em condições de campo produzem o equivalente aquelas adubadas com fertilizante nitrogenado. O uso de 10 kg.ha-1 N nas plantas inoculadas possibilitou maior produção de massa seca e melhorou os teores de N da parte aérea. A cultivar BRS Mandarim, apresentou maior nodulação que a linhagem g6-95, no entanto se mostrou menos eficiente na absorção de N, o que pode estar relacionado aos diferentes padrões de exsudação radicular e interações com microbiota do solo rizosférico. No geral, o guandu apresentou baixa especificidade, resultando em índices de eficiência simbiótica elevada mesmo em solos sem inoculação.

Palavras-chave: Cajanus cajan, Fixação biológica de nitrogênio, Inoculação, Adubação nitrogenada

ABSTRACT

Influence of nitrogen sources on the initial development of the pigeon pea

The project was developed at Embrapa South-East Cattle Research Center (São Carlos, SP, Brazil) and divided into two experiments. The first experiment consisted of a field experiment, where the influence of inoculation with specific and non-specific rhizobia and nitrogen fertilization on the initial development of two pigeonpea lines was evaluated. The treatments were represented by seed inoculation with Bradyrhizobium strains SEMIA 6156, recommended for pigeon pea; Bradyrhizobium strains SEMIA 5079 5080, recommended for soybean cultivation; nitrogen fertilization at a rate of 50 kg.ha⁻¹ of N; and control treatment, applied to line g6-95 and BRS Mandarim. The plants were harvested 40 days after emergence and evaluated for growth parameters and shoot N accumulation. The second experiment was conducted in a greenhouse, with the objective of evaluating the characteristics related to the vegetative development of two pigeon pea lines under the influence of inoculation with specific and non-specific rhizobia, and nitrogen fertilization rates combined or not with inoculation and its effects on the abundance of rhizospheric microorganisms. The treatments consisted of two pigeon pea lines, inoculated with Bradyrhizobium strains SEMIA 6156; Bradyrhizobium strains SEMIA 5079 5080; nitrogen fertilization at a rate of 10 kg.ha⁻¹ N combined with inoculants; nitrogen fertilization at a rate of 50 kg.ha⁻¹ of N; and control treatment. The plants were evaluated 90 days after emergence and evaluated for growth and nodulation parameters. The results showed that there was no difference between the tested lines and strains evaluated, indicating that plants inoculated with SEMIA 5079 5080 produce as much as plants inoculated with specific rhizobia, and under field conditions they produce the equivalent of those fertilized with nitrogen fertilizer. The use of 10 kg.ha⁻¹ of N in the inoculated plants allowed increase of production of dry mass and better levels of N in the shoot. The BRS Mandarim showed higher nodulation than line g6-95, but was less efficient in N uptake, which may be related to different patterns of root exudation and interactions with the rhizospheric soil organisms. In general, pigeonpea had low specificity, resulting in high rates of symbiotic efficiency even in soils without inoculation.

Keywords: Cajanus cajan, Biological nitrogen fixation, Inoculation, Nitrogen fertilization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dados de temperatura máxima (t.máx), mínima (t.mín) e média (t.méd) do ar e precipitação pluvial durante o período experimental
Figura 2. Vista da área experimental
Figura 3. Análise de correlação de Pearson das variáveis altura de plantas (AP), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), relação folha:caule (RFC), índice de clorofila (CLO), N total da parte aérea (NPA) e eficiência relativa (ER). A intensidade da cor e o tamanho dos círculos representam a força da correlação. As cores azuis referem-se à correlação positiva e as cores vermelhas representam correlação negativa. (**) significativo a 1%; (***) significativo a 5%.
Figura 4. Vista das parcelas experimentais
Figura 5. Análise de correlação de Spearman das variáveis altura de plantas aos 35 DAE (AP35), altura de plantas aos 90 DAE (AP90), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (msr), volume de raiz (VOL), índice de clorofila (CLO), N total da parte aérea (NPA) e eficiência relativa (ER), massa seca de nódulo (MSN), número de nódulos (NN), peso médio de nódulos (PMN), bactéria amônio-oxidante (AOB), archaea amônio-oxidante (AOA), bactérias totais (BAC) e archaea totais (ARC). A intensidade da cor e o tamanho dos círculos representam a força da correlação. As cores azuis referem-se à correlação positiva e as cores vermelhas representam correlação negativa. (**) significativo a 1%; (***) significativo a 5%.
Figura 6. Número de cópias de gene 16S rRNA de (a) arquéias amônio oxidantes (AOA) e (b) bactérias amônio oxidantes (AOB) em solo sem planta com e sem adição de 10 kg.ha ⁻¹ de N 50
Figura 7. Número de cópias de gene 16S rRNA de (a) arquéias totais (ARC) e (b) bactérias totais (BAC) em solo sem planta com e sem adição de 10 kg.ha ⁻¹ de N
Figura 8. Número de cópias de gene 16S rRNA de archaea amônio oxidantes (AOA) na linhagem g3-94 (BRS Mandarim) e g6-95 sob diferentes aportes de nitrogênio
Figura 9. Número de cópias de gene 16S rRNA de bactéria amônio oxidantes (AOB) na linhagem g3-94 (BRS Mandarim) e g6-95 sob diferentes aportes de nitrogênio
Figura 10. Número de cópias de gene 16S rRNA de archaea totais (ARC) na linhagem g3-94 (BRS Mandarim) e g6-95 sob diferentes aportes de nitrogênio
Figura 11. Número de cópias de gene 16S rRNA de bactérias totais (BAC) na linhagem g3-94 (BRS Mandarim) e g6-95 sob diferentes aportes de nitrogênio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise química do solo na camada de 0 a 20 cm da área experimental
Tabela 2. Efeito das linhagens de guandu para altura (AP), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MAPS), massa seca de folha (MSF), massa seca de caule (MSC) e relação folha:caule (RFC) aos 40 DAE
Tabela 3. Efeito do aporte de nitrogênio para altura (AP), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de folha (MSF), massa seca de caule (MSC) e relação folha:caule (RFC) aos 40 DAE
Tabela 4. Efeito das linhagens de guandu e aporte de nitrogênio para índice de clorofila (CLO), teor de nitrogênio na parte aérea (NPA), eficiência relativa (ER)
Tabela 5. Análise química do solo utilizado nas parcelas experimentais
Tabela 6. Descrição de primers, DNA padrão e condições de amplificação utilizadas nas análises de qPCR
Tabela 7. Efeito das linhagens de guandu para altura aos 35 e 90 DAE (AP30 e AP90), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e volume de raiz (VOL) aos 90 DAE.
Tabela 8. Efeito do aporte de nitrogênio para altura aos 35 e 90 DAE (AP30 e AP90), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MAPS), massa seca de raiz (MSR) e volume de raiz (VOL) aos 90 DAE
Tabela 9. Efeito das linhagens de guandu e aportes de nitrogênio para número de nódulos (NN), massa seca de nódulos por planta (MSN) e peso médio (PMN) por nódulos
Tabela 10. Efeito das linhagens de guandu e aporte de nitrogênio para índice de clorofila (CLO), teor de nitrogênio na parte aérea (NPA) e eficiência relativa (ER)

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa lugar de destaque na pecuária mundial, possuindo o maior rebanho comercial de bovinos (FAO, 2018), distribuídos em quase 200 milhões de hectares de pastagens (IBGE, 2019). Com a maior parte do rebanho criada à pasto, a atividade se torna competitiva, devido aos menores custos de produção e adaptação às diferentes condições edafoclimáticas encontradas no País (DIAS-FILHO, 2014).

Contudo, devido ao baixo investimento no uso de tecnologias e insumos na formação e manejo, estima-se que grande parte das pastagens brasileiras apresentem algum grau de degradação (DIAS-FILHO, 2014). O processo de degradação pode decorrer de diferentes causas, conforme cada situação específica, envolvendo práticas inadequadas de manejo da pastagem e pastejo, falhas no estabelecimento da pastagem, fatores bióticos e abióticos (DIAS-FILHO, 2007). O fato de grande parte dos sistemas a pasto se encontrarem em áreas de Cerrado, caracterizadas pela baixa fertilidade natural dos solos e longos períodos de estiagem (GODOY et al., 2003), também influenciam no alto índice de degradação.

Diversas técnicas voltadas à recuperação de pastagens têm sido sugeridas para reverter esse cenário, visando o reestabelecimento da fertilidade do solo, aumento da produtividade de forragem e aumento das taxas de lotação animal. Desse modo, fica claro que a adoção de práticas para recuperação dessas áreas reflete em ganhos econômicos e ambientais, na escala local, regional e global.

O plantio de leguminosas tem sido indicado como uma das técnicas para recuperação de pastagens. O consórcio possibilita a introdução de nitrogênio e proteína ao sistema através da interação simbiótica da leguminosa com bactérias fixadoras de nitrogênio, resultando em benefícios para o solo, gramíneas forrageiras e animais sob pastejo. Essa técnica tem sido utilizada com sucesso na recuperação de pastagens degradadas e na manutenção da qualidade de pastos já estabelecidos (NERES, et al., 2012; SOUZA et al., 2016; SILVA et al., 2018). A melhoria nas estruturas físicas, químicas e biológicas dos solos também tem sido atribuídas à diversificação das pastagens com leguminosas (ALVARENGA et al., 1995; ALCÂNTARA et al., 2000).

Dentre as leguminosas utilizadas, destaca-se o guandu [Cajanus cajan (L.) Millsp.], que devido a sua rusticidade, é utilizado em diversas regiões brasileiras. As diferentes linhagens de guandu selecionadas para o cultivo no Brasil possuem, de forma geral, tolerância a seca e a baixa fertilidade do solo, possuindo variação quanto as características morfológicas e agronômicas. Devido a essa adaptabilidade, o guandu tem sido utilizado para múltiplos usos, como adubação verde, cobertura de solo e produção de forragem. Pela produção de grãos de excelente qualidade, é considerada também um importante recurso proteico para alimentação humana, em países da África e Ásia, e em algumas regiões brasileiras.

O guandu pode depender da fixação simbiótica para suprir o nitrogênio em grande parte de seu desenvolvimento vegetativo, principalmente em condições de baixa fertilidade de solo (VALARINI; GODOY, 1994). Considerando que a população de bactérias nativas no solo nem sempre é capaz de estabelecer uma simbiose eficiente com a planta hospedeira, a inoculação com rizóbios selecionados torna-se indispensável (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), garantindo o suprimento de nitrogênio via fixação biológica.

O uso de inoculantes com essas bactérias é bem difundido na cultura da soja, resultando em incrementos na produtividade de grãos e economia com o uso de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 2007). Devido a consagração da técnica de inoculação e importância da cultura, existe uma ampla variedade de inoculantes comerciais com estirpes específica para soja, diferente do que ocorre com os inoculantes selecionados para espécies de leguminosas forrageiras e para adubação verde. Pelo fácil acesso, muitos produtores utilizam inoculantes não-

específicos em sementes de guandu, buscando otimizar o processo simbiótico, mas sem conhecimento sobre a real eficácia da inoculação.

Outra técnica que, aliada a inoculação visa melhorar a eficiência simbiótica é a adição de pequenas doses de fertilizante nitrogenado no início do desenvolvimento de leguminosas. Esta aplicação busca fornecer substrato para a formação dos nódulos nas raízes, garantindo um melhor estabelecimento das plantas. Embora muito questionado, resultados promissores têm sido relatados para diversas espécies de leguminosas.

Nesse contexto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de aportes de nitrogênio biológicos e mineral aplicados sob condições de solo natural no estabelecimento de linhagens de guandu, além de estudar seus efeitos sobre as comunidades de bactérias, arquéias e micro-organismos amônio-oxidantes.

Referências

- ALCÂNTARA, F.A.de.; NETO, A.E.F.; PAULA, M.B.de.; MESQUITA, H.A.de.; MUNIZ, J.A. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um latossolo vermelho-escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 277-88, 2000.
- ALVARENGA, R.C.; COSTA, L.M.; FILHO, W.M.; REGAZZI, A.J. Características de alguns adubos verdes de interesse para a conservação e recuperação de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 175-85, 1995.
- DIAS-FILHO, M.B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação.** (3 ed.) Brasília, DF: EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 2007. 190p.
- DIAS-FILHO, M.B. **Diagnóstico das pastagens no Brasil**. (1 ed.) Belém: EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 2014. 38p. (EMBRAPA. Documentos, 402).
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations Brazilian, 2018. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize. Acesso em: agosto de 2021.
- GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; SOUZA, F.H.D.; PRIMAVESI, A.C. Caracterização de linhagens puras selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 546-55, 2003.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: EMBRAPA SOJA: EMBRAPA CERRADOS, 2007. 80p. (EMBRAPA. Documentos, 283).
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo agropecuário 2017: resultados definitivos. **Censo Agropecuário.**, Rio de Janeiro, v.7, p.1-108, 2019. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro_2017_resultados_definitivos.pdf. Acesso em: agosto de 2021.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. (2 ed.) Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- NERES, M.A.; CASTAGNARA, D.D.; SILVA, F.B.; OLIVEIRA, P.S.R.de.; MESQUITA, E.E.; BERNARDI, T.C.; GUARIANTI, A.J.; VOGT, A.S.L. Características produtivas, estruturais e bromatológicas dos capins Tifton 85 e Piatã e do feijão-guandu cv. Super N, em cultivo singular ou em associação. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 862-69, 2021.
- SILVA, A.; SANTOS, F.L.S.; BARRETO, V.C.M.; FREITAS, R.J.; KLUTHCOUSKI, J. Recuperação de pastagem degradada pelo consórcio de milho, *Urocloa brizantha* cv. Marandu e guandu. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 2, p. 39-47, 2018.

SOUZA, F.M.de.; LEMOS, B.J.M.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.C.de.; MAGNABOSCO, C.U.; CASTRO, L.M.de.; LOPES, F.B.; BRUNES, L.C. Introdução de leguminosas forrageiras, calagem e fosfatagem em pastagem degradada de *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 3, p. 355-64, 2016. VALARINI, M.J.; GODOY, R. Contribuição da fixação simbiótica de nitrogênio na produção do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 51, n. 3, p. 500-4, 1994.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Guandu

O guandu [Cajanus cajan (L.) Millsp.] é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, e tem como centro de origem e de diversidade genética a Índia (GODOY; SANTOS, 2011), que detém cerca de oitenta por cento da produção mundial (ICRISAT, 2021). Possui grande relevância entre as leguminosas graníferas, sendo considerada uma importante fonte proteica em muitos países da África e da Ásia, contribuindo para a segurança alimentar em áreas que enfrentam os efeitos das mudanças climáticas globais (GODOY, et al., 2005; ICRISAT, 2021). No Brasil, acredita-se que sua introdução se deu pela rota dos escravos procedentes da África, tornando-se amplamente distribuída e utilizada, com os mais diversos propósitos (SEIFFERT; THIAGO, 1983).

As linhagens de *Cajanus cajan* possuem diferenças marcantes nas características morfológicas e no ciclo vegetativo, devido a imensa variabilidade genética da espécie. O guandu caracteriza-se como arbusto, pubescente, com hábito de crescimento geralmente ereto, apresentando variação quanto à altura máxima alcançada pela planta, número de ramos primários e secundários, cor e espessura de caule, forma do folíolo, cor da flor, padrão de florescimento e características da vagem e sementes (GODOY et al., 1994; GODOY et al., 2003; GODOY et al., 2005; PROVAZI et al., 2007). O sistema radicular pivotante atinge até dois metros de profundidade e possui sistema de raízes laterais bem desenvolvido nas camadas superficiais do solo (GODOY;SANTOS, 2011). Dependendo da linhagem e suas características, o guandu pode ter um ciclo vegetativo anual ou perene de vida curta (SEIFFERT; THIAGO, 1983).

Conhecido pela sua tolerância as condições adversas de clima e solo (GODOY et al., 2005; SOUZA et al., 2007) e por gerar produtos de elevado valor biológico e nutritivo, o guandu pode exercer múltiplas funções nos sistemas agrícolas, atuando como planta melhoradora de solos, na recuperação de áreas degradadas, como planta fitorremediadora, na recuperação de pastagens, na alimentação de animais de produção (na forma de grãos, forragem, capineira, silagem ou feno) e na alimentação humana (AZEVEDO et al., 2007).

Segundo Souza et al. (2007), devido a sua tolerância ao déficit hídrico, o guandu proporciona produção de forragem durante todo o ano, inclusive nos períodos secos, quando grande parte das forrageiras tropicais tem crescimento limitado. Tal característica, aliada a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, faz do guandu uma importante estratégia para aumento da eficiência dos sistemas de produção animal a pasto. Rodrigues et al. (2004) relataram que nos meses de julho a setembro, o ganho de peso (g/dia) de novilhas leiteiras que tiveram acesso ao banco de guandu (cv. BRS Mandarim) durante três horas por dia em cinco dias da semana, foi quase 10% superior ao das novilhas que não tiveram acesso ao mesmo recurso forrageiro. Os autores também demonstraram o impacto da oferta da leguminosa no custo de alimentação (R\$/kg de ganho de peso vivo), que representou redução de 21% em relação à dieta semelhante, porém sem o acesso ao guandu.

O destaque das leguminosas forrageiras em ambientes pastoris se deve também a produção de forragem com atributos nutricionais capazes de impactar positivamente a nutrição e sanidade dos animais (ANDRADE, et al., 2015). Ao avaliarem linhagens puras e cultivares comerciais de guandu, Rodrigues et al. (2004) obtiveram produção de até 16.000 kg.ha⁻¹.ano de matéria seca, com teores de 16 a 18% de proteína bruta, o que representa aproximadamente 2.500 kg.ha⁻¹ de proteína bruta. Valores semelhantes de proteína bruta na matéria seca também foram encontrados por Valarini e Godoy (1994) em acessos de *Cajanus cajan*. A concentração de nutrientes, como

nitrogênio, nas leguminosas forrageiras dependerá do manejo atribuído às plantas, em relação ao número de cortes e duração do ciclo (FREIRE, 1992).

A contribuição potencial do guandu na recuperação de áreas degradadas é frequentemente citada (ALCÂNTARA et al., 2000; BELTRAME; RODRIGUES, 2008; GODOY; SANTOS, 2011; OLIVEIRA et al., 2017; TERRA et al., 2019), e pode ser atribuída a sua grande capacidade de reciclagem de nutrientes, demonstrada pela elevada produção de massa seca e conteúdo de nutrientes em seus tecidos (ALCÂNTARA et al., 2000), resultando em um aumento de nutrientes e matéria orgânica no solo em que se desenvolvem (FRANCO et al., 1995).

2.2. Aportes de nitrogênio para as plantas

O nitrogênio (N), por ser um constituinte dos ácidos nucléicos e de proteínas, biomoléculas fundamentais para todos os processos biológicos, é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas (HUNGRIA et al., 2007). A obtenção do nitrogênio pelas plantas ocorre de diferentes formas, pela decomposição da matéria orgânica, fixação não-biológica, fertilizantes nitrogenados e fixação biológica do nitrogênio atmosférico. A fixação não-biológica representa aproximadamente 10% das entradas de nitrogênio na Terra, resultantes de processos naturais, como a reação de descargas elétricas com o N₂, combustão e vulcanismo (HUNGRIA et al., 2007).

Nos solos, o nitrogênio está presente sob a forma orgânica e inorgânica. As formas orgânicas correspondem aos componentes da matéria orgânica, como proteínas, peptídeos, quitina, ácidos nucléicos, bases nitrogenadas e uréia, que são mineralizados por micro-organismos no processo de decomposição. Essa etapa envolve a síntese de amônia (NH₃), utilizada no metabolismo energético dos decompositores e sua conversão em N inorgânico sob a forma de amônio (NH₄+), tornando-se passível de ser assimilado pelas plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CHEN et al., 2014).

O amônio (NH₄⁺) não assimilado como nutriente no solo é convertido em nitrato (NO₃⁻), em um processo conhecido como nitrificação. Os micro-organismos responsáveis pela transformação são denominados amônio oxidantes, e incluem grupos específicos de bactérias (AOB) e archaeas (AOA). A nitrificação consiste em duas etapas, sendo que inicialmente ocorre a oxidação de NH₄⁺ para nitrito (NO₂⁻), e posteriormente a oxidação do nitrito para nitrato (DIAS, 2016). Sendo um processo de oxidação estritamente aeróbico, a nitrificação demanda oxigênio (O₂), de modo que só pode ocorrer em ambientes aerados e ricos em O₂, tais como as camadas mais superficiais dos solos, e predominantemente em solos mais arenosos (VICTORIA et al., 1992; DIAS, 2016).

A nitrificação no solo é diretamente afetada por diversos fatores ambientais, entre os principais estão a aeração, temperatura, umidade, pH e disponibilidade de substrato (amônio). A disponibilidade de substrato é fator crucial e está relacionada à qualidade dos materiais em decomposição, em termos de relação C:N e teor total de nitrogênio (VICTORIA et al, 1992; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As leguminosas, como o guandu, são geralmente ricas em nitrogênio apresentando baixa relação C:N e, por essa razão, a liberação de nutrientes dos seus resíduos propende a ser mais rápida em comparação às plantas com menor teor de nitrogênio, que apresentam alta relação C:N e maior taxa de imobilização de nutrientes pelas comunidades microbianas (FRANCO et al., 1995; CHEN et al., 2014). Entretanto, mesmo entre plantas consideradas de baixa relação C:N há diferença na taxa de liberação de nutrientes, como demonstrado por Alcântara et al. (2000), que ao avaliarem o efeito do guandu e da crotalária (*Crotalarea juncea* L.) sobre os atributos químicos do

solo em áreas de *Brachiaria decumbens*, observaram que o decréscimo do conteúdo de N-NO₃⁻ + N-NH₄⁺ no solo sob guandu ocorreu mais rápido, indicando o avanço nos processos de mineralização e nitrificação dos resíduos do guandu, em relação aos resíduos da crotalária. No mesmo experimento, os autores observaram maior teor dos compostos nitrogenados nas camadas mais superficiais do solo, evidenciando a maior intensidade dos processos biológicos nos ambientes mais aerados.

A disponibilização de nitrogênio através da fertilização nitrogenada, apesar do elevado custo, representa a forma mais rápida de fornecimento do nutriente para as plantas (HUNGRIA et al, 2007). No entanto, devido à complexidade da dinâmica do nitrogênio no solo, esta interferência exerce profundas influências nas transformações e fluxos desse elemento no sistema solo-planta-atmosfera. A baixa eficiência de utilização do N pelas plantas, confere um dos principais problemas atribuídos à fertilização nitrogenada, e está diretamente relacionada às perdas via volatilização da amônia, lixiviação do nitrato e emissão de óxido nitroso (N₂0) (COSTA et al., 2006; VIEIRA, 2017).

Os íons de NH₄⁺, formados a partir da aplicação de fertilizantes, que não foram absorvidos e imobilizados, podem ser convertidos para forma nítrica, pela nitrificação. Além disso, pode ocorrer a transformação do amônio em amônia (NH₃), devido a alcalinização do meio durante a rápida hidrólise da uréia, ocasionando a volatilização de amônia. O aumento de NO₃⁻ na solução do solo o torna susceptível à lixiviação, por não ser adsorvido pelas partículas de argila e matéria orgânica. Este aumento de nitrato também estimula a desnitrificação, que é a redução do nitrato a nitrogênio atmosférico, resultando nas perdas gasosas de N₂0 e N₂ (VICTORIA et al., 1992; VIEIRA, 2017; BOURSCHEIDT et al., 2019).

De maneira geral, as perdas de nitrogênio ocasionadas pela fertilização são estimuladas pela presença de quantidades excessivas de nitrato e condições que favoreçam as reações redutoras no solo. Para evitá-las, o N aplicado no solo precisa ser recuperado, e isso é possível otimizando a utilização do nitrogênio pelas plantas, que dependerá da espécie e estádio de desenvolvimento vegetal, grau de fracionamento e dose aplicada, frequência de utilização, presença de animais, fatores ambientais e fertilidade do solo (COSTA et al., 2006; COSTA et al., 2016).

Embora sendo um dos elementos mais abundantes do planeta na forma gasosa (N₂), o nitrogênio é frequentemente o nutriente mais limitante do crescimento vegetal, pois sua assimilação pelas plantas ocorre predominantemente sob as formas de amônio (NH₄⁺) e nitrato (NO₃⁻) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; DIAS, 2016). Contudo, os gases atmosféricos também se difundem para o espaço poroso do solo, permitindo que o N₂ seja aproveitado por micro-organismos conhecidos como diazotróficos, amplamente distribuídos nos domínios *Bacteria* e *Archaea*, capazes de reduzir o N-atmosférico à amônia (NH₃) graças à presença e atividade do complexo enzimático da nitrogenase, no processo chamado fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2007; CASSETARI et al., 2016; DIAS, 2016; VIEIRA, 2017).

A maioria dos organismos diazotróficos é de vida livre (assimbióticos) e pertence ao domínio *Bacteria*, com ampla variedade de habitats, incluindo ambientes terrestres e aquáticos (DIXON; KAHN, 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A fixação biológica também é realizada por micro-organismos simbióticos, através da associação com plantas da família *Leguminosae* (*Fabaceae*) (FREIRE, 1992). Na rizosfera, o reconhecimento inicial dos simbiontes ocorre através da exsudação de compostos flavonoides e isoflavonoides pelas sementes e raízes da planta, que ativam genes específicos para etapa de nodulação ou estimulam o crescimento de bactérias no ambiente rizosférico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; HUNGRIA et al., 2007; VIEIRA, 2017). A simbiose é facilmente identificada pela formação de estruturas especializadas nas raízes, chamadas nódulos. As bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas

(BFNN) pertencem à classe *Alphaproteobacteria* (ordem *Rhizobiales*, gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*), e são coletivamente conhecidas como rizóbios (CASSETARI et al., 2016).

Nos nódulos, o nitrogênio atmosférico (N₂) é fixado pelo rizóbio e reduzido a N- NH₃ (amônia) pela ação da enzima nitrogenase. A amônia sintetizada é transformada em íons NH₄⁺ (amônio), através da incorporação de íons de H⁺ presentes nas células bacterianas, sendo então distribuídos para planta hospedeira e incorporados em diversas formas de N orgânico, como aminoácidos, ureídos e amidas (HUNGRIA et al., 2007). Valores superiores de nitrogênio contidos na biomassa do guandu, são dados pela sua capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico (N₂) através da simbiose com as bactérias nodulíferas do gênero *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp. (VALARINI; GODOY, 1994; ANAND; DOGRA, 1997; DEGEFU et al., 2018).

Contudo, a fixação biológica de nitrogênio é energeticamente custosa às plantas, devido ao consumo de energia armazenada na forma de ATP (Teixeira et al., 1998). O custo desse processo biológico pode ser contrabalanceado por uma simbiose altamente eficiente e melhor aproveitamento do N fixado (NEVES; RUMJANECK, 1992). Com isso, a adoção da técnica de inoculação com estirpes bacterianas torna-se necessária, uma vez que nem sempre a população nativa de BFNN do solo é capaz de estabelecer uma simbiose mutualista com o hospedeiro cultivado (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), como ocorre em solos de áreas degradadas ou ocupadas por culturas não leguminosas, onde o guandu é comumente semeado.

2.3. A tecnologia de inoculação de rizóbios

O uso de inoculantes visa garantir o maior número de rizóbios eficientes na rizosfera das plantas cultivadas, e podem ser encontrados na forma sólida ou líquida, contendo a cultura das estirpes selecionadas ou uma combinação delas.

A turfa, forma sólida do inoculante, é o veículo mais utilizado nas formulações, no Brasil e no mundo, por apresentar diversas características que resultam na maior sobrevivência das bactérias, como alta retenção de água e elevado teor de matéria orgânica. O uso de fórmulas líquidas também é difundido, principalmente pela facilidade de aplicação e menor desgaste de máquinas agrícolas, e, embora não ofereça a proteção física e nutricional da turfa, é possível obter maior concentração de células de rizóbios no produto e na semente (BRANDÃO JÚNIOR; HUNGRIA, 2000; HUNGRIA et al., 2007). Em ambos os casos, as sementes inoculadas devem ser secas à sombra e semeadas imediatamente, pois os rizóbios são sensíveis às temperaturas elevadas e perdem a viabilidade a medida ficam expostas à pressão parcial de oxigênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A recomendação de estirpes para uso como inoculante microbiano depende de análises técnicas para validação da eficiência agronômica dessas bactérias. É desejável que as estirpes de rizóbio selecionadas para compor os inoculantes comerciais contenham habilidade de formar nódulos e fixar nitrogênio na espécie-alvo, baixa mortalidade na semente, compatibilidade com defensivos agrícolas, capacidade de competir com rizóbios nativos por sítios de nodulação, potencial para colonização rizosférica e migração, adaptabilidade às condições ambientais variáveis, persistência no solo mesmo na ausência do hospedeiro e eficiência de fixação na presença de N combinado no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

No Brasil, diferentes instituições de pesquisa são depositárias de coleções de culturas de rizóbios, sendo a coleção SEMIA, do Instituto de Pesquisas Agronômicas (IPAGRO, hoje FEPAGRO), a responsável pela

manutenção e distribuição das estirpes recomendadas para o uso em inoculantes comerciais para as culturas leguminosas (MAPA, 2011).

No entanto, dado que o processo simbiótico é influenciado por vários fatores ambientais, nem sempre as estirpes selecionadas alcançam seu máximo potencial no campo, em virtude da falta de adaptação às condições em que serão utilizadas ou baixa competitividade com estirpes nativas (RUFINI, 2014; VIEIRA, 2017). Fernandes et al. (2003), inoculando sementes de guandu com estirpes da coleção SEMIA recomendadas para a espécie, não observaram incrementos no crescimento vegetativo, teores de N nos tecidos e nodulação das raízes, em solos dos tabuleiros costeiros de Sergipe. Isso ocorreu, segundo os autores, em consequência da baixa adaptabilidade das estirpes às condições edafoclimáticas da região e incapacidade de competirem com populações de rizóbios já estabelecidos no solo.

O guandu é uma leguminosa altamente promíscua, com capacidade de nodular com bactérias fixadoras de nitrogênio de crescimento lento e rápido, como as estirpes de *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp., respectivamente. Contudo, estirpes de *Bradyrhizobium* se mostram simbioticamente superiores às estirpes de *Rhizobium* (ANAND; DOGRA, 1997). A promiscuidade pode ser um fator limitante à fixação biológica de nitrogênio (FBN), e devido a esta característica relatada no guandu, cuidados devem ser tomados na inoculação visando alcançar o maior número de células de estirpe eficiente e selecionada, garantindo vantagem competitiva pelos sítios de infecção em relação às populações nativas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As duas estirpes de BFNN aprovadas como inoculantes para o guandu, pertencem ao gênero Bradyrhizobium, sendo elas a estirpe SEMIA 6156 (CPAC F2) e SEMIA 6157 (BR 2801), isoladas de Crotalaria spectabilis e Cajanus cajan, respectivamente (MAPA, 2011). De acordo com Valarini e Godoy (1994), o guandu pode suprir mais de 90% do nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento através da simbiose com Bradyrhizobium spp. Utilizando inoculantes SEMIA 6156 e SEMIA 6157 em sementes de guandu, Oliveira et al (2009) observaram que as plantas inoculadas produziram tanto quanto as plantas adubadas com 50 kg.ha-1 de N mineral.

No entanto, em muitas situações, tem sido indicado na semeadura do guandu o uso de inoculantes recomendados para outras culturas, como a soja. Essa situação decorre tanto pela baixa oferta de inoculante comercial próprio para o guandu, como pelo desconhecimento da necessidade de uso de inoculantes específicos por parte de alguns produtores e técnicos (ZILLI et al., 2011).

Para a inoculação da soja são recomendadas quatro estirpes de rizóbio, sendo duas de *Bradyrhizobium* elkanii (SEMIA 587 e SEMIA 5019), e duas de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080). As combinações mais utilizadas têm sido a SEMIA 587+SEMIA 5019, em áreas já cultivadas no sul do País, e a SEMIA 5079+SEMIA 5080, nos Cerrados (HUNGRIA et al., 2007; MAPA, 2011). A técnica demonstrou importante impacto nos custos de produção da soja no Brasil, pela substituição total dos adubos nitrogenados (MENDES et al., 2003).

O uso de estirpes não específicas tem apresentado resultados variados. Ao comparar o uso da estirpe SEMIA 5019 com estirpes aprovadas como inoculante para guandu (SEMIA 6156 e 6157) em cultivo de guanduanão, Rufini et al. (2014) não observaram diferenças para as variáveis número de nódulos, massa seca da parte aérea, teor e acúmulo de nitrogênio e eficiência relativa. Já Alaswad et al. (2019), sugerem o uso de estirpe de soja mutante de *B. diazoefficiens*, por garantir maior competitividade sobre os rizóbios nativos e formação de nódulos eficientes em guandu. Utilizando rizóbios isolados de feijão-caupi, Guimarães et al. (2016) observaram potencial para uso em guandu BRS Mandarim. Em contrapartida, Carvalho et al. (2008) relataram que embora tenha havido nodulação do guandu a partir de rizóbio específico para cultura da soja, ela não demonstrou eficiência simbiótica significativa.

2.4. Efeito da fertilização nitrogenada na FBN de leguminosas

Diversos fatores químicos, físicos, bióticos e abióticos interferem na associação do rizóbio com as leguminosas, seja na etapa de estabelecimento, desenvolvimento ou funcionamento da simbiose. A ineficiência ou ausência da nodulação pode estar relacionada aos efeitos destes fatores, que variam de acordo com a bactéria, planta e ambiente, afetando diretamente a fixação biológica de N₂ (FREIRE, 1992; FRANCO; NEVES, 1992; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CASSETARI et al., 2016).

A disponibilidade de N mineral no solo exerce importante influência na fixação de nitrogênio. O processo simbiótico só ocorre em situações de deficiência deste nutriente, por outro lado, o rizóbio necessita dele para infecção, formação e crescimento do nódulo (FRANCO; NEVES, 1992; CASSETARI et al., 2016). Deste modo, o excesso de N mineral na solução do solo reduz drasticamente a nodulação das leguminosas, que ocorre em resposta às demandas nutricionais da planta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Já a disponibilidade de pequenas doses do nutriente no início do crescimento radicular podem aumentar os sítios de infecção e, portanto, promover maior formação de nódulos (TSAI et al., 1993), beneficiando a FBN.

Em determinadas culturas leguminosas que apresentam nodulação tardia, fixam N durante um curto período ou apresentam baixo potencial de FBN, a aplicação de pequenas doses de nitrogênio tem funcionado como uma dose de arranque (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), como é o caso do feijoeiro-comum (TSAI et al., 1993; BRITO et al., 2011; SOARES et al., 2016) e caupi (XAVIER et al., 2008).

No guandu, a nodulação começa quinze dias após a semeadura e continua por até 120 dias, declinando devido à maior demanda de carboidratos na fase granífera (GODOY; SANTOS, 2011), o que presumivelmente resulta em menor oferta de fotoassimilados para os bacteroides e esqueletos de carbono para incorporação da NH₃ produzida pela nitrogenase (HUNGRIA et al., 2007). Nos primeiros dias após a germinação, as plântulas utilizam as reservas de nitrogênio presente nos cotilédones para o crescimento e, muitas vezes estas reservas se esgotam antes da planta estabelecer a simbiose com o rizóbio, apresentando algumas vezes sintomas de clorose.

A atividade dos rizóbios, na simbiose com leguminosas, é regulada pela troca de carbono e nitrogênio entre a planta e a bactéria no ambiente rizosférico (LI et al., 2019). Os exsudatos liberados pelas raízes, são a principal fonte de entrada de carbono assimilável no solo, promovendo tanto o aumento como a intensificação das funções microbianas na rizosfera (ROMAGNOLI; ANDREOTI, 2016), e praticamente tudo o que afeta o crescimento vegetal, afeta a exsudação de substâncias orgânicas pelas raízes (CARDOSO; FREITAS, 1992). Logo, técnicas que promovem o crescimento da planta, também podem contribuir para a fixação biológica de nitrogênio.

O uso de pequenas doses de nitrogênio nas fases iniciais do crescimento em algumas leguminosas tem surtido resultados promissores na nodulação, fixação de N₂ e produtividade. Em estudos conduzidos por Brito et al. (2011), a aplicação de 15 mg.N.kg⁻¹ de solo na semeadura do feijoeiro possibilitou melhor resultado econômico para a cultura, e contribui em maior teor de N na parte aérea oriundo da FBN. De acordo com Tsai et al. (1993) essa dose de N (15 mg.kg⁻¹ de solo) no início do ciclo do feijoeiro, melhoram as condições para a formação de nódulos e as taxas gerais de fixação biológica, com ênfase para os plantios em solos de média fertilidade. Outros benefícios foram observados por Soares et al. (2016) com aplicação de 20 kg.ha⁻¹ N em conjunto à inoculação com rizóbio, que devido ao melhor desenvolvimento radicular e consequente estabelecimento da simbiose, apresentou aumentos no rendimento de grãos e economia de aproximadamente 60 kg.ha⁻¹ de adubo nitrogenado. Em cultivo de *Astragalus sinicus* L., Li et al (2019) demonstraram que a aplicação de pequenas doses de N, aumentou o peso seco das plantas, fixação biológica e a abundância do gene nifH (que codifica a nitrogenase) nos nódulos das raízes. Resultados com

leucena (*Leucaena leucocephala*), foram relatados por Sanginga et al. (1988, apud Dogra e Dudeja,1993, p.152), e indicaram que a inoculação junto à aplicação de 40 kg.ha⁻¹ N na fase inicial, beneficiou as plantas durante toda fase de crescimento, enquanto as plantas não adubadas tiveram a fixação biológica adiada por aproximadamente oito semanas.

As leguminosas forrageiras, como o guandu, têm grande importância na consorciação e recuperação de pastagens degradadas. De modo geral, essas áreas apresentam condições de baixa a média fertilidade de solo, que pode comprometer o desenvolvimento inicial das plantas. A aplicação de nitrogênio em pequenas doses no estabelecimento das leguminosas, tem apresentado efeito benéfico quando utilizada em solos com estas condições (HUANG et al, 2017), garantindo às leguminosas a capacidade de aumentar a diversidade funcional destas áreas já nos primeiros dias após o seu estabelecimento.

Referências

- ALASWAD, A.A.; OEHRLE, N.W.; KRISHNAN, H.B. Classical soybean (*Glycine max* (L.) Merr) symbionts, Sinorhizobium fredii USDA191 and Bradyrhizobium diazoefficiens USDA110, reveal contrasting symbiotic phenotype on pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 20p, 2019.
- ALCÂNTARA, F.A.de.; NETO, A.E.F.; PAULA, M.B.de.; MESQUITA, H.A.de.; MUNIZ, J.A. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um latossolo vermelho-escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 277-88, 2000.
- ANAND, R.C; DOGRA, R.C. Comparative efficiency of Rhizobium/Bradyrhizobium spp. Strains in nodulating Cajanus cajan in relation to characteristic metabolic enzyme activities. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 283-87, 1997.
- ANDRADE, C.M.S.; ASSIS, G.M.L.; FERREIRA, A.S. Eficiência de longo prazo da consorciação entre gramíneas e leguminosas em pastagens tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA: Dimensões tecnológicas e sociais da zootecnia, 25, 2015, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, CE: ABZ. 2015. 31p.
- AZEVEDO, R.L.; RIBEIRO, G.T.; AZEVEDO, C.L.L. Feijão guandu: uma planta multiuso. **Revista da Fapese**, São Cristóvão, SE, v. 3, n. 2, p. 81-6, 2007.
- BELTRAME, T.P.; RODRIGUES, E. Comparação de diferentes densidades de feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) na restauração florestal de uma área de reserva legal no Pontal do Paranapanema, SP. **Scientia** Forestalis, Piracicaba, v. 36, n. 80, p. 317-27, 2008.
- BOURSCHEIDT, M.L.B.; PEDREIRA, B.C.; PEREIRA, D.H.; ZANETTE, M.C.; DEVENS, J. Estratégias de fornecimento de nitrogênio em pastagens: fertilizante mineral, inoculante bacteriano e consórcio com amendoim forrageiro. **Scientific Eletronic Archives**, v. 12, n. 3, p. 137-47, 2019.
- BRANDÃO JUNIOR, O.; HUNGRIA, M. Efeitos de doses de inoculante turfoso na fixação biológica do nitrogênio pela cultura da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 527-35, 2000.
- BRITO, M.M.P.; MURAOKA, T.; SILVA, E.C.da. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p.206-15, 2011.
- CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. A rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. Microbiologia do solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 41-58.

- CARVALHO, F.G.de.; SELBACH, P.A.; SILVA, A.J.N.da. Especificidade hospedeira de variantes *Bradyrhizobium* spp EM SOJA (cvs Peking e Clark), caupi e guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2701-08, 2008.
- CASSETARI, A.S.; SILVA, M.C.P.da.; CARDOSO, E.J.B.N. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica. In: CARDOSO, E.J.B.N.; ANDREOTE, F.D. (ed.) **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 111-31.
- CHEN, B.; LIU, E.; TIAN, Q.; YAN, C.; ZHANG, Y. Soil nitrogen dynamics and crop residues. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, p. 429-42, 2014.
- COSTA, K.A.P.; OLIVEIRA, I.P.; FAQUIN, V. Adubação nitrogenada para pastagens do gênero *Brachiaria* em solos do Cerrado. Santo Antônio do Goiás: EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2006. 60p. (EMBRAPA. Documentos, 192).
- COSTA, N.L.; PAULINO, V.T.; MAGALHÃES, J.A.; RODRIGUES, B.H.N.; SANTOS, F.J.S. Eficiência do nitrogênio, produção de forragem e morfogênese do capim-massai sob adubação. **Nucleus**, v. 13, n. 2, p. 31-40, 2016.
- DEGEFU, T.; WOLDE-MESKEL, E.; ADEM, M.; FIKRE, A.; AMEDE, T.; OJIEWO, C. Morphophysiological diversity of rhizobia nodulating pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) growing in Ethiopia. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 167-77, 2018.
- DIAS, A.C.F. Transformações do nitrogênio no solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; ANDREOTE, F.D. (ed.) **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 99-109.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 621-31, 2004.
- DOGRA, R.C.; DUDEJA, S.S. Fertilizer N and nitrogen fixation in legume-Rhizohium symbiosis. **Annals of Biology**, v. 9, p. 149-64, 1993.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção e caracterização de rizóbios para guandu, caupi e feijão-de-porco nativos dos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. Aracaju: EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS; EMBRAPA SOJA, 2003. 4p. (EMBRAPA. Comunicado Técnico, 15).
- FRANCO, A.A.; FARIA, L.E.; CAMPELLO, S.M.de.; SILVA, E.M.R.da. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. In: ESTEVES, F.A. (ed.) **Oecologia brasiliensis**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1995. p. 459-67.
- FRANCO, A.A.; NEVES, M.C.P. Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 219-30.
- FREIRE, J.R.J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 121-40.
- GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; NEGREIROS, G.F. Avaliação agronômica e seleção de germoplasma de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 23, n. 5, p. 730-42, 1994.
- GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; SANTOS, P.M.; SOUZA, F.H.D. Avaliação agronômica de linhagens selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, n. 1, p. 7-19, 2005.
- GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; SOUZA, F.H.D.; PRIMAVESI, A.C. Caracterização de linhagens puras selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 546-55, 2003.

- GODOY, R.; SANTOS, P.M. Guandu. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Ed.) **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, 2011. p. 294-309.
- GUIMARÃES, S.L.; NEVES, L.C.R.; BONFIM-SILVA, E.M.; CAMPOS, D.T.S. Development of pigeon pea inoculated with *Rhizobium* isolated from cowpea trap host plants. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 4, p. 789-95, 2016.
- HUANG, J.; AFSHAR, R.K.; TAO, A.; CHEN, C. Efficacy of starter N fertilizer and rhizobia inoculant in dry pea (*Pisum sativum* Linn.) Production in a semi-arid temperate environment. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 63, n. 3, p. 248-53, 2017.
- HUNGRIA, M.; BOHRER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 45-52, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: EMBRAPA SOJA: EMBRAPA CERRADOS, 2007. 80p. (EMBRAPA. Documentos, 283).
- INTERNATIONAL CROPS RESEARCH INSTITUTE FOR THE SEMI-ARID TROPICS (ICRISAT). **Pigeonpea**. Disponível em: http://exploreit.icrisat.org/profile/Pigeonpea/279. Acesso em: junho de 2021.
- LI, Y.; PAN, F.; YAO, H. Response of symbiotic and asymbiotic nitrogen-fixing microorganisms to nitrogen fertilizer application. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, p. 1948-58, 2019.
- MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Soybean response to starter nitrogen and Bradyrhizobium inoculation on a Cerrado oxisol under no-tillage and conventional tillage systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 81-7, 2003.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf. Acesso em: Junho de 2021.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. (2 ed.) Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- NEVES, M.C.P.; RUMJANECK, N.G. Bioquímica e fisiologia da fixação de nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 122-41.
- OLIVEIRA, P.P.A.; MATTA, F.P.; GODOY, R. Consorciação com guandu na recuperação de pastagens degradadas, uma tecnologia de duplo propósito: adubação verde e pastejo consorciado diferido. São Carlos: EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE, 2017. 6p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 75).
- OLIVEIRA, P.P.A.; SCHAER, A.B.; ASCÊNCIO, F.; GODOY, R.; TSAI, S.M. Fixação biológica de nitrogênio em guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp cv. BRS Mandarim) inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Na presença ou ausência de tratamento com fungicida. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46, 2009, Maringá. **Anais...** Maringá, PR: SBZ. 2009. 3p.
- PROVAZI, M.; CAMARGO, L.H.G.; SANTOS, P.M.; GODOY, R. Descrição botânica de linhagens puras selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 2, p. 328-34, 2007.
- RODRIGUES, A.A.; SANTOS, P.M.; GODOY, R.; NUSSIO, C.M.B. **Utilização de guandu na alimentação de novilhas leiteiras**. São Carlos: EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE, 2004. 8p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 34).

- ROMAGNOLI, E.M.; ANDREOTE, F.D. Rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; ANDREOTE, F.D. (ed.) Microbiologia do solo. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 47-60.
- RUFINI, M.; OLIVEIRA, D.P.; TROCHMANN, A.; SOARES, B.L.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com guandu-anão em casa de vegetação e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 3, p. 197-206, 2014.
- SEIFFERT, N.F.; THIAGO, L.R.L.S. Legumineira: cultura forrageira para produção de proteína. Campo Grande: EMBRAPA CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM GADO DE CORTE (CNPGC), 1983. 52p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 13).
- SOARES, B.L.; FERREIRA, P.A.A.; RUFINI, M.; MARTINS, F.A.D.; OLIVEIRA, D.P.; REIS, R.P.; ANDRADE, M.J.B.de.; MOREIRA, F.M.S. Agronomic and Economic efficiency of common-bean inoculation with rhizobia and mineral nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, 13p, 2016.
- SOUZA, F.H.D.; FRIGERI, T.; MOREIRA, A.; GODOY, R. **Produção de sementes de guandu**. São Carlos: EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE, 2007. 68p. (EMBRAPA. Documentos, 69).
- TEIXEIRA, K.R.S.; MARIN, V.A.; BALDANI, J.I. Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN. Seropédica: EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 1998. 25p. (EMBRAPA. Documentos, 84).
- TERRA, A.B.C.; FLORENTINO, L.A.; REZENDE, A.V.de.; SILVA, N.C.D. Leguminosas forrageiras na recuperação de pastagens no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 305-13, 2019.
- TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutriente levels. **Plant and Soil**, v. 152, p. 131-38, 1993.
- VALARINI, M.J.; GODOY, R. Contribuição da fixação simbiótica de nitrogênio na produção do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 51, n. 3, p. 500-4, 1994.
- VICTORIA, R.L.; PICCOLO, M.C.; VARGAS, A.A.T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 105-20.
- VIEIRA, R.F. Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas. (1 ed.) Brasília, DF: EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2017. 165p.
- XAVIER, T.F.; ARAÚJO, A.S.F.de.; SANTOS, V.B.; CAMPOS, F.L. Inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e a produtividade de grãos de feijão-caupi. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2037-41, 2008.
- ZILLI, J.E.; NETO, M.L.S.; JÚNIOR, I.F.; PERIN, L.; MELO, A.R.de. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 739-42, 2011.

3. APORTES DE NITROGÊNIO NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE LINHAGENS DE GUANDU

RESUMO

O desenvolvimento inicial do guandu é considerado lento, em comparação a outras forrageiras cultivadas, e pode representar um desafio resultando em maior necessidade de tratos culturais e um menor densidade do estande. Aliada a seleção de linhagens de melhor aptidão agrícola, a inoculação surge como uma estratégia para garantir o melhor estabelecimento e produção de biomassa de leguminosas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da inoculação com rizóbios específicos (SEMIA 6156), não específicos (SEMIA 5079 5080) e fertilização nitrogenada no crescimento inicial de duas linhagens de guandu. O experimento foi conduzido em campo na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos/SP), utilizando-se delineamento inteiramente aleatorizado e quatro repetições, . Não houve diferença para os parâmetros de crescimento entre as linhagens e aportes de N avaliados, indicando que nas condições de solo utilizadas, o uso de estirpes SEMIA 5079 5080, na inoculação de sementes de guandu, induzem a mesma taxa de crescimento, acúmulo de massa seca e nitrogênio que a estirpe SEMIA 6156, recomendada para a cultura. Dependendo das condições ambientais, tanto a inoculação com rizóbios comerciais como a adubação nitrogenada podem não ter efeito sobre os parâmetros de crescimento e acúmulo de nitrogênio em plantas de guandu, pelo favorecimento da simbiose com rizóbios nativos ou a absorção de N do solo em detrimento da fixação.

Palavras-chave: Cajanus cajan, inoculação, nitrogênio, fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

The initial development of pigeon pea is considered slow, compared to other cultivated forages, and can represent a challenge, resulting in a greater need for cultural treatments and a lower stand density. Allied to the selection of lines with the best suitability, inoculation appears as a strategy to ensure the best establishment and production of legume biomass. The objective of this study was to evaluate the influence of inoculation with specific (SEMIA 6156), non-specific (SEMIA 5079 5080) rhizobia and nitrogen fertilization on the initial development of two pigeon pea lines. The experiment was conducted in the field at Embrapa South-East Cattle Research Center (São Carlos, SP, Brazil), using a completely randomized design, with four replications, arranged in 2x4 factorial outline. There was no difference for the growth parameters between the lines and N sources evaluated, indicating that under the soil conditions used, the utilization of strains SEMIA 5079 5080 in the inoculation of pigeon pea seeds, induces the same growth rate, dry mass and nitrogen accumulation than the strain SEMIA 6156, recommended for the pigeon pea. Depending on the environmental conditions, both inoculation with commercial rhizobia and nitrogen fertilization may have no effect on growth parameters and nitrogen accumulation in pigeon pea shoot, by favoring symbiosis with native rhizobia or the absorption of N from the soil at the expense of fixation.

Keywords: Cajanus cajan, inoculation, nitrogen, biological nitrogen fixation.

3.1. Introdução

O guandu possui desenvolvimento inicial geralmente lento, sendo observado tanto em cultivares comerciais como em linhagens selecionadas pela Embrapa Pecuária Sudeste (SANTOS et al., 1998; OLIVEIRA;

GODOY, 2021). Essa característica resulta em maturação mais tardia, e pode ser atribuída às dificuldades da planta jovem em assimilar os nutrientes requeridos para o seu crescimento.

Embora seja uma planta considerada promíscua, a simbiose com os rizóbios nativos do solo pode não ser suficiente para garantir uma fixação de nitrogênio eficiente. A inoculação surge como um estímulo para que a simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio ocorra mais rápido e de maneira eficiente, assegurando a oferta deste nutriente e garantindo maiores incrementos de biomassa nos estágios iniciais da planta, principalmente em solos de baixa fertilidade (HUNGRIA et al., 2007; CONCHA; DOERNER, 2020), onde o guandu é comumente utilizado, seja na forma de adubação verde ou recuperação de pastagens degradadas.

Para diversas leguminosas de importância agrícola, foram selecionadas estirpes específicas, baseadas em ensaios que buscaram a alta capacidade fixadora de nitrogênio e incrementos na produção. No Brasil, a principal instituição responsável pela manutenção e distribuição destas estirpes, recomendadas para uso comercial, é a Coleção SEMIA. Contudo, mesmo havendo rizóbios selecionados, nem todas estão facilmente disponíveis para o produtor, como é o caso das estirpes recomendadas para o guandu.

Diferente do guandu, os inoculantes com estirpes recomendadas para a cultura da soja possuem oferta menos limitada, sendo, muitas vezes utilizados na implantação de leguminosas forrageiras e adubação verde. O uso de inoculantes não específicos tem sido bastante questionado, pois mesmo apresentando bons índices de nodulação, a eficiência da fixação não é garantida (ZILLI et al., 2011).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da inoculação com rizóbios específicos, não específicos e fertilização nitrogenada no crescimento inicial de linhagens de guandu.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Características da área experimental

O experimento foi conduzido em área experimental da Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos, São Paulo (21°57'42"S, 47°50'28"W, e 860 m de altitude), no período de 25 de janeiro a 05 de março de 2019.

O clima do local é denominado subtropical do tipo Cwa, com inverno seco e verão quente, de acordo com a classificação de Köppen. Os dados climáticos, referentes a temperatura do ar e precipitação pluvial, do período experimental foram adquiridos na estação meteorológica da Embrapa Pecuária Sudeste e são descritos na Figura 01.

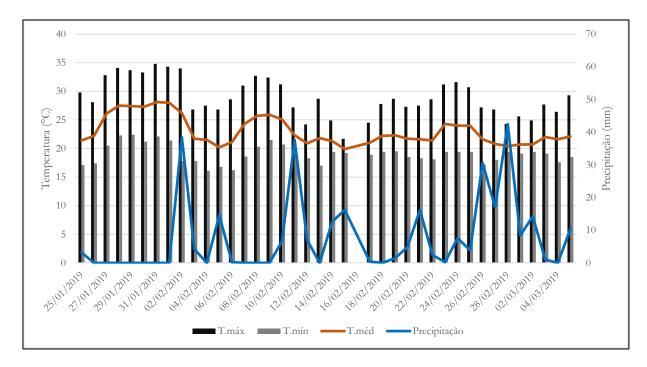


Figura 1. Dados de temperatura máxima (T.máx), mínima (T.mín) e média (T.méd) do ar e precipitação pluvial durante o período experimental.

O solo do local é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, com textura média conforme Embrapa (1999). Amostras de solo foram coletadas em novembro de 2018, a fim de verificar a necessidade de correção e adubação do solo. As amostras foram enviadas ao laboratório de Solos da Embrapa Pecuária Sudeste para análise química (Tabela 1).

Tabela 1. Análise química do solo na camada de 0 a 20 cm da área experimental.

pН	MO	P	K	Ca	Mg	H + A1	l A1	SB	СТС	V	m
CaCl2	g.dm³	mg.dm³			n	nmolcdm	1^3			9,	%
5,2	31	12	0,9	24	11	34	1	36	70	51	3

P calculado pelo método de extração com resina de troca iônica; SB = soma de bases; CTC = capacidade de troca catiônica; V = saturação por bases

O preparo de solo foi realizado de forma convencional no início do mês de janeiro, através de gradagem. Logo após, a área experimental foi demarcada com estacas de madeira, delimitando-se as parcelas experimentais (Figura 2).



Figura 2. Vista das parcelas experimentais

3.2.2. Tratamentos e delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente aleatorizado, com quatro repetições e esquema fatorial (2x4), envolvendo duas linhagens de guandu (*Cajanus cajan*) e quatro estratégias de aporte de nitrogênio. As duas linhagens foram g3-94 (BRS Mandarim) e g6-95, submetidas à inoculação com estirpe de *Bradyrhizobium spp.* SEMIA 6156, estirpe de *Bradyrhizobium spp.* SEMIA 5079 5080, adubação com 50 kg.ha-1 de N e testemunha (sem inoculação e adubação nitrogenada).

As parcelas experimentais possuíam uma área total de 8m², constituída de quatro linhas de 4 m espaçadas 0,5 m, e entre as parcelas foi adotado o espaçamento de 0,5 m. Para a área útil, foram consideradas as duas linhas centrais, excluindo-se as linhas da bordadura e mais 1,5 m das cabeceiras de cada parcela, resultando 1 m² de área útil.

3.2.3. Inoculação das sementes e semeadura

Foi realizada a determinação do peso de 100 sementes das duas linhagens utilizadas, resultando em 13 g para a linhagem G3-94 e 17 g para a linhagem G6-95. As sementes foram previamente tratadas com fungicida sistêmico e de contato do grupo químico Carboxina e Tiram (Vitavax Thiram 200 SC).

Foram utilizados dois inoculantes comerciais, sendo um aprovado como inoculante para guandu, composto pela estirpe SEMIA 6156 (*Bradyrhizobium spp.*), apresentado sob a forma de turfa e contendo, aproximadamente, 4,7.108 UFC.mL; e outro indicado para a cultura da soja, composto pelas estirpes SEMIA 5079 (*B. japonicum*) e 5080 (*B. diazoefficiens*), apresentado sob a forma líquida e contendo 5,0.109 UFC.mL.

As sementes foram desinfetadas e inoculadas conforme recomendações dos fabricantes, ou seja, na proporção de 400 mL por hectare do inoculante líquido (SEMIA 5079 5080) e 50 g do inoculante turfoso (SEMIA 6156) para 5 kg de sementes. Para aderência do inoculante turfoso, fez-se necessário o uso de solução açucarada

(açúcar comercial diluído em água destilada) na proporção de 100 mL para 10 kg de sementes. Em seguida, as sementes foram mantidas à sombra até o momento do plantio.

A adubação de fundação foi realizada de forma manual, sendo a quantidade de adubo aplicada equivalente a 200 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ e 160 kg.ha⁻¹ de K₂O, na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente

A semeadura também foi realizada manualmente em sulcos com profundidade de 3 a 4 centímetros, na densidade de 9 sementes por metro e espaçamento entre as linhas de 0,5 metros, totalizando aproximadamente 20 kg.ha⁻¹ de sementes de guandu, conforme as recomendações de plantio de Oliveira et al (2017).

A adubação nitrogenada de cobertura foi realizada utilizando-se uréia em quantidade equivalente a 50 kg.ha⁻¹ N. O adubo foi distribuído ao lado das linhas de guandu nas parcelas destinadas ao tratamento fertilizado.

As plantas da área útil da parcela foram colhidas aos 40 dias após emergência (DAE) para as avaliações.

3.2.4. Parâmetros de crescimento

3.2.4.1. Altura das plantas

A altura das plantas foi avaliada aos 40 dias após a emergência com o auxílio de uma régua, medindo da superfície do solo ao pecíolo da última folha formada. Foi adotado o valor da média de todas as plantas presentes na área útil da parcela.

3.2.4.2. Diâmetro do caule

O diâmetro do caule das plantas presentes na área útil da parcela foi avaliado aos 40 dias após a emergência com auxílio de um paquímetro, utilizando a marca dos pecíolos das folhas primárias como referência.

3.2.4.3. Índice de clorofila

O índice de clorofila foi avaliado aos 40 dias após a emergência com auxílio de um clorofilômetro modelo ClorofilLOG® CFL 1030. As leituras foram realizadas em quatro plantas tomadas ao acaso da área útil de cada parcela e o valor final da leitura foi obtido da média aritmética dos valores.

3.2.4.4. Massa seca da parte aérea

A massa seca foi determinada aos 40 dias após a emergência. Foram coletadas, rente ao solo, todas as plantas da área útil da parcela. A parte aérea foi acondicionada em sacos identificados e pesadas para determinação do peso verde. Após a pesagem, foram separados 500 g do material verde, acondicionados em sacos de papel identificados e colocados em estufa de circulação forçada ajustada a 60° C por 72 horas, para estimativa da porcentagem de matéria seca e determinação da massa seca total.

3.2.4.5. Relação folha:caule

Para obtenção da relação folha:caule, após a pesagem da massa verde, uma porção de aproximadamente 500 g do material foi reservada para separação das folhas (considerou-se o pecíolo e limbo foliar), com auxílio de tesouras. As folhas e caule foram acondicionados em sacos de papel identificados e colocados em estufa de circulação forçada ajustada a 60° C por 72 horas, para determinação do peso seco. Após pesados, foi feita a determinação da relação de folha e caule de cada tratamento.

3.2.4.6. Concentração de nitrogênio na parte aérea

O material vegetal foi previamente seco em estufa de circulação forçada ajustada a 60° C por 72 horas e depois moído a fino pó. A concentração de nitrogênio total foi determinada pelo método Microkjedahl e expresso em g.kg⁻¹ N na massa seca da parte aérea.

3.2.4.7. Eficiência relativa de fixação de nitrogênio

Para obtenção da eficiência relativa de uso de N realizou-se um cálculo adaptado da expressão proposta por Brockwell et al. (1966) e citado por Muniz et al. (2017):

$$Ef(\%) = \frac{N \ inoculado - N \ testemunha}{N \ adubado - N \ testemunha} \times 100$$

Sendo, Ef (%) = Eficiência relativa de absorção de N; N inoculado = Total de nitrogênio da parte aérea dos tratamentos inoculados; N testemunha = Total de nitrogênio da parte aérea do tratamento testemunha; N adubado = Total de nitrogênio da parte aérea dos tratamentos fertilizados. As classes de Ef(%) consideradas pelos autores na seleção de estirpes são: 0 a 20 (ineficiente), 21 a 40 (muito baixa), 41 a 60 (baixa), 61 a 80 (média), 81 a 100 (alta) e maiores que 100 (muito altas).

3.2.5. Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo programa R Studio versão 4.0.5. Todas as variáveis analisadas apresentaram homogeneidade de variância do resíduo. As médias foram comparadas ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Os coeficientes de correlação de Spearman foram calculados utilizando o pacote do programa R Studio, versão 4.0.5, determinando as associações significativas entre as variáveis discriminadas.

3.3. Resultados e Discussão

A partir da análise dos dados, observou-se que não houve interação entre as linhagens de guandu e aportes de nitrogênio sobre as variáveis em estudo. Com exceção do teor de nitrogênio da parte aérea, as demais variáveis não foram influenciadas pela linhagem, fontes de inoculação e adubação nitrogenada.

A altura de plantas e diâmetro de caule não diferiram entre as linhagens de guandu aos 40 DAE (Tabela 2). Esses resultados se opõem aos encontrados por Godoy et al. (2003), onde mesmo no período de florescimento, diferenças na altura de plantas e espessura de caule foram observadas entre a BRS Mandarim e linhagem g6-95.

Diversos estudos destacam a cultivar BRS Mandarim pela maior produção de matéria seca total e de folhas, quando comparada com outras cultivares e linhagens selecionadas (GODOY et al., 2005; FERNANDES et al., 2007; CARELLOS, 2013). No presente estudo, não houve diferença estatística entre as linhagens avaliadas para MSPA, MSF e MSC aos 40 DAE. Vale ressaltar que ambos os acessos foram selecionados para MSF, e embora a linhagem g6-95 tenha apresentado bons resultados agronômicos, não se destacou como a g3-94, lançada posteriormente como cultivar BRS Mandarim (GODOY et al., 1994; GODOY et al., 2005).

Tabela 2. Efeito das linhagens de guandu para altura (AP), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de folha (MSF), massa seca de caule (MSC) e relação folha:caule (RFC) aos 40 DAE.

Tratamentos	AP40 (cm)	DPA (mm)	MSPA (gramas)	MSF (gramas)	MSC (gramas)	RFC
BRS Mandarim	51	4,5	60	39	21	2,03
Linhagem g6-95	46	4,4	59	40	19	2,22
P-valor ¹	0,1779 ^{NS}	0,7875 ^{NS}	0,8987 ^{NS}	0,8889 ^{NS}	0,5396 ^{NS}	0,2796 ^{NS}
CV (%) ²	18,13	19,11	37,99	37,64	40,22	21,11

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05); ¹ CV = Coeficiente de variação; ² NS = diferença estatística não significativa.

O desenvolvimento inicial relativamente lento do guandu, embora vantajoso em cultivos integrados para produção de grãos e silagem, por resultar em períodos distintos de maior exploração dos recursos pelas espécies em consórcio (BARRETOS; FERNANDES, 2010; PARIZ et al., 2015; CIRÍACO, 2020), é tido como um dos principais desafios para sua adoção em sistemas pastoris. A utilização de inoculantes de rizóbios tem sido apontada como uma ferramenta para garantir um melhor estabelecimento de leguminosas (HUNGRIA et al., 2007; OLIVEIRA, et al., 2009; BRITO et al., 2011), e pode ser avaliado através de parâmetros de crescimento, como altura e massa seca dos componentes vegetais (SANTOS et al., 1998). Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas para estes parâmetros (AP, DAP, MSPA, MSF e MSC), nos aportes de nitrogênio avaliados (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do aporte de nitrogênio para altura (AP), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa
seca de folha (MSF), massa seca de caule (MSC) e relação folha:caule (RFC) aos 40 DAE.

Tratamentos	AP40 (cm)	DPA (mm)	MSPA (gramas)	MSF (gramas)	MSC (gramas)	RFC
SEMIA 5079 5080	44	4,0	55	37	17	2,26
SEMIA 6156	52	5, 0	71	46	26	1,81
50 kg.ha ⁻¹	46	4,4	44	3 0	14	2,31
Testemunha	51	4,5	69	46	23	2,10
P-valor ¹	0,2675 ^{NS}	0,3676 ^{NS}	0,1052 ^{NS}	0,1482 ^{NS}	0,0590 ^{NS}	0,1915 ^{NS}
CV (%) ²	18,13	19,11	37,99	37,64	40,22	21,11

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05); ¹CV = Coeficiente de variação; ²NS = diferença estatística não significativa.

A ausência de efeito significativo, principalmente entre o tratamento testemunha (não adubado ou inoculado), pode ser atribuída ao fato das plantas terem absorvido o nitrogênio de fontes alternativas à fixação biológica pelas estires inoculadas, como N-orgânico presente no solo ou FBN pela simbiose com rizóbios nativos. Embora nem sempre a população nativa seja capaz de estabelecer simbiose eficiente com o hospedeiro cultivado, é possível que haja ocupação dos sítios de infecção, influenciando a fixação de N² (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Resultados semelhantes de MSPA e NPA foram obtidos por Oliveira et al. (2009), para a cultivar BRS Mandarim inoculada com estirpes SEMIA 6156 e SEMIA 6157 em relação aos tratamentos adubado com 50 kg.ha⁻¹ N e testemunha, tanto cultivados em solo autoclavado como natural.

Ao avaliarem o uso de inoculantes aprovados para cultura da soja (SEMIA 5019) em guandu-anão sob condições de campo, Rufini et al. (2014) não encontraram diferenças para características morfológicas, nodulação e acúmulo de N na parte aérea. Contudo, no ensaio em casa de vegetação, utilizando solo natural, valores superiores de N na parte aérea foram observados no tratamento com adubação nitrogenada.

O teor de nitrogênio foi diferente entre as linhagens estudadas (Tabela 4), apresentando maior valor na linhagem g6-95. Segundo Godoy et al. (1994), na avaliação de germoplasma de guandu, a seleção de acessos para o critério NPA é bastante desafiadora, devido à grande influência do ambiente, gerando variação conforme o local do ensaio.

Tabela 4. Efeito das linhagens de guandu e aporte de nitrogênio para índice de clorofila (CLO), teor de nitrogênio na parte	aérea
(NPA), eficiência relativa (ER).	

Tratamentos	CLO (Falker)	NPA (g.kg ⁻¹)	ER (%)
BRS Mandarim Linhagem g6 95	389 398	23 b 28 a	94 95
P-valor ¹	0,4502 ^{NS}	0,0004	0,7565 ^{NS}
SEMIA 5079 5080	398	27	98
SEMIA 6156	380	26	96
50 kg.ha ⁻¹	398	27	100
Testemunha	398	24	84
P-valor ¹	0,6743 ^{NS}	0,1043 ^{NS}	0,0810 ^{NS}
CV (%) ²	8,18	12,49	12, 07

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05); ¹CV = Coeficiente de variação; ²NS = diferença estatística não significativa.

Os aportes de nitrogênio e linhagens avaliadas obtiveram altos índices de eficiência relativa, em relação ao tratamento com adubação nitrogenada. Não houve diferença entre a cultivar BRS Mandarim e a linhagem g6-95 para esta variável, indicando que para ambas as linhagens as fontes de inoculação podem ser consideradas equivalentes à adubação nitrogenada, na dose de 50 kg.ha-1 de N, no que diz respeito à absorção de nitrogênio. Esta equivalência entre os aportes de nitrogênio avaliados, também pode ser observada pela ausência de efeito significativo nos teores de N da parte aérea e índices de clorofila (Tabela 04).

A análise de correlação de Pearson (Figura 3) mostrou coeficientes significativos para os parâmetros de crescimento. A AP apresentou correlação altamente positiva com DPA (0,91), e ambas com MSPA com coeficientes de 0,67 e 0,65, respectivamente. Embora plantas relativamente baixas (em torno de 50 cm de altura) facilitem o consumo animal e operações de corte, elas estão associadas às características de menor longevidade (GODOY; SANTOS, 2011), o que é uma desvantagem, do ponto de vista forrageiro. Godoy et al. (2003), descreveram para as linhagens utilizadas neste estudo, alturas entre 155 e 195 cm com 50% de plantas em florescimento. Aliada a esses atributos, a cultivar BRS Mandarim apresenta características agronômicas que a tornam uma promissora leguminosa forrageira em diferentes condições de fertilidade de solo (GODOY et al., 2003; FERNANDES et al., 2007; COSTA et al., 2016).

Houve correlação negativa entre a relação folha:colmo e as variáveis AP, DAP e MSPA, com coeficientes significativos de -0,67, -0,73 e -0,67, respectivamente. Este resultado elucida a influência da proporção de hastes da planta na composição da MSPA aos 40 DAE. Avaliando a cultivar BRS Mandarim, Oliveira et al. (2009) obtiveram valores médios de 3,2 g para relação caule:folha aos 35 DAE.

O índice de clorofila foi positivamente correlacionada com ER (0,36) e NPA (0,39), corroborando com as afirmações de Rajcan et al. (1999), sobre a forte correlação entre a concentração de N, de clorofila e leituras de clorofila, e atestando as observações feitas do presente estudo quanto a absorção e acúmulo de nitrogênio. Considerando a correlação positiva com AP (0,31) e DPA (0,27), mesmo baixa, indicam a importância do teor de clorofila, e consequentemente da taxa fotossintética no crescimento das plantas.

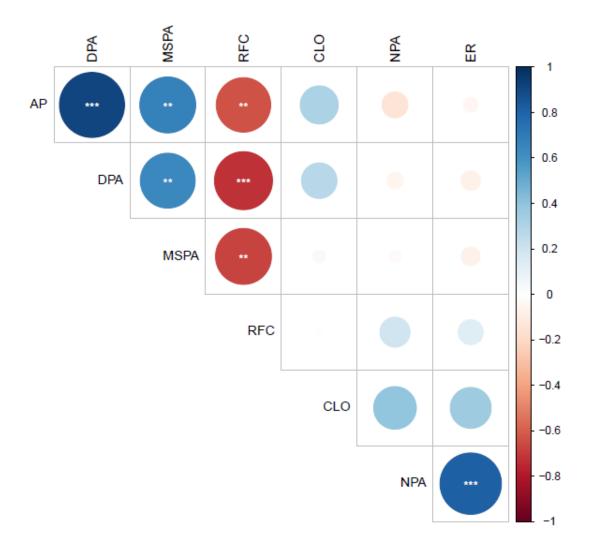


Figura 3. Análise de correlação de Pearson das variáveis altura de plantas (AP), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), relação folha:caule (RFC), índice de clorofila (CLO), N total da parte aérea (NPA) e eficiência relativa (ER). A intensidade da cor e o tamanho dos círculos representam a força da correlação. As cores azuis referem-se à correlação positiva e as cores vermelhas representam correlação negativa. (**) significativo a 1%; (***) significativo a 5%.

3.4. Conclusões

A inoculação de sementes com estirpes SEMIA 5079 5080 proporciona o desenvolvimento inicial do guandu equivalente à inoculação com rizóbio selecionado (SEMIA 6156) ou fertilização nitrogenada, sob as condições de campo estudadas;

A inoculação com rizóbios possibilita altos índices de eficiência na absorção de nitrogênio pelas plantas.

Referências

BARRETO, A.C.; FERNANDES, M.F. Cultivo de milho consorciado com guandu em sistema de plantio direto em solos dos Tabuleiros Costeiros. Aracaju: EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 2010. 6p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 61).

- BRITO, M.M.P.; MURAOKA, T.; SILVA, E.C.da. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. Bragantia, Campinas, v. 70, n. 1, p.206-15, 2011.
- CARELLOS, D.C. Avaliação de cultivares de feijão-guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) para produção de forragem no período seco em São João Evangelista MG. 2013. 114p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- CIRÍACO, A.da.P. Produtividade do milho e de forrageiras leguminosas e qualidade e produtividade do capim-marandu cultivados em sistema de integração lavoura-pecuária. 2020. 97p. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2020.
- CONCHA, C.; DOERNER, P. The impact of the rhizobia-legume symbiosis on host root system architecture. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 13, p. 3902-21, 2020.
- COSTA, N.L.; PAULINO, V.T.; MAGALHÃES, J.A.; RODRIGUES, B.H.N.; SANTOS, F.J.S. Eficiência do nitrogênio, produção de forragem e morfogênese do capim-massai sob adubação. **Nucleus**, v. 13, n. 2, p. 31-40, 2016.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPS, 1999. 412p.
- FERNANDES, F.D.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, A.K.B.; AMABILE, R.F.; BARCELLOS, A.O.; GODOY, R.; LÉDO, F.J.S. **Potencial forrageiro de linhagens puras selecionadas de guandu**. Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2007. 14p. (EMBRAPA. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 192).
- FERNANDES, F.D.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, A.K.B.; AMABILE, R.F.; BARCELLOS, A.O.; GODOY, R.; LÉDO, F.J.S. **Potencial forrageiro de linhagens puras selecionadas de guandu**. Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2007. 14p. (EMBRAPA. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 192).
- GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; NEGREIROS, G.F. Avaliação agronômica e seleção de germoplasma de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 23, n. 5, p. 730-42, 1994.
- GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; SANTOS, P.M.; SOUZA, F.H.D. Avaliação agronômica de linhagens selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, n. 1, p. 7-19, 2005.
- GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; SOUZA, F.H.D.; PRIMAVESI, A.C. Caracterização de linhagens puras selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 546-55, 2003.
- GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; SOUZA, F.H.D.; PRIMAVESI, A.C. Caracterização de linhagens puras selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 546-55, 2003.
- GODOY, R.; SANTOS, P.M. Guandu. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Ed.) **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, 2011. p. 294-309.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: EMBRAPA SOJA: EMBRAPA CERRADOS, 2007. 80p. (EMBRAPA. Documentos, 283).
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. (2 ed.) Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- MUNIZ, A.W.; COSTA, M.D.; SÁ, E.L.S.de.; FIUZA, A.B.; BROSE, E. Symbiotic efficiency of pea (*Pisum sativum*) rhizobia association under field conditions. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 32, p. 2582-85, 2017.

- OLIVEIRA, B.A.; GODOY, R. Seleção de linhagens de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) de melhor desenvolvimento inicial e possíveis aplicações práticas. São Carlos: EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE, 2021. 7p. (EMBRAPA. Comunicado Técnico, 108).
- OLIVEIRA, P.P.A.; MATTA, F.P.; GODOY, R. Consorciação com guandu na recuperação de pastagens degradadas, uma tecnologia de duplo propósito: adubação verde e pastejo consorciado diferido. São Carlos: EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE, 2017. 6p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 75).
- OLIVEIRA, P.P.A.; SCHAER, A.B.; ASCÊNCIO, F.; GODOY, R.; TSAI, S.M. Fixação biológica de nitrogênio em guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp cv. BRS Mandarim) inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Na presença ou ausência de tratamento com fungicida. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46, 2009, Maringá. **Anais...** Maringá, PR: SBZ. 2009. 3p.
- PARIZ, C.M.; COSTA, C.; CRUSCIOL, C.A.C.; LONGHINI, V.Z.; PROTES, V.M.; CASTILHOS, A.M. Consórcio de milho com capim-marandu e feijão-guandu colhidos para ensilagem em sistema de integração lavoura-pecuária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO: o solo e suas múltiplas funções, 35, 2015, Natal. **Anais...** Natal, RN: SBCS. 2015. 4p.
- RAJCAN, I.; DWYER, L.M.; TOLLENAAR, M. Note on relationship between leaf soluble carbohydrate and chlorophyll concentrations in maize during leaf senescence. **Field Crops Research**, v. 63, p. 13-7, 1999.
- RUFINI, M.; OLIVEIRA, D.P.; TROCHMANN, A.; SOARES, B.L.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com guandu-anão em casa de vegetação e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 3, p. 197-206, 2014.
- SANTOS, D.M.M.; RODRIGUES, T.J.D.; BANZATTO, D.A. Desenvolvimento inicial da parte aérea e do sistema radicular do guandu, *Cajanus cajan* (L.) Millsp. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n.3, p. 523-30, 1998.
- SANTOS, D.M.M.; RODRIGUES, T.J.D.; BANZATTO, D.A. Desenvolvimento inicial da parte aérea e do sistema radicular do guandu, *Cajanus cajan* (L.) Millsp. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n.3, p. 523-30, 1998.
- ZILLI, J.E.; NETO, M.L.S.; JÚNIOR, I.F.; PERIN, L.; MELO, A.R.de. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 739-42, 2011.

4. ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS DE GUANDU SOB APORTES DE NITROGÊNIO BIOLÓGICO E MINERAL E SUA INFLUÊNCIA SOBRE COMUNIDADES MICROBIANAS RIZOSFÉRICAS

RESUMO

O consórcio de leguminosas, como o guandu, com gramíneas forrageiras é uma alternativa para recuperar pastagens degradadas. O destaque dessas plantas é atribuído, principalmente, ao aporte de nitrogênio via fixação biológica e às melhorias na qualidade do solo, favorecendo a ciclagem de nutrientes. Mas nem sempre essa simbiose ocorre de maneira eficiente, sendo necessária a utilização de estratégias como inoculação ou fertilização nitrogenada para garantia dos processos biológicos e produção de biomassa. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de aportes de nitrogênio biológico, via inoculação específica e não específica, e nitrogênio mineral, com pequenas e altas doses, no estabelecimento do guandu e suas relações com as comunidades microbianas do solo rizosférico. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos/SP), utilizando-se delineamento em blocos aleatorizados. Os tratamentos foram representados pelas linhagens de guandu g6-95 e g3-94 (BRS Mandarim), submetidos à inoculação de sementes com a estirpe SEMIA 6156; SEMIA 5079 5080; aplicação de 10 kg.ha-1 N combinada aos inoculantes; fertilização nitrogenada na dose de 50 kg.ha-1 N; e tratamento testemunha. As plantas foram colhidas e avaliadas aos 90 dias após emergência. Os resultados demonstraram que a cultivar BRS Mandarim, apresentou maior nodulação que a linhagem g6-95, no entanto se mostrou menos eficiente na absorção de N, o que pode estar relacionado aos diferentes padrões de exsudação radicular e interações com microbiota do solo rizosférico. A inoculação com estirpes SEMIA 5079 5080 se mostrou equivalente à estirpe SEMIA 6156 nos parâmetros de crescimento, acúmulo de massa seca e nitrogênio da parte aérea e nodulação. A aplicação de 10 kg.ha⁻¹ N no estabelecimento de guandu resultou em maior produção de massa seca e melhorou os teores de N da parte aérea nas plantas inoculadas. O guandu apresentou baixa especificidade, resultando em índices de eficiência simbiótica elevada mesmo em solos sem inoculação.

Palavras-chave: Cajanus cajan, inoculação, fixação biológica de nitrogênio, adubação nitrogenada.

ABSTRACT

Intercropping legumes, such as pigeon pea, with forage grasses is an alternative to recovering degraded pastures. The highlight of these plants is mainly attributed to the supply of nitrogen by biological fixation and improvements in soil quality, favoring nutrient cycling. But this symbiosis does not always occur efficiently, requiring the use of strategies such as inoculation or nitrogen fertilization to assurance biological processes and biomass production. The objective of this study was to evaluate the influence of biological nitrogen inputs, by inoculation with specific and non-specific strains, and mineral nitrogen, with small and high rates, on the initial development of pigeon pea and its relationships with microbial communities in the rhizospheric soil. The experiment was conducted in a greenhouse at Embrapa South-East Cattle Research Center (São Carlos, SP, Brazil), using a randomized block design, arranged in 2x6 factorial outline. The treatments were represented by the pigeon pea lines g6-95 and g3-94 (BRS Mandarim), submitted to inoculation seeds with the strain Bradyrhizobium SEMIA 6156; strain Bradyrhizobium SEMIA 5079 5080; application of 10 kg.ha-1 N combined with inoculants; nitrogen fertilization at a rate of 50 kg.ha-1 N; and control treatment. Plants were harvested and evaluated 90 days after emergence. The results showed that the BRS Mandarim presented greater nodulation than the g6-95 line, however it was less efficient in N uptake, which may be related to the different patterns of root exudation and interactions with rhizospheric soil organisms. Inoculation with strains SEMIA 5079 5080 was equivalent to strain SEMIA 6156 in terms of growth, dry mass production, shoot nitrogen accumulation and nodulation. The application of 10 kg.ha-1 N in pigeonpea establishment resulted in higher dry mass production and improved shoot N

contents in inoculated plants. Pigeon pea had low specificity, resulting in high symbiotic efficiency indices even in soils without inoculation.

Keywords: Cajanus cajan, biological nitrogen fixation, nitrogen fertilization.

4.1. Introdução

A taxa de fixação biológica de nitrogênio é influenciada por diversos fatores ambientais, que determinam as respostas da planta hospedeira, dos micro-organismos diazotróficos e a interação entre ambos. Dentre os fatores considerados limitantes para este processo biológico pode-se citar os fatores climáticos, como temperatura e umidade, fatores do solo, como acidez, deficiência de nutrientes e metais pesados, população de rizóbios nativos, e disponibilidade de N-mineral (FRANCO; NEVES, 1992; CASSETARI, et al., 2016).

Uma das formas de garantir a eficiência do processo de fixação de N_2 é a utilização de inoculantes, uma vez que contém as bactérias específicas para este processo biológico. Contudo, garantir que a rizosfera seja ocupada por micro-organismos selecionados pode não ser suficiente para que ocorra uma simbiose eficiente.

A disponibilidade de nitrogênio no solo pode modular a comunidade microbiana, o desenvolvimento da planta hospedeira e seus padrões de exsudação radicular (LI et al., 2019). O excesso de N-mineral na solução do solo afeta a nodulação por esta ocorrer em resposta às demandas nutricionais da planta. Já em algumas espécies leguminosas, pequenas doses de N-mineral podem ser benéficas para o processo simbiótico, devido ao estímulo na fase inicial de desenvolvimento da planta e maior suprimento de energia para as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; ZHOU et al., 2006).

Com isso, a aplicação de pequenas doses de nitrogênio tem sido uma opção para otimizar os efeitos da inoculação com rizóbios, favorecendo o desenvolvimento das plantas, em especial do sistema radicular, e melhorando as condições para processo simbiótico (TSAI et al., 1993; SOARES et al., 2016).

Tanto a incorporação de N via fixação biológica como aplicação via fertilizantes nitrogenados afetam a comunidade microbiana rizosférica, principalmente aquelas relacionadas ao ciclo do nitrogênio (FAN et al., 2011), indicando efeito direto na ciclagem deste nutriente no ambiente em que a leguminosa se encontra. Os genes envolvidos na etapa de nitrificação, etapa em que o amônio é oxidado a nitrato, tem importante papel na disponibilidade do nitrogênio assimilado e introduzido no sistema (WANG et al., 2018).

Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar as características relacionadas ao desenvolvimento vegetativo de duas linhagens de guandu sob influência de inoculação com rizóbios específicos, não específicos e doses de adubação nitrogenada, e seus efeitos sobre a abundância de micro-organismos rizosféricos.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Local do experimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos, São Paulo, no período de 09 de fevereiro a 8 de maio de 2020.

Foram utilizados vasos plásticos preenchidos com solo previamente destorroado, homogeneizado e peneirado (4 mm). O solo foi coletado na Embrapa Pecuária Sudeste, em área formada por pastagem (*Brachiaria ssp.*), em via de degradação.

O solo coletado é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, com textura média conforme Embrapa (1999). Amostras de solo foram coletadas, a fim de verificar a necessidade de correção e adubação do solo. As amostras foram enviadas ao laboratório de Solos da Embrapa Pecuária Sudeste para análise química (Tabela 5). Os teores de areia, argila e silte foram equivalentes a 70,9; 20,8 e 8,3%, respectivamente.

Tabela 5. Análise química do solo utilizado nas parcelas experimentais.

pH	МО	_ P	K	Ca	Mg	H + A1	Al	SB	CTC	V	m
CaCl2	g.dm³	mg.dm³			m	ımolc.dm	3			9,	/ 0
4,2	9	3	0,9	5	2	40	4	8	48	16	34

P calculado pelo método de extração com resina de troca iônica; SB = soma de bases; CTC = capacidade de troca catiônica; V = saturação por bases

A calagem foi realizada aplicando-se calcário dolomítico (PRNT 95%), visando elevar a saturação por bases para 70%. O calcário foi aplicado 30 dias antes do plantio, mantendo-se a umidade do solo para que ocorresse a reação. Todos os tratamentos, incluindo os tratamentos testemunhas sem plantas, receberam adubação fosfatada na dose de 120 kg.ha⁻¹ de P₂O₅, tendo como fonte superfosfato simples, e potássica na dose de 40 kg.ha⁻¹ de K₂O, tendo como fonte cloreto de potássio, além da adubação com micronutrientes na dose de 30 kg.ha⁻¹ de FTE BR12 (RAIJ et al., 1997; OLIVEIRA, et al., 2017).

Cada vaso teve o fundo revestido com manta permeável, sendo preenchido com 7,0 kg de solo seco e adubado posteriormente. Os vasos foram irrigados diariamente durante todo período experimental.

4.2.2. Tratamentos e delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos aleatorizados, com quatro repetições e esquema fatorial (2 x 6), envolvendo duas linhagens de guandu (*Cajanus cajan*) e seis estratégias de aporte de nitrogênio. As duas linhagens foram G5-94 (BRS Mandarim) e G6-95, submetidas à inoculação com estirpe de *Bradyrhizobium spp.* SEMIA 6156, estirpe de *Bradyrhizobium spp.* SEMIA 5079 5080, estirpe de *Bradyrhizobium spp.* SEMIA 6156 + dose starter N de 10 kg.ha-1 N, estirpe de *Bradyrhizobium spp.* SEMIA 5079 5080 + dose starter N de 10 kg.ha-1 N, testemunha adubada com 50 kg.ha-1 N e testemunha absoluta (sem inoculação e adubação nitrogenada). Foram adicionados dois tratamentos testemunhas sem plantas, com e sem dose starter de 10 kg.ha-1 N, para comparação da comunidade de micro-organismos amônio-oxidantes do solo de origem. (Figura 4)



Figura 4. Vista das parcelas experimentais

4.2.3. Inoculação das sementes e semeadura

Foram utilizados dois inoculantes comerciais, sendo um aprovado como inoculante para guandu, composto pela estirpe SEMIA 6156 (*Bradyrhizobium spp.*), apresentado sob a forma de turfa e contendo, aproximadamente, 4,7.108 UFC/mL; e outro indicado para a cultura da soja, composto pelas estirpes SEMIA 5079 (*B. japonicum*) e 5080 (*B. diazoefficiens*), apresentado sob a forma líquida e contendo 5,0.109 UFC/mL.

As sementes foram desinfetadas e inoculadas conforme recomendações dos fabricantes, ou seja, na proporção de 400 mL por hectare do inoculante líquido (SEMIA 5079 5080) e 50 g do inoculante turfoso (SEMIA 6156) para 5 kg de sementes. Para aderência do inoculante turfoso, fez-se necessário o uso de solução açucarada (açúcar comercial diluído em água destilada) na proporção de 100 mL para 10 kg de sementes. Em seguida, as sementes foram mantidas à sombra até o momento do plantio.

A semeadura foi realizada com profundidade de 3 a 4 centímetros, na densidade de 5 sementes por vaso, conforme as recomendações de plantio de Oliveira et al (2009). As sementes foram previamente tratadas com fungicida sistêmico e de contato do grupo químico Carboxina e Tiram (Vitavax Thiram 200 SC).

Aos 15 dias após o plantio foi realizado um desbaste, deixando-se três plantas por vaso. No pós-desbaste foi feita a adubação nitrogenada, nos tratamentos com 10 e 50 kg.ha⁻¹ N, utilizando-se solução nitrogenada a base de uréia.

As plantas foram colhidas aos 90 dias após emergência, período em que aproximadamente 50% dos indivíduos apresentavam pré-florescimento.

4.2.4. Parâmetros de crescimento e nodulação

4.2.4.1. Altura das plantas

A altura das plantas foi avaliada aos 35 e 90 dias após a emergência com o auxílio de uma régua, medindo da superfície do solo à extensão da última folha. Foi adotado o valor da média de todas as plantas presentes na parcela.

4.2.4.2. Diâmetro do caule

O diâmetro do caule das plantas foi avaliado aos 90 dias após a emergência com auxílio de um paquímetro, utilizando a marca das bainhas das folhas primárias como referência.

4.2.4.3. Massa seca da parte aérea

A massa seca foi determinada aos 90 dias após a emergência. Foram coletadas, rente ao solo, todas as plantas do vaso. A parte aérea foi acondicionada em sacos de papel identificados e pesados para determinação do peso verde. Após a pesagem, o material foi levado a estufa de circulação forçada ajustada a 60° C por 72 horas, para determinação da massa seca total.

4.2.4.4. Volume de raízes

Depois de coletada a parte aérea das plantas, realizou-se a lavagem das raízes com auxílio de jatos de água e peneira de 2 mm, que tinham o objetivo de retirar o solo e evitar perdas de raízes pequenas e nódulos no momento da lavagem.

Após a lavagem e separação dos nódulos, as raízes foram inseridas em uma proveta de 1000 mL com volume de água conhecido, para determinação do volume de raízes a partir do deslocamento de água em proveta.

4.2.4.5. Massa seca das raízes

Após a lavagem, separação dos nódulos e determinação do volume, as raízes foram acondicionadas em sacos de papel identificados e levadas a estufa de circulação forçada ajustada a 60° C por 72 horas e pesadas, para determinação da massa seca.

4.2.4.6. Número, massa seca total e peso médio individual dos nódulos

Os nódulos foram coletados após a lavagem das raízes, contados e levados para secagem em estufa de circulação forçada ajustada a 60° C por 72 horas e pesados, para determinação da massa seca. O tamanho médio dos nódulos foi obtido através do número e massa seca de nódulos.

4.2.4.7. Índice de clorofila

O índice de clorofila foi avaliado aos 40 dias após a emergência com auxílio de um clorofilômetro modelo ClorofilLOG® CFL 1030. As leituras foram realizadas em quatro plantas tomadas ao acaso da área útil de cada parcela e o valor final da leitura foi obtido da média aritmética dos valores.

4.2.4.8. Concentração de nitrogênio na parte aérea

O material vegetal foi previamente seco em estufa de circulação forçada ajustada a 60° C por 72 horas e depois moído a fino pó. A concentração de nitrogênio total foi determinada pelo método Microkjedahl e expresso em g.kg⁻¹ N na massa seca da parte aérea.

4.2.4.9. Eficiência relativa de fixação de nitrogênio

Para obtenção da eficiência relativa de uso de N realizou-se um cálculo adaptado da expressão proposta por Brockwell et al. (1966) e citado por Muniz et al. (2017):

$$Ef(\%) = \frac{N \ inoculado - N \ testemunha}{N \ adubado - N \ testemunha} \times 100$$

Sendo, Ef (%) = Eficiência relativa de absorção de N; N inoculado = Total de nitrogênio da parte aérea das plantas dos tratamentos inoculados; N testemunha = Total de nitrogênio da parte aérea das plantas do tratamento testemunha; N adubado = Total de nitrogênio da parte aérea das plantas dos tratamentos fertilizados. As classes de Ef(%) consideradas pelos autores na seleção de estirpes são: 0 a 20 (ineficiente), 21 a 40 (muito baixa), 41 a 60 (baixa), 61 a 80 (média), 81 a 100 (alta) e maiores que 100 (muito altas).

4.2.5. Extração e quantificação do DNA total das amostras de solo

O DNA total do solo foi extraído com o E.Z.N.A Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek), de acordo com o protocolo do fabricante. A qualidade das amostras de DNA foi inicialmente conferida em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em TSB (do inglês Sodium Borate Buffer) (BRODY; KERN, 2004). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e foto-documentado. A qualidade e quantidade das

amostras também foram analisadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 260 nm. O DNA total extraído das amostras foi armazenado a -20°C.

4.2.6. PCR quantitativo em tempo real

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi realizada para quantificar os genes 16S rRNA de Archaea,16S rRNA de Bacteria, AmoA de Bacteria e AmoA de Archaea a partir das amostras de DNA total. Para cada gene, foram construídas curvas padrão entre 10 e 1010 cópias, obtidas previamente pela técnica de PCR a partir de isolados do DSMZ (do alemão Deutsche Sammlung von Mikroorganismenund Zell kulturen). A técnica foi realizada em triplicata para cada amostra no equipamento StepOne Plus (AppliedBiosystems), com um volume final de 10 μL, contendo 5 μL do SYBR Green ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific), 1 μL de cada primer (5 pmols), 0,2 μL de BSA (Thermo Fisher Scientific), 1 μL de DNA e 1,8 μL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. Os primers e as condições das reações são apresentadas na Tabela 6.

4.2.7. Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo programa R Studio versão 4.0.5. Todas as variáveis analisadas apresentaram homogeneidade de variância do resíduo. As médias foram comparadas ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Os coeficientes de correlação de Spearman foram calculados utilizando o pacote do programa R Studio, versão 4.0.5, determinando as associações significativas entre as variáveis discriminadas.

Tabela 6. Descrição de primers, DNA padrão e condições de amplificação utilizadas nas análises de qPCR

Gene	Código DSMZ*	Primers	Sequencias (5'-3')	Fragmento (pb)	Referência	Condições de amplificação
16s rRNA de Bacteria	e 17167	Eub 338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	180	Bakke et al. (2011)	95°C-10 min; 40 ciclos, 95°C-40s, 54°C-40s, 72°C-
. <u>.</u>		Eub 518r	ATTACCGCGGGCTGCTGG			40s; 95°C-15s, 54°C- 1min,95°C-15s
16s rRNA de Archaea	e DNA Ambiental	519f	CAGCCGCCGCGGTTA	397	Collen et al.(2004),	95°C-10 min; 40 ciclos, 95°C-30s, 57°C-30s, 72°C-
		915r	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT		Stahl and Amann (1991)	50s; 95°C-15s, 57°C- 1min,95°C-15s
amoA de Bacteria	28437	amoB 1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	Rotthauwe et al.	95°C-10 min; 40 ciclos, 95°C-345s, 60°C-45s, 72°C-
		amoB 1R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		(1997)	45s; 95°C-15s, 60°C- 1min,95°C-15s
amoA de Archaea	DNA Ambiental	amoA 1F	STAATGGTCTGGCTTAGACG	635	Francis et al (2005)	95°C-10 min; 40 ciclos, 95°C-40s, 60°C-45s, 56°C-
	an		GCGGCCATCCATATGTATGT		,	30s; 95°C-15s, 56°C- 1min,95°C-15s

^{*}Código de referência do catálogo de isolados do DSMZ utilizados para a construção da curva padrão utilizadas na análise de qPCR.

4.3. Resultados e Discussão

As análises estatísticas demonstraram que não houve interação das linhagens de guandu com os aportes de nitrogênio sobre as variáveis-resposta. As diferenças entre a cultivar BRS Mandarim e linhagem g6-95 foram obtidas apenas nos parâmetros de nodulação (número de nódulos e peso médio de nódulos), na eficiência relativa de absorção de nitrogênio (ER) e nas comunidades microbianas de arquéias amônio oxidantes (AOA) e bactérias totais (BAC). Já os aportes de nitrogênio influenciaram características produtivas e de nodulação, além de modular a comunidade de bactérias amônio oxidantes (AOB) no solo.

4.3.1. Efeito das linhagens e aportes de N sobre as características agronômicas e de nodulação de guandu

A ausência de efeito significativo entre as linhagens para os parâmetros de crescimento era esperada, conforme os resultados obtidos neste estudo em condições de campo (Tabela 7). Aos 90 DAE a linhagem g6-95 já apresentava florescimento, corroborando com Godoy et al. (2003), que observaram início do ciclo reprodutivo aos 93 DAE, indicando precocidade desta linhagem em relação a cultivar BRS Mandarim.

Tabela 7. Efeito das linhagens de guandu para altura aos 35 e 90 DAE (AP30 e AP90), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e volume de raiz (VOL) aos 90 DAE.

Tratamentos	AP35 (cm)	AP90 (cm)	DPA (mm)	MSPA (g.planta ⁻¹)	MSR (g.planta ⁻¹)	VOR (cm³.planta ⁻¹)
BRS Mandarim	46	106	5,7	39,0	18,6	71
Linhagem g6-95	46	104	5,6	38,8	16,9	67
P-valor ¹	0,808 ^{NS}	0,3034 ^{NS}	0,8601 ^{NS}	0,8229 ^{NS}	0,3097 ^{NS}	0,4542 ^{NS}
CV (%) ²	9,82	5,45	6,27	10,02	32,43	30,22

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05); ¹ CV = coeficiente de variação; ² NS = diferença estatística não significativa.

Os diferentes aportes de nitrogênio utilizados no presente estudo, influenciaram a altura das plantas e a produção de massa seca da parte aérea aos 90 DAE (Tabela 8). Houve efeito da aplicação de 10 kg.ha⁻¹ N-mineral nos tratamentos inoculados com estirpes SEMIA 5079 5080, resultado em menor altura quando comparado ao tratamento sem aplicação do fertilizante nitrogenado. O mesmo efeito não foi observado nos tratamentos submetidos à inoculação com SEMIA 6156, onde ambos apresentaram valores intermediários. As menores alturas foram obtidas no tratamento com 50 kg.ha⁻¹ N-mineral.

Com relação a produção de MSPA, as plantas inoculadas com rizóbios SEMIA 6156 e dose estimulante de 10 kg.ha-1 N-mineral tiveram produção equivalente às plantas que receberam 50 kg.ha-1 de N. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças entre si e foram inferiores ao tratamento que recebeu apenas a adubação nitrogenada

Tabela 8. Efeito do aporte de nitrogênio para altura aos 35 e 90 DAE (AP30 e AP90), diâmetro de caule (DPA), massa seca da
parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e volume de raiz (VOL) aos 90 DAE.

Tratamentos	AP35 (cm)	AP90 (cm)	DPA (mm)	MSPA (g.planta ⁻¹)	MSR (g.planta ⁻¹)	VOR (cm ³ .planta ⁻¹)
SEMIA 5079 5080	50	106 a	5,5	36,9 b	21,0	77
SEMIA 6156	53	105 ab	5,7	37,5 b	19,1	66
SEMIA 5079 5080 + N	46	104 b	5,5	37,8 b	15,5	68
SEMIA 6156 + N	46	106 ab	5,6	40,7 ab	17,9	66
50 kg.ha ⁻¹	53	98 c	5,9	43,4 a	16,7	75
Testemunha	47	111 a	5,6	37,9 b	16,3	62
P-valor ¹	0,5721 ^{NS}	0,0028	0,1888 ^{NS}	0,0112	0,4403 ^{NS}	0,7000 ^{NS}
CV (%) ²	9,82	5,45	6,27	10,02	32,43	30,22

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05); ¹ CV = coeficiente de variação; ² NS = diferença estatística não significativa.

Um experimento para avaliar o efeito da inoculação com rizóbios específicos e da adubação nitrogenada na cultivar BRS Mandarim foi conduzido por Oliveira et al. (2009). Contudo, não foram observadas diferenças significativas na MSPA em função dos tratamentos. No presente estudo, a inoculação com rizóbio específico para cultura do guandu só equivaleu a adubação nitrogenada exclusiva quando realizada em conjunto com a pequena dosagem de N-mineral. Os benefícios da aplicação inicial de pequenas doses de nitrogênio na produção de leguminosas são relatados por Li et al. (2019) e Soares et al. (2016). Outros autores sugerem que, havendo condições de solo e da planta para plena simbiose, esta adubação inicial com pequenas doses de N pode ser dispensável, por não resultar em incrementos no crescimento vegetativo (BRITO et al., 2011).

A utilização de inoculante com estirpes selecionadas para cultura da soja não diferiu, em termos de produção de MSPA, do inoculante recomendado para guandu. Essa resposta pode ser atribuída à promiscuidade e baixa especificidade apresentada pela espécie, que favorece a simbiose mutualista com diferentes estirpes, como relatado por Anand e Dogra (1997). A paridade com o tratamento testemunha pode ser atribuída a ocorrência de populações de rizóbios nativos, suprindo as exigências das plantas que não obtiveram inoculação e fertilização nitrogenada.

Ao avaliar caracteres relacionados a nodulação, Hwang et al. (2013) relataram correlação negativa entre o número e tamanho médio de nódulos, indicando que plantas com poucos nódulos tendem a possuir nódulos maiores. Correlações altamente positivas entre o peso e tamanho individual dos nódulos, variando de 0,76 a 0,84, também foram relatadas pelos autores. De acordo com Tajima et al. (2007), a atividade fixadora de nitrogênio nos nódulos radiculares está intimamente relacionada ao seu tamanho. No presente estudo, os maiores valores de peso individual de nódulos foram obtidos nos tratamentos inoculados, tanto com estirpes SEMIA 6156 como SEMIA 5079 5080 (Tabela 9).

O tratamento fertilizado com 50 kg.ha⁻¹ N-mineral, apresentou a menor nodulação, corroborando com as afirmações de diversos autores sobre o efeito inibitório da adubação nitrogenada sobre a nodulação e fixação biológica de N (DOGRA; DUDEJA, 1993; HUNGRIA et al., 2007; RUFINI et al., 2014; ZUFFO et al., 2018; LIU et al, 2019). A nodulação das leguminosas ocorre em resposta às demandas nutricionais da planta, que são supridas quando há abundância de N mineral na solução do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A aplicação das doses estimulantes de N-mineral (10 kg.ha⁻¹) não gerou efeito no peso individual e total de nódulos. Esperava-se que esta aplicação proporcionasse melhor desenvolvimento radicular, aumentando os sítios de infecção e suprimento de carbono e energia para as BFN, o que contribuiria para a fixação biológica de N (SOARES et al., 2016; LI et al., 2019). No entanto, estes tratamentos não se destacaram nas variáveis relacionadas ao desenvolvimento de raízes (MSR e VOL) e número de nódulos.

Embora a competitividade com rizóbios nativos pelos sítios de infecção nas raízes seja uma hipótese plausível na interpretação dos resultados apresentados até aqui, as diferenças encontradas nos parâmetros de nodulação indicam que as estirpes inoculadas tiveram vantagem competitiva e maior eficiência em relação às nativas, com destaque para a SEMIA 6156.

Houve diferença entre as linhagens avaliadas para os parâmetros de nodulação, tendo a BRS Mandarim apresentado maior peso individual de nódulo (PMN) e a linhagem g6-95 o maior número de nódulo por planta. Embora o número de nódulo possua uma consistente correlação positiva com massa seca total de nódulos (MSN), conforme observado por Hwang et al. (2014) e atestada neste estudo (Figura 5), as linhagens não diferiram neste critério, o que pode estar relacionado ao tamanho menor de nódulos das plantas da linhagem g6-95.

Tabela 9. Efeito das linhagens de guandu e aportes de nitrogênio para número de nódulos (NN), massa seca de nódulos por planta (MSN) e peso médio (PMN) por nódulos.

Tratamentos	NN (no.planta ⁻¹)	MSN (g.planta ⁻¹)	PMN (mg.nódulo ⁻¹)	
BRS Mandarim	107 b	2,23	22,3 a	
Linhagem g6-95	162 a	2,22	14,5 b	
P-valor ¹	0,0000	0,9784 ^{NS}	0,0002	
SEMIA 5079 5080	138 ab	2,40 a	20,0 ab	
SEMIA 6156	127 b	2,67 a	25,2 a	
SEMIA 5079 5080 + N	150 ab	2,51 a	18 , 0 b	
SEMIA 6156 + N	150 ab	2,37 a	17,5 b	
50 kg.ha ⁻¹	66 c	0,93 b	15,1 b	
Testemunha	176 a	2,48 a	14,5 b	
P-valor ¹	0,0003	0,0000	0,0274	
CV (%) ²	30,98	23,79	35,07	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05); ¹ CV = coeficiente de variação; ² NS = diferença estatística não significativa.

Os tratamentos inoculados e estimulados com N (10 kg.ha⁻¹) não diferiram entre si quanto ao índice de clorofila, e foram superiores ao tratamento que recebeu a dose de 50 kg.ha⁻¹ N-mineral (Tabela 10). Avaliando o crescimento da soja, Zhou et al. (2006) demonstraram que o excesso da oferta de fertilizante mineral pode interferir negativamente no crescimento das plantas e teores de clorofila, quando comparados a aplicação de pequenas doses de N-mineral e inoculação com rizóbios. Os autores atribuíram estes resultados aos efeitos tóxicos do acúmulo de

NH₄⁺ nos tecidos vegetais, ocasionados quando a capacidade de assimilação de NH₄⁺ foi excedida e a função fotossintética da planta prejudicada.

Já para o NPA, houve diferença entre os tratamentos, sendo que as plantas inoculadas com SEMIA 6156 apresentaram valores inferiores daquelas inoculadas com estirpes SEMIA 5079 5080, fertilizadas com 10 kg.ha-1 N-mineral. O maior acúmulo de nitrogênio (em mg.kg-1) e eficiência relativa de absorção de N foram observados nos tratamentos inoculados com SEMIA 5079 5080, nos inoculados com aplicação de N-mineral e testemunha. Devido à similaridade com a testemunha, é possível que tenha havido influência das condições de solo e de populações de rizóbios nativos sobre o resultado deste tratamento, ou ainda que as estirpes inoculadas tenham apresentado baixa adaptabilidade e competitividade, como observado nos estudos de Fernandes et al. (2003) com guandu, feijão-deporco e caupi.

Ao avaliar o efeito da inoculação com a estirpe SEMIA 6156 em guandu BRS Mandarim, Oliveira et al. (2009) também não encontraram diferenças significativas em relação ao tratamento adubado com a mesma dose de N deste estudo. De acordo com Zhou et al. (2006), as plantas inoculadas só terão taxas fotossintéticas altas em comparação às plantas não inoculadas, se apresentarem eficiência simbiótica. Isso decorre do considerável custo de fotossintatos no processo de FBN, que pode chegar a 14% do estoque atual da planta (KASCHUK et al., 2009). O consumo de C pelos nódulos será compensado quando níveis suficientes de N² forem fixados para atender as demandas metabólicas da planta em crescimento (CONCHA; DOERNER, 2020).

Tabela 10. Efeito das linhagens de guandu e aporte de nitrogênio para índice de clorofila (CLO), teor de nitrogênio na parte aérea (NPA) e eficiência relativa (ER).

Tratamentos	CLO (Falker)	NPA (g.kg ⁻¹)	ER (%)
BRS Mandarim	412	21	115 b
Linhagem g6-95	407	22	127 a
P-valor ¹	0,5776 ^{NS}	0,4390 ^{NS}	0,0209
SEMIA 5079 5080	427 a	23 ab	129 ab
SEMIA 6156	400 a	21 bc	114 bc
SEMIA 5079 5080 + N	421 a	25 a	136 a
SEMIA 6156 + N	424 a	22 ab	124 ab
50 kg.ha ⁻¹	359 b	18 c	100 c
Testemunha	427 a	22 ab	124 ab
P-valor ¹	0,0017	0,0073	0,006
CV (%) ²	8,36	14,77	14,62

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05); ¹ CV = coeficiente de variação; ² NS = diferença estatística não significativa.

A análise de correlação de Spearman (Figura 5) demonstrou coeficiente significativamente positivo entre NPA e CLO (0,55). O nitrogênio é essencial para a síntese de enzimas associadas à clorofila, como a Rubisco (OSAKI et al., 1993; CHAPMAN; BARRETO, 1997). Sendo uma enzima chave na assimilação de CO₂, o aumento

da concentração de N na parte aérea, em especial nas folhas, pode estar relacionado ao estímulo da fotossíntese (RAJCAN et al., 1999; KASCHUK et al., 2010).

Avaliando a performance simbiótica de cultivares de soja, Hungria e Bohrer (2000) observaram que o acúmulo de nitrogênio possuiu correlação negativa com número de nódulos, mas positiva com a massa de nódulos por planta. Este comportamento não foi observado no presente estudo, onde o teor de nitrogênio da parte aérea correlacionou-se positivamente tanto com NN como MSN, com coeficientes de 0,56 e 0,42, respectivamente. A concentração de nitrogênio na parte aérea teve correlação negativa com MSPA (0,30), também confrontando com os resultados de Hungria e Bohrer (2000), que encontraram coeficientes positivos entre essas variáveis (0,91). O contraste entre os resultados denota a natureza complexa dos parâmetros relacionados ao crescimento e nodulação, amplamente sujeitos às interações com o ambiente (SANTOS et al., 2006).

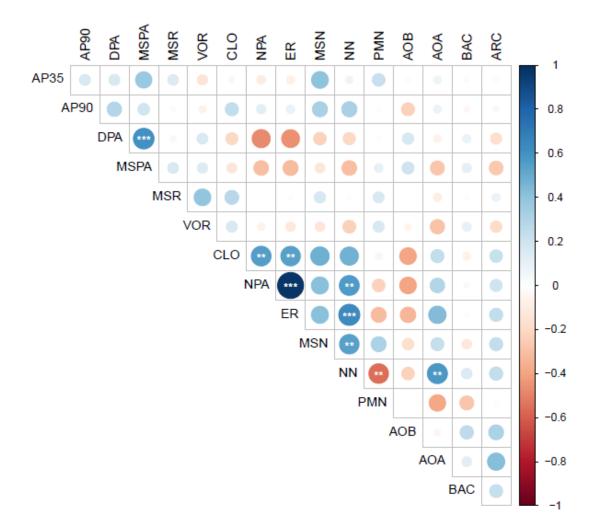


Figura 5. Análise de correlação de Spearman das variáveis altura de plantas aos 35 DAE (AP35), altura de plantas aos 90 DAE (AP90), diâmetro de caule (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), volume de raiz (VOL), índice de clorofila (CLO), N total da parte aérea (NPA) e eficiência relativa (ER), massa seca de nódulo (MSN), número de nódulos (NN), peso médio de nódulos (PMN), bactéria amônio-oxidante (AOB), archaea amônio-oxidante (AOA), bactérias totais (BAC) e archaea totais (ARC). A intensidade da cor e o tamanho dos círculos representam a força da correlação. As cores azuis referemse à correlação positiva e as cores vermelhas representam correlação negativa. (**) significativo a 1%; (***) significativo a 5%.

4.3.2. Efeito das linhagens de guandu e aportes de N sobre a abundância de bactérias e arquéias totais, AOB e AOA

A introdução de leguminosas no solo pode gerar efeitos sobre a diversidade e abundância de comunidades microbianas, interferindo na ciclagem de nutrientes, como o nitrogênio, que tem grande parte das reações mediadas pela biota do solo. Isso ocorre pois os micro-organismos do solo são sensíveis às mudanças ambientais.

A oxidação da amônia é estimulada pelo teor de amônia do solo, que pode ser introduzido via fertilizantes nitrogenados, fixação de N² e mineralização de N-orgânico (VICTORIA et al., 1992; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; THION et al., 2016). Em função da simbiose com bactérias fixadoras de N, os solos cultivados com leguminosas tendem a possuir elevado nível de nitrogênio e taxas de mineralização de resíduos orgânicos, devido à sua baixa relação C:N (ALCÂNTARA et al., 2000). Isso pode refletir em maior atividade de oxidação de amônia em relação às áreas sem a influência de leguminosas, principalmente nas porções rizosféricas (FAN et al., 2011; BARROS et al., 2018), resultando em maior potencial da atividade de nitrificação.

Maiores taxas de nitrificação indicam ciclagem de nitrogênio mais rápida, salientando os benefícios dos consórcios de gramíneas com leguminosas, quanto a biodisponibilidade do nutriente para o sistema. De forma geral, as práticas de manejo interferem no tamanho e atuação da microbiota do solo, mas alguns grupos se apresentam mais sensíveis que outros à estas mudanças, como é o caso das AOBs (WANG, et al., 2009).

Os resultados demonstram que houve predominância de AOA em relação à AOB nos solos sem planta (Figura 6). Mesmo AOA e AOB coabitando a grande maioria dos ambientes terrestres, acredita-se que as AOAs sejam mais abundantes (LEININGER et al, 2016), o que explica os dados encontrados neste trabalho. Contudo, de forma geral, as populações bacterianas foram maiores que as arquéias (Figura 7).

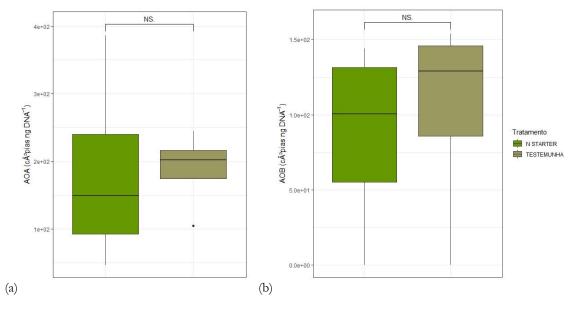


Figura 6. Número de cópias de gene 16S rRNA de (a) arquéias amônio oxidantes (AOA) e (b) bactérias amônio oxidantes (AOB) em solo sem planta com e sem adição de 10 kg.ha-1 de N.

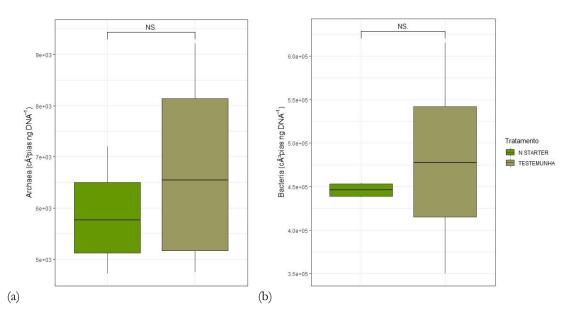


Figura 7. Número de cópias de gene 16S rRNA de (a) arquéias totais (ARC) e (b) bactérias totais (BAC) em solo sem planta com e sem adição de 10 kg.ha⁻¹ de N

A adição de fertilizante mineral também não afetou as comunidades de AOA e AOB, bactérias e arquéias totais nos solos sem planta (Figura 6 e 7). Contudo, é possível observar maior abundância de AOA (Figura 8) e AOB (Figura 9) em solo rizosférico, quando comparado ao solo sem interferência do componente vegetal.

As plantas parecem exercer um relevante controle sobre a abundância de organismos oxidantes de amônia, demonstrado pelas diferenças encontradas em solo rizosférico e não-rizosférico. Essa influência está relacionada a exsudação de substâncias pelas raízes, que permite as plantas selecionar micro-organismos específicos para ocupar a rizosfera visando atender às suas demandas (CARDOSO; FREITAS, 1992; ROMAGNOLI; ANDREOTE, 2016). Como exemplo, Concha e Doerner (2020) relatam que quando os recursos de N para as plantas são baixos, as leguminosas exsudam flavonoides que atraem micro-organismos diazotróficos, específicos para atender esta demanda.

O enriquecimento observado no solo rizosférico deste estudo, corrobora com as diferenças encontradas por Wang et al. (2018) na abundância de AOA, em solos com a presença e ausência de *L. vulgare*, mas não com a de AOB. A ausência de efeito na abundância de AOB também foi relatada por Thion et al. (2016), que sugeriu baixa competitividade desse grupo pela amônia, contrastando com o bom desempenho de AOA na rizosfera de plantas com alta demanda de nitrogênio.

No presente estudo, não foram observadas diferenças na comunidade de AOA entre os tratamentos inoculados, fertilizados e testemunha. Diversos trabalhos relatam que as comunidades de AOA permaneceram estáveis com diferentes níveis de nitrogênio, implicando em sua mínima atuação na oxidação da amônia. Ainda segundo os autores, a importância funcional da AOA em relação a AOB em ambientes agrícolas é bastante obscura, e pode ser atribuído a sua lenta taxa de crescimento (WANG et al., 2009; FAN et al., 2011).

Diferenças significativas na abundância de AOA foram encontradas entre as linhagens, sendo que a linhagem g6-95 exerceu maior estímulo a esse grupo microbiano. Isso pode estar relacionado a uma possível diferença na rizodeposição de compostos orgânicos entre as linhagens de guandu, que beneficiou a AOA em detrimento da AOB.

A adição de 50 kg.ha⁻¹ de N afetou a abundância de AOB, que apresentou valores altamente superiores aos demais tratamentos em ambas as linhagens. A abundância de AOB geralmente é maior em ambientes fertilizados, com maiores teores de NH₄ + (DI et al., 2010). Este resultado pode estar associado a menor absorção de amônia pelas raízes das plantas neste tratamento, que segundo Glasser et al. (2010), deveriam competir com os agentes nitrificantes na rizosfera. A correlação negativa encontrada entre AOB e o conteúdo de NPA (-0,39) e clorofila total (-0,40) nas plantas, sugere que não houve essa competição, e que possivelmente o N esteve disponível para as AOB na solução do solo.

Ao analisar numericamente os tratamentos inoculados com rizóbios e testemunha de forma isolada, notase maior abundância de AOA, inclusive nos tratamentos com adição de pequenas doses de N. De acordo com Zhang et al (2015), as AOA têm contribuição maior em solos com baixo teor de nitrogênio, mas sua contribuição na oxidação de amônia em comparação com AOB necessita de mais estudos. Essa relação, juntamente com o fato da planta liberar mais exsudatos para nodulação sob condições de baixa oferta de N, pode ser observada pela correlação positiva significativa entre AOA e NN (0,58) encontrada neste estudo (Figura 5).

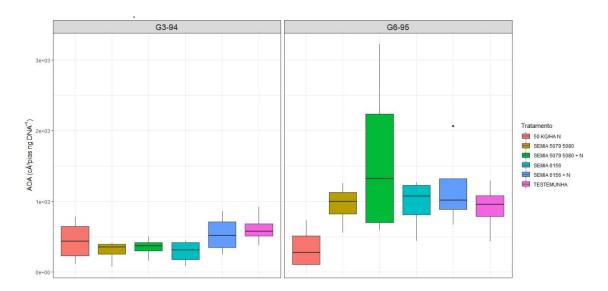


Figura 8. Número de cópias de gene 16S rRNA de archaea amônio oxidantes (AOA) na linhagem g3-94 (BRS Mandarim) e g6-95 sob diferentes aportes de nitrogênio.

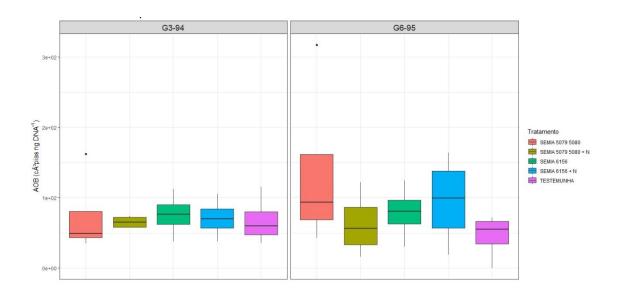


Figura 9. Número de cópias de gene 16S rRNA de bactéria amônio oxidantes (AOB) na linhagem g3-94 (BRS Mandarim) e g6-95 sob diferentes aportes de nitrogênio.

A contribuição de cada grupo de amônio-oxidantes na emissão de N₂O poderia, por dedução, ser atribuída a sua abundância. No entanto, estudos realizados por Pannu et al. (2019), indicam que quando induzida por fertilizantes a comunidade de AOB tem contribuição significativa nas quantidades de N₂O emitidas, quando comparadas com AOA, indicando a desvantagem na adoção da prática, que se apresenta custosa econômica e ambientalmente.

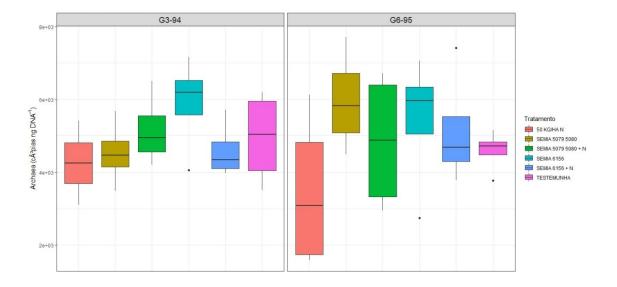


Figura 10. Número de cópias de gene 16S rRNA de archaea totais (ARC) na linhagem g3-94 (BRS Mandarim) e g6-95 sob diferentes aportes de nitrogênio.

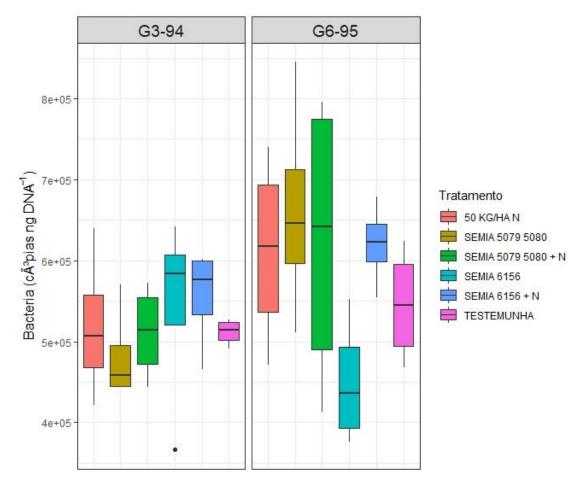


Figura 11. Número de cópias de gene 16S rRNA de bactérias totais (BAC) na linhagem g3-94 (BRS Mandarim) e g6-95 sob diferentes aportes de nitrogênio.

Não houve diferença quanto ao uso de inoculantes, com ou sem adição de 10 kg.ha¹¹ de N, nas comunidades bacterianas e de arquéias (Figuras 10 e 11). De forma geral, observa-se maior abundância de bactérias entre os tratamentos, com destaque para a linhagem g6-95, que apresentou maior interação com este grupo microbiano. Segundo Zhang et al. (2015), a maior abundância de bactérias totais indica que essa comunidade desempenha um papel mais importante do que arquéias no metabolismo global da rizosfera. Ainda segundo o autor, a maior exsudação e liberação de ácidos orgânicos pelas leguminosas, em decorrência da inoculação e simbiose com rizóbios, pode explicar a grandeza das comunidades bacterianas (ZHANG et al., 2015). A diversidade seleta na rizosfera, deve ser interpretada como um enriquecimento das funções neste ecossistema, moldada pelos interesses da planta hospedeira.

4.4. Conclusões

O guandu BRS Mandarim apresenta maior nodulação que a linhagem g6-95, embora se mostre menos eficiente na absorção de N;

As plantas inoculadas com estirpes SEMIA 5079 5080 têm produção de MS e nodulação equivalentes aquelas inoculadas com SEMIA 6156;

O uso de 10 kg.ha⁻¹ N no estabelecimento do guandu melhora os teores de N da parte aérea e possibilita maior produção de massa seca nas plantas inoculadas;

O guandu apresenta baixa especificidade, resultando em índices de eficiência simbiótica elevada mesmo em solos sem inoculação;

As comunidades de AOA são mais abundantes do que as comunidades de AOB no solo avaliado, com ou sem plantas;

As comunidades de bactérias totais são mais abundantes do que as comunidades de arquéias totais no solo avaliado, com o sem planta;

A aplicação de altas doses de fertilizante nitrogenado exerce influência nas comunidades de microorganismos amônio oxidantes;

A inoculação com rizóbios não interfere nas comunidades de AOA, AOB, bactérias e arquéias totais.

Referências

- ALCÂNTARA, F.A.de.; NETO, A.E.F.; PAULA, M.B.de.; MESQUITA, H.A.de.; MUNIZ, J.A. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um latossolo vermelho-escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 277-88, 2000.
- ANAND, R.C; DOGRA, R.C. Comparative efficiency of *Rhizobium/Bradyrhizobium spp*. Strains in nodulating *Cajanus cajan* in relation to characteristic metabolic enzyme activities. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 283-87, 1997.
- BAKKE, I.; DE SCHRYVER, P.; BOON, N.; VADSTEIN, O. PCR-based community structure studies of Bacteria associated with eukaryotic organisms: a simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 2, p. 349–51, 2011.
- BARROS, F.M.R.; FRACETTO, G.G.M.; FRACETTO, F.J.C.; MENDES JÚNIOR, J.P.; ARAÚJO, V.L.V.P.de.; LIRA JÚNIOR, M.A. Silvopastoral systems drive the nitrogen-cycling bacterial community in soil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 3, p. 281-90, 2018.
- BRITO, M.M.P.; MURAOKA, T.; SILVA, E.C.da. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p.206-15, 2011.
- BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, London, v. 36, p. 214-16, 2004.
- CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. A rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. Microbiologia do solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 41-58.
- CASSETARI, A.S.; SILVA, M.C.P.da.; CARDOSO, E.J.B.N. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica. In: CARDOSO, E.J.B.N.; ANDREOTE, F.D. (ed.) **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 111-31.
- CHAPMAN, S.C.; BARRETO, H.J. Using a clorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetatite growth. **Agronomy Journal**, v. 89, n. 4, p. 557-62, 1997.
- CONCHA, C.; DOERNER, P. The impact of the rhizobia-legume symbiosis on host root system architecture. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 13, p. 3902-21, 2020.

- COOLEN, M.J.L.; HOPMANS, E.C.; RIJPSTRA, W.I.C.; MUYZER, G.; SCHOUTEN, S.; VOLKMAN, J.K.; DAMSTÉ, J.S.S. Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change. **Organic Geochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1151–67, 2004
- DI, H.J.; CAMERON, K.C.; SHEN, J.; WINEFIELD, C.S.; O'CALLAGHAN, M.; BOWATTE, S.; HE, J. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 72, n. 3, p. 386-94, 2010.
- DOGRA, R.C.; DUDEJA, S.S. Fertilizer N and nitrogen fixation in legume-Rhizohium symbiosis. **Annals of Biology**, v. 9, p. 149-64, 1993.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPS, 1999. 412p.
- FAN, F.; ZHANG, F.; LU, Y. Linking plant identity and interspecific competition to soil nitrogen cycling through ammonia oxidizer communities. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 43, p. 46-54, 2011.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção e caracterização de rizóbios para guandu, caupi e feijão-de-porco nativos dos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. Aracaju: EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS; EMBRAPA SOJA, 2003. 4p. (EMBRAPA. Comunicado Técnico, 15).
- FRANCIS, C.A.; ROBERTS, K.J.; BEMAN, J.M.; SANTORO, A.E.; OAKLEY, B.B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 41, p. 14683–88, 2005.
- FRANCO, A.A.; NEVES, M.C.P. Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 219-30.
- GLASER, K.; HACKL, E.; INSELSBACHER, E.; STRAUSS, J.; WANEK, W.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; SESSITSH, A. Dynamics of ammonia-oxidizing communities in barley-planted bulk soil and rhizosphere following nitrate and ammonium fertilizer amendment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 74, n. 3, p. 575-91, 2010.
- GODOY, R.; BATISTA, L.A.R.; SOUZA, F.H.D.; PRIMAVESI, A.C. Caracterização de linhagens puras selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 546-55, 2003.
- HUNGRIA, M.; BOHRER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 45-52, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: EMBRAPA SOJA: EMBRAPA CERRADOS, 2007. 80p. (EMBRAPA. Documentos, 283).
- HWANG, S.; RAY, J.D.; CREGAN, P.B.; KING, C.A.; DAVIES, M.K.; PURCELL, L.C. Genetics and mapping of quantitative traits for nodule number, weight, and size in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Euphytica**, v. 195, p. 419-34, 2014.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P.A.; GILLER, K.E.; KUYPER, T.W. Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) dependente on N₂ fixation or nitrate supply. **Plant Biology**, v. 12, p. 60-9, 2010.

- KASCHUK, G.; KUYPER, T.W.; LEFFELAAR, P.A.; HUNGRIA, M.; GILLER, K.E. Are the rates of photosynthesis stimated by the carbono sink strength of rhizobia and arbuscular mycorrhizal symbiosis? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 1233-44, 2009.
- LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, v. 442, p. 806-09, 2006.
- LI, Y.; PAN, F.; YAO, H. Response of symbiotic and asymbiotic nitrogen-fixing microorganisms to nitrogen fertilizer application. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, p. 1948-58, 2019.
- LIU, Y.; YIN, X.; XIAO, J.; TANG, L.; ZHENG, Y. Interactive influences of intercropping by nitrogen on flavonoid exudation and nodulation in faba bean. **Scientific Reports 9**, n. 4818, 2019.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. (2 ed.) Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- MUNIZ, A.W.; COSTA, M.D.; SÁ, E.L.S.de.; FIUZA, A.B.; BROSE, E. Symbiotic efficiency of pea (*Pisum sativum*) rhizobia association under field conditions. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 32, p. 2582-85, 2017.
- OLIVEIRA, P.P.A.; MATTA, F.P.; GODOY, R. Consorciação com guandu na recuperação de pastagens degradadas, uma tecnologia de duplo propósito: adubação verde e pastejo consorciado diferido. São Carlos: EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE, 2017. 6p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 75).
- OLIVEIRA, P.P.A.; SCHAER, A.B.; ASCÊNCIO, F.; GODOY, R.; TSAI, S.M. Fixação biológica de nitrogênio em guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp cv. BRS Mandarim) inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Na presença ou ausência de tratamento com fungicida. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46, 2009, Maringá. **Anais...** Maringá, PR: SBZ. 2009. 3p.
- OSAKI, M.; SHINANO, T.; TADANO, T. Effect of nitrogen application on the accumulation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase and clorophyll in several field crops. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 39, n. 3, p. 427-36, 1993.
- PANNU, M.N.; MEINHARDT, K.A.; BERTAGNOLLI, A.; FRANSEN, S.C.; STAHL, D.A.; STRAND, S.E. Nitrous oxide emissions associated with ammonia-oxidizing bacteria abundance in fields of switchgrass with and without intercropped alfalfa. **Environmental Microbiology Reports**, v. 11, n. 5, p. 727-35, 2019.
- RAIJ, B.V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. (2 ed.) Campinas, SP: INSTITUTO AGRONÔMICO. FUNDAÇÃO IAC, 1997. 285p. (Boletim Técnico, 100).
- RAJCAN, I.; DWYER, L.M.; TOLLENAAR, M. Note on relationship between leaf soluble carbohydrate and chlorophyll concentrations in maize during leaf senescence. **Field Crops Research**, v. 63, p. 13-7, 1999.
- ROMAGNOLI, E.M.; ANDREOTE, F.D. Rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; ANDREOTE, F.D. (ed.) Microbiologia do solo. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 47-60.
- ROTTHAUWE, J.H.; WITZEL, K.P.; LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammoniaoxidizing populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4704–12, 1997
- RUFINI, M.; OLIVEIRA, D.P.; TROCHMANN, A.; SOARES, B.L.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com guandu-anão em casa de vegetação e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 3, p. 197-206, 2014.

- SANTOS, M.A.; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, B. *elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 67-75, 2006.
- SOARES, B.L.; FERREIRA, P.A.A.; RUFINI, M.; MARTINS, F.A.D.; OLIVEIRA, D.P.; REIS, R.P.; ANDRADE, M.J.B.de.; MOREIRA, F.M.S. Agronomic and Economic efficiency of common-bean inoculation with rhizobia and mineral nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, 13p, 2016.
- STAHL, D.A., AMANN, R. Development and application of nucleic acid probes. In: STACKEBRANDT. E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1991. p. 205–48.
- TAJIMA, R.; LEE, O.N.; ABE, J.; LUX, A.; MORITA, S. Nitrogen-fixing activity of root nodules in relation to their size in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Production Science**, v. 10, n. 4, p. 423-29, 2007.
- THION, C.E.; POIREL, J.D.; CORNULIER, T.; DE VRIES, F.T.; BARDGETT, R.D.; PROSSER, J.I. Plant nitrogen-use strategy as a driver of rhizosphere archaeal and bacterial ammonia oxidiser abundance. **FEMS**Microbiology Ecology, v. 92, n. 7, 11p, 2016.
- TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutriente levels. **Plant and Soil**, v. 152, p. 131-38, 1993.
- VICTORIA, R.L.; PICCOLO, M.C.; VARGAS, A.A.T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 105-20.
- WANG, M.; VELDSINK, J.H.; ANDREOTE, F.D.; SALLES, J.F. Compositional and abundance changes of nitrogen-cycling genes in plant-root microbiomes along a salt Marsh chronosequence. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 2061-78, 2018.
- WANG, Y.; KE, X.; WU, L.; LU, Y. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 27-36, 2009.
- ZHANG, N.N.; SUN, Y.M.; WANG, E.T.; YANG, J.S.; YUAN, H.L.; SCOW, K.M. Effects of intercropping and rhizobia inoculation on the ammonia-oxidizing microorganisms in rhizospheres of maize and faba bean plants. **Applied Soil Ecology**, v. 85, p. 76-85, 2015.
- ZHOU,X.J.; LIANG, Y.; CHEN, H.; SHEN, S.H.; JING, Y.X. Effects of rhizobia inoculation and nitrogen fertilization on photosynthetic physiology of soybean. **Photosynthetica**, v. 44, n. 4, p. 530-5, 2006.
- ZUFFO, A.M.; STEINER, F.; BUSCH, A.; ZOZ, T. Response of Early soybean cultivars to nitrogen fertilization associated with *Bradyrhizohium japonicum* inoculation. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, n. 4, p. 436-46, 2018.