



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIAS E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

REGINALDO ALVES FERREIRA NETO

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE
NITROGÊNIO EM CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI NO SEMIÁRIDO DE
PERNAMBUCO**

Recife

2019

REGINALDO ALVES FERREIRA NETO

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE
NITROGÊNIO EM CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI NO SEMIÁRIDO DE
PERNAMBUCO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Tecnologias Energéticas e Nucleares da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Aplicações de
Radioisótopos na Agricultura e Meio-Ambiente.

Orientador: Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Coorientador: Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

F383d

Ferreira Neto, Reginaldo Alves.

Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi no Semiárido de Pernambuco. / Reginaldo Alves Ferreira Neto. - Recife, 2019.

86 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Orientadora: Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas.

Coorientador: Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2019.

Inclui referências.

1. Engenharia nuclear. 2. *Vigna unguiculata*. 3. Rizóbio. 4. Diversidade genética. 5. 16S-23S rDNA. 6. Eficiência agrônômica. I. Freitas, Ana Dolores Santiago de, orientadora. II. Fernandes Júnior, Paulo Ivan, coorientador. III. Título.

CDD 621.48 (22. ed.)

UFPE
BDEN/2019-07

REGINALDO ALVES FERREIRA NETO

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE
NITROGÊNIO EM CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI NO SEMIÁRIDO DE
PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 25/01/2019

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas (Orientadora)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^o. Dr. Everardo Valadares de Sa Barretto Sampaio (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra (Examinadora Externa)

Instituto Agrônômico de Pernambuco

Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva (Examinadora Externa)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Jakson Leite (Examinador Externo)

Universidade Federal de Alagoas

AGRADECIMENTOS

Sou grato a Deus, por tudo que tem feito em minha vida, por me conceder saúde, força e sabedoria para lidar com as dificuldades encontradas na realização desta Tese.

Aos meus pais Elsa e Reginaldo, pelo amor, incentivo e dedicação para comigo. Devo tudo o que sou a eles, aos seus ensinamentos e esforço para que eu tivesse a melhor educação e assim pudesse conquistar os objetivos almejados.

Ao meu irmão Johnnatan, por estar sempre ao meu lado, me ajudando em todos os momentos, sendo o melhor irmão que eu poderia ter.

A Dita e Ester, pelo carinho e afeto, demonstrando que para ser da família não precisa ter laços sanguíneos.

A minha noiva, Iolanda Ramalho da Silva, pelo amor, carinho, compreensão e paciência comigo. Sem dúvida tive muita sorte em encontrar uma pessoa tão especial para dividir mais esta conquista.

Aos meus colegas do laboratório de Microbiologia do Solo (Embrapa Semiárido) por sua grande ajuda na execução deste projeto, pois não sem ela não seria possível à realização deste trabalho. Também sou muito grato pelo carinho e amizade nos quase 3 anos em que estivemos juntos no laboratório.

Aos meus orientadores Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas e Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior, por sua dedicação, compreensão e confiança. Sou grato pela atenção e ajuda essenciais para realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela ajuda financeira e concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) tem grande importância alimentícia e econômica, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Esta cultura pode adquirir nitrogênio da atmosfera através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), que é ecologicamente relevante por redução da adubação nitrogenada e dos impactos ambientais. Nesse sentido, os objetivos deste trabalho foram: 1) determinar a FBN, o aporte de N e a produtividade de grãos em cultivares de feijão-caupi no Pernambuco submetidos à inoculação com bactérias recomendadas como para esse cultivo; e 2) determinar a diversidade de rizóbios associados a essas variedades. Dois experimentos foram conduzidos na estação experimental da Embrapa Semiárido, localizado em Petrolina. O primeiro, para avaliar a FBN, produtividade e diversidade de rizóbios em dez variedades de feijão-caupi (BRS Acauã, BRS Imponente, BRS Nova Era, BRS Marataoã, BRS Pajeú, BRS Potengi, BRS Pujante, BRS Tapaihum, BRS Tumucumaque, e BRS Xiquexique), cultivadas com ou sem inoculação de quatro estirpes de *Bradyrhizobium* (UFLA 03-84, BR3267, INPA 03-11B e BR3262), com controles nitrogênio (80 kg ha⁻¹ N, na forma de ureia), e controle absoluto (C.A). Foram estimados os teores de N total, N acumulado, a FBN pelo método da abundância natural do ¹⁵N, e N fixado e produção de biomassa seca e grãos. Também foi estimada a diversidade de bactérias diazotróficas em todas as variedades, que foram isoladas e caracterizadas fenotípica e genotipicamente a partir de técnicas de fingerprint (RFLP) e sequenciamento do gene IGS 16-23S rDNA, além de análises de fingerprint por BOX-PCR para os isolados obtidos da variedade BRS Nova Era. O segundo experimento foi feito com cinco variedades de feijão-caupi que apresentaram respostas diferentes nos parâmetros de FBN e produtividade em relação à inoculação com os rizóbios recomendados (BRS Imponente, BRS Marataoã, BRS Pujante, BRS Tapaihum e BRS Tumucumaque), sendo submetidas aos mesmos tratamentos utilizados no experimento anterior. Foram determinados peso de biomassa aérea e grãos. Houve FBN em todas as variedades de feijão-caupi. Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ variaram entre 1,5 ‰ na variedade BRS Pujante (C.A) e 6,18 ‰ na variedade BRS Tumucumaque inoculada com BR 3267. A maior quantidade N fixado foi na variedade BRS Tumucumaque inoculada com BR 3262 (34,8 kg ha⁻¹) que também apresentou maior N acumulado na biomassa aérea (67,9 kg ha⁻¹). O peso da biomassa aérea variou entre 470 kg ha⁻¹ na variedade BRS Xique-xique com BR 3262 e 1642 kg ha⁻¹ na BRS Imponente com INPA 03-11B. Os tratamentos inoculados apresentaram resultados semelhantes ou superiores de produção de grãos ao do tratamento com adubação nitrogenada, com exceção da BRS Imponente. O sequenciamento da IGS revelou a presença de isolados dos gêneros

Bradyrhizobium, *Rhizobium*, *Microvirga*, *Pseudomonas* e *Mycobacterium*. Possíveis novas espécies de *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Microvirga* foram registradas. No segundo experimento de campo, a utilização de diferentes fontes de N afetou a produção de grãos, com exceção da variedade BRS Tapaihum. A produção de grãos variou entre 1305 kg ha⁻¹ na variedade BRS Imponente e 2789 kg ha⁻¹ na BRS Tapaihum com adubação nitrogenada.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*. Rizóbio. Diversidade genética. 16S-23S rDNA. Eficiência agronômica.

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Has great alimentary and economic importance, mainly in the North and Northeast regions of Brazil. This crop can acquire nitrogen from the atmosphere through biological nitrogen fixation (BNF), which is ecologically relevant by reducing nitrogen fertilization and environmental impacts. Therefore, the aims of this study were: 1) to determine the BNF, N intake and grain yield in cowpea cultivars in Pernambuco submitted to inoculation with bacteria recommended for this crop; and 2) determine the diversity of rhizobia associated with these varieties. Two experiments were conducted at the Embrapa Semiárid experimental station, located in Petrolina. The first, to evaluate BNF, productivity and diversity of rhizobia in ten varieties of cowpea (BRS Acauã, BRS Imponente, BRS Nova Era, BRS Marataoã, BRS Pajeú, BRS Potengi, BRS Pujante, BRS Tapaihum, BRS Tumucumaque, and BRS Xiquexique), cultivated with or without inoculation of four strains of *Bradyrhizobium* (UFLA 03-84, BR3267, INPA 03-11B and BR3262), with nitrogen control (80 kg ha⁻¹ N as urea), and absolute control (A.C.). The N contents, N accumulated, the BNF by the natural abundance method of ¹⁵N, and N fixed and dry biomass and grain yield were estimated. It was also estimated the diversity of diazotrophic bacteria in all varieties, which were isolated and characterized phenotypically and genotypically from fingerprint (RFLP) techniques and IGS 16-23S rDNA gene sequencing, as well as fingerprint analyzes by BOX-PCR for the isolates obtained from the BRS Nova Era variety. The second experiment was done with five varieties of cowpea that presented different responses in the BNF parameters and productivity in relation to the inoculation with the recommended rhizobia (BRS Imponente, BRS Marataoã, BRS Pujante, BRS Tapaihum and BRS Tumucumaque), being submitted to the same treatments used in the previous experiment. Weight of aerial biomass and grains were determined. There was FBN in all varieties of cowpea. The values of $\delta^{15}\text{N}$ ranged from 1.5 ‰ in the BRS Pujante (CA) and 6.18‰ variety in the BRS Tumucumaque strain inoculated with BR 3267. The higher N amount fixed was the BRS Tumucumaque inoculated with BR 3262 (34.8 kg ha⁻¹), which also presented higher accumulated N in the Shoot biomass (67.9 kg ha⁻¹). The weight of the aerial biomass varied between 470 kg ha⁻¹ in the BRS Xique-xique variety with BR 3262 and 1642 kg ha⁻¹ in the BRS Imponente with INPA 03-11B. The treatments inoculated presented similar or superior results of grain yield to the treatment with nitrogen fertilization, except for the BRS Imponente. Sequencing of the IGS revealed the presence of isolates of the genus *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Microvirga*, *Pseudomonas* and

Mycobacterium. Possible new species of *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* and *Microvirga* were recorded. In the second field experiment, the use of different N sources affected grain production, except for the BRS Tapaihum variety. Grain production varied between 1305 kg ha⁻¹ in the BRS Imponente variety and 2789 kg ha⁻¹ in BRS Tapaihum with nitrogen fertilization.

Keywords: *Vigna unguiculata*. Rhizobia. Genetic diversity. 16S-23S rDNA. Agronomic efficiency

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Climograma com temperatura e precipitação no período em que os experimentos foram realizados na estação experimental de Bebedoro (Embrapa Semiárido). Fonte: Embrapa Semiárido e Agritempo.....	36
Figura 2 –	Produção de grãos em cinco variedades de feijão-caupi inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> por dois anos consecutivos na estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE.....	61
Figura 3 –	Dendrograma gerado a partir do padrão de bandas da restrição de IGS-RFLP digerido pelas enzimas <i>Msp</i> I, <i>Dde</i> I e <i>Hin6</i> I de bactérias isoladas de nove diferentes variedades de feijão-caupi [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.].....	63
Figura 4 –	Dendrograma gerado a partir do padrão de bandas da restrição de IGS-RFLP digerido pelas enzimas <i>Msp</i> I, <i>Dde</i> I e <i>Hin6</i> I de bactérias diazotróficas isoladas da variedade de feijão-caupi BRS Nova Era.....	64
Figura 5 –	Perfis gerados por meio do <i>fingerprint</i> molecular de BOX-PCR de isolados bacterianos do grupo IGS RFLP XV da variedade BRS Nova Era proveniente de nódulos coletados na estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE.....	65
Figura 6 –	Árvore filogenética com base nas sequências parciais da região IGS (16S – 23S rRNA) dos isolados do gênero <i>Bradyrhizobium</i> em diferentes variedades de feijão-caupi. Agrupamento utilizado Neighbor-Joining. Números de <i>Bootstrap</i> (1000 réplicas) superiores a 50% representados.....	73
Figura 7 –	Árvore filogenética com base nas sequências parciais da região IGS (16S – 23S rRNA) dos isolados do gênero <i>Rhizobium</i> em diferentes variedades de feijão-caupi. Agrupamento utilizado Neighbor-Joining. Números de <i>Bootstrap</i> (1000 réplicas) superiores a 50% representados.....	74

Figura 8 – Árvore filogenética com base nas sequências parciais da região IGS (16S – 23S rRNA) dos isolados do gênero *Microvirga* em diferentes variedades de feijão-caupi. Agrupamento utilizado Neighbor-Joining. Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50% representados..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Análise química e física do solo da estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE.....	36
Tabela 2 –	Biomassa seca, concentração de N (%) e $\delta^{15}\text{N}$ (‰), % N _{dda} , N acumulado e fixado na biomassa aérea seca em dez variedades de feijão-caupi inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> na estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE, 45 dias após o plantio.....	49
Tabela 3 –	Produtividade de vagens e grãos em 10 variedades de feijão-caupi inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> na estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE, 80 dias após o plantio.....	54
Tabela 4 –	Desempenho superior das estirpes inoculadas ($p < 0,05$) em dez variedades de feijão-caupi cultivadas na estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE, em relação a controle absoluto.....	56
Tabela 5 –	Biomassa seca (45 DAP), produtividade de vagens e grãos em cinco variedades de feijão-caupi (80 DAP) inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> na estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE.....	59
Tabela 6 –	Identificação dos isolados bacterianos de <i>Vigna unguiculata</i> L. em experimento realizado na estação experimental de Bebedouro, Petrolina – PE, por meio da comparação das sequências parciais da região 16S-23S (IGS) com as disponibilizadas pelo NCBI.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Número de massa atômica
Al	Alumínio
ATP	Adenosina Trifosfato
B	Valor de $\delta^{15}\text{N}$ para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N_2 atmosférico
C	Carbono
^{13}C	Carbono com número de massa atômica 13
Ca	Cálcio
CE	Condutividade elétrica
cmol_c	Centimol de carga
CTC	Capacidade de troca de cátions
Cu	Cobre
CuCO_3	Carbonato de cobre
CV	Coeficiente de Variância
DAP	Dias Após o Plantio
dm^{-3}	Decímetro cúbico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ETo	Evapotranspiração
FAO	Food and Agriculture Organization
FBN	Fixação biológica de Nitrogênio
Fe	Ferro
G	Grama
H	Hidrogênio
Ha	Hectare
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGS 16-23S	Intergenic Spacer Regions (regiões espaçadoras intergênicas)
rDNA,	
K	Potássio
Kc	Coeficiente de Cultura
Kg	Quilograma
K_2O	Óxido de Potássio
M	Metro

MAP	Monoamônio fosfato
Mg	Magnésio
mg	Miligrama
mmol _c	Milimol de Carga
Mn	Manganês
MO	Matéria Orgânica
N	Nitrogênio
¹⁴ N	Nitrogênio com número de massa atômica 14
¹⁵ N	Nitrogênio com número de massa atômica 15
N ₂	Nitrogênio (Gás)
Na	Sódio
Ndda	Nitrogênio derivado do ar
NH ₄ ⁺	Íon Amônio
NO ₃ ⁻	Íon Nitrato
P	Fósforo
pH	Potencial Hidrogeniônico
Prof.	Profundidade
P ₂ O ₅	Pentóxido de fósforo
SB	Soma de bases trocáveis
t	Tonelada
V	Saturação por Bases
Zn	Zinco
°C	Graus Celsius
δ	Desvio por mil
%	Porcentagem
‰	Por mil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Feijão-caupi.....	18
2.2	Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas.....	20
2.3	Métodos para avaliação da FBN.....	23
2.4	FBN, inoculação, produtividade e aporte de N em feijão-caupi.....	24
2.5	Técnicas moleculares no estudo de comunidades de bactérias diazotróficas.....	28
2.5.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	28
2.5.2	Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP).....	29
2.5.3	Rep-PCR baseadas em fragmentos de DNA repetitivo.....	30
2.5.4	Análise de sequencias multilocus (MLSA) e genes simbióticos.....	31
2.5.5	Diversidade de bactérias diazotróficas em feijão-caupi.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	Área de estudo e delineamento experimental.....	35
3.2	Avaliação da produção de biomassa aérea.....	38
3.3	Estimativas da FBN.....	38
3.4	Avaliação da produtividade de grãos.....	39
3.5	Estatística.....	39
3.6	Diversidade de bactérias diazotróficas no feijão-caupi.....	39
3.6.1	Isolamento e caracterização em meio de cultura de bactérias de nódulos.....	39
3.6.2	Amplificação e sequenciamento da região gênica IGS (16S-23S rRNA).....	41
3.6.3	Amplificação do BOX-PCR.....	42
3.6.4	Experimento de autenticação da capacidade de nodular dos isolados sequenciados.....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1	Efeitos da inoculação com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> na FBN, desenvolvimento e produtividade de feijão-caupi.....	43
4.1.1	Experimento 1.....	43
4.1.2	Experimento 2.....	57

4.2	Diversidade de rizóbios em diferentes variedades de feijão-caupi.....	62
5	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa que apresenta grande importância alimentícia e econômica, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste já que é um componente alimentar básico das populações rurais e urbanas dessas regiões. Recentemente, seu consumo tem se expandido mais intensamente para as regiões Centro Oeste e Sudeste do Brasil (FREIRE FILHO et al., 2011). A região Nordeste é responsável por aproximadamente 70% da produção nacional de feijão-caupi, e Pernambuco é o quarto maior produtor da região (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2017). Em sua maior parte, a produção vem sendo feita por agricultores familiares e empresários através de técnicas tradicionais de manejo (FREIRE FILHO, 2011).

O desenvolvimento de sistemas agrícolas mais produtivos e sustentáveis é um enorme desafio, principalmente perante os potenciais impactos das mudanças climáticas projetadas para o futuro. Em algumas regiões, como o Nordeste do Brasil, são projetados declínios de produtividade devidos aos impactos do aumento de temperatura e diminuição da precipitação pluviométrica (PINTO et al., 2002). A adaptação dos sistemas de produção para enfrentar a variabilidade climática futura requer o conhecimento detalhado sobre o estado atual e o funcionamento desses sistemas no presente. Esse conhecimento é ainda muito limitado na região, devido, em primeiro lugar, à ausência de dados sobre os estoques e processos responsáveis pela ciclagem biogeoquímica.

No caso da região semiárida, com toda sua complexidade ambiental, essa é uma dificuldade particularmente grave, pois a alta variabilidade edafoclimática forma um intrincado mosaico de tipologias ambientais (MENEZES et al., 2012). Como os solos da região, em geral, são pobres em matéria orgânica e raramente são utilizados fertilizantes nitrogenados, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) tem um papel fundamental na manutenção da produtividade dos cultivos.

A FBN tem papel importante na agricultura (CARDOSO; NOGUEIRA; FERRAZ, 2007; FREITAS et al., 2007). O feijão-caupi tem capacidade de adquirir nitrogênio da atmosfera, formando uma simbiose com bactérias denominadas rizóbios. Estas bactérias formam nódulos nas raízes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Para o favorecimento da simbiose entre rizóbios e leguminosas, pode ser importante o estabelecimento de manejos que incrementem as quantidades de N fixadas. A adoção de práticas de manejo que favoreçam o processo de fixação pode acarretar redução de gastos com

fertilizantes nitrogenados, como também proporcionar maior sustentabilidade nos sistemas agrícolas. Para o estabelecimento dessas práticas, é fundamental o conhecimento dos diversos fatores que interferem nas quantidades de N fixadas nas diversas combinações de condições ambientais e de manejo nos principais sistemas de produção do Estado.

No Semiárido brasileiro ocorre o plantio de várias variedades de feijão-caupi como cultura de subsistência (FREIRE FILHO et al., 2011), devido ao teor nutricional dos seus grãos (BELANE; DAKORA, 2009). Esta cultura apresenta resistência a estresses provocados por fatores abióticos como escassez de nutrientes, altas temperaturas e estresse hídrico, condições encontradas na região semiárida. (CARVALHO et al., 2017; HALL, 2004; TIMKO; SINGH, 2008).

A inoculação com bactérias fixadoras de N pode ser uma ferramenta importante para melhorar a produtividade de feijão-caupi no Semiárido já que apresenta baixo custo (GRANGE et al., 2007), principalmente para os agricultores de pequenas propriedades e agricultura familiar que não dispõem de recursos financeiros para realizar adubação mineral nitrogenada. Atualmente, existem quatro estirpes recomendadas para a cultura no país, todas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (BRASIL, 2011). Dentre esses inoculantes, a estirpe BR 3267, foi isolada originalmente de solos da região semiárida de Pernambuco (MARTINS et al., 2003), além de estirpes de outros gêneros que recentemente tem demonstrado potencial em ajudar o desenvolvimento desta cultura, como a *Microvirga vignae* BR 3299 (RADL et al., 2014). Estudos relacionados à utilização de bactérias em diferentes variedades de feijão-caupi no Semiárido tem demonstrado que além de fatores abióticos, a interação entre bactéria e genótipo pode trazer diferentes respostas no desenvolvimento e produtividade vegetal (MARINHO et al., 2014, 2017). Os solos do semiárido podem ser um repositório de microorganismos como potencial biotecnológico e é importante realizar estudos relacionados a diversidade e eficiência de rizóbios na região em diferentes variedades de feijão-caupi afim de encontrar mais isolados que sejam eficientes com relação a FBN e produtividade e sejam adaptadas as condições de plantio na região semiárida.

Portanto, os objetivos deste trabalho foram estimar a fixação biológica de nitrogênio e a produtividade de grãos de variedades de feijão-caupi inoculadas com estirpes recomendadas e avaliar a diversidade de rizóbios naturalmente estabelecidos em solos do Semiárido que formam simbiose com a cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Feijão-caupi

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma planta herbácea anual que pertence à família Fabaceae. Pode apresentar crescimento ereto ou trepador, devido a estruturas denominadas gavinhas que se entrelaçam em outras plantas. É trifoliolada e seus pecíolos apresentam 2,5-12,5 cm de comprimento. As flores estão dispostas em ramos axilares em hastes que podem variar de 15 a 30 cm de comprimento. Possui vagens pendulares e suas sementes variam de 4 a 8 mm de comprimento, e 3 a 4 mm de largura (FAO, 2015).

Esta cultura possui grande importância alimentícia, já que seus grãos são fonte de proteínas (cerca de 23%) e carboidratos (aproximadamente 60%), e também são fonte de minerais, como Fe e Zn, como também vitaminas e fibras (BELANE; DAKORA, 2009; TIMKO; EHLERS; ROBERTS, 2007). Além disso, o feijão-caupi pode ser utilizado como alimento para o gado, e, devido à sua capacidade de fixar nitrogênio da atmosfera, também é usado na adubação verde (BELANE; DAKORA, 2009).

O feijão-caupi é originário do continente africano e foi introduzido no Brasil na segunda metade do século XVI por colonizadores portugueses no estado da Bahia, e posteriormente, disseminado por todo o país (FREIRE FILHO, 1988). Possui a capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais (EHLERS; HALL, 1997).

Em 2017, foram produzidas 5.589.216 t de feijão-caupi no mundo (FAO, 2017). A maior parte desta produção encontra-se no continente africano, no qual Nigéria e Níger são os maiores produtores mundiais (2,13 e 1,6 milhões de toneladas, respectivamente). No Brasil, são produzidos atualmente 344.752 t em uma área total de 1.066.175 ha, dos quais o Nordeste concentra a maior parte das áreas cultivadas (81,9%) e foi responsável por aproximadamente 60% do montante produzido no país (177.527 t) (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2017). Os estados que lideram a produção no Nordeste brasileiro são Ceará (55.278t), Maranhão (34.934t), Piauí (21.959 t) e Pernambuco (25.153 t) (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2017).

Apesar do feijão-caupi ser uma cultura tradicionalmente cultivada no Nordeste brasileiro, vem se expandindo para outras regiões do Brasil, principalmente para o Centro Oeste, devido à sua ampla adaptabilidade às condições tropicais e ao baixo custo de produção, e em decorrência do intenso trabalho de melhoramento aplicado à cultura nos últimos 20 anos (FREIRE FILHO et al., 2011). Mato Grosso (134.814 t), como é o maior produtor nacional de feijão-caupi, fato que se deve ao investimento de médios e grandes empresários que praticam

uma lavoura altamente tecnificada (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2017; FREIRE FILHO et al., 2011). No Nordeste, a maior parte da produção se dá no Semiárido, sendo realizada por empresários de pequenas propriedades e agricultores familiares que ainda utilizam práticas de cultivo tradicionais (FREIRE FILHO et al., 2011; FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005).

O feijão-caupi é uma cultura que apresenta grande capacidade de adaptação, sobretudo em locais que apresentam fatores de estresse que podem interferir no desenvolvimento dos vegetais, como ocorre no Semiárido nordestino. O feijão-caupi apresenta tolerância à baixa fertilidade do solo (TIMKO; SINGH, 2008), adaptação a altas temperaturas e seca (HALL, 2004).

De acordo com Freire Filho et al. (2011) os ciclos de vida do feijão-caupi são classificados em superprecoce (maturidade alcançada até 60 dias após a semeadura), precoce (61 a 70 dias), médio (71 a 90 dias), médio precoce (71 a 80 dias), médio tardio (81 a 90 dias) e tardio (a partir de 91 dias após a semeadura). Geralmente os agricultores têm optado por cultivares com ciclos mais curtos devido à mecanização da lavoura e aumento do plantio irrigado. No Nordeste, outro fator que influencia na escolha de cultivares mais precoces é a irregularidade dos períodos chuvosos (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005).

A germinação do feijão-caupi ocorre de 2-3 dias após a semeadura. A faixa de temperatura ideal para seu desenvolvimento é entre 20 °C e 35 °C, e a formação de nódulos de rizóbios ocorre preferencialmente com temperaturas variando de 24 °C a 33 °C (ARAÚJO et al., 1984; CRAUFURD et al., 1996; FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005). Apresenta metabolismo C3 sendo sua capacidade fotossintética máxima atingida a partir de 20 dias de desenvolvimento. O florescimento ocorre entre 30 e 60 dias após o plantio, porém em algumas cultivares o florescimento ocorre tardiamente (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005).

O feijão-caupi é uma planta que se adapta bem em condições de escassez de água (TURK et al., 1980) por possuir alguns mecanismos de adaptação a ambientes com estresse hídrico como a redução da área foliar e da condutância estomática, remobilização da umidade para folhas, mudança da orientação dos folíolos, retardo da senescência das folhas, aceleração ou retardo do ciclo de vida, redução da taxa de crescimento e crescimento mais profundo das raízes (SINGH; MATSUI, 2002; FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005). O requerimento de água por esta cultura desde a germinação até a formação de grão é em torno de 650 mm regularmente distribuídos (OLIVEIRA; CARVALHO, 1988).

2.2 Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas

O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para as culturas vegetais já que está presente em proteínas, ácidos nucleicos, hormônios, assim como em vários outros constituintes celulares (SOUZA; FERNANDES, 2006). Este elemento está distribuído no solo em várias formas, mas os vegetais absorvem o N na forma de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) (WILLIAMS; MILLER, 2001).

Ao longo de sua evolução biológica algumas plantas desenvolveram adaptações para ter acesso ao N de outra fonte além do solo, formando associações com micro-organismos capazes de transformar o N_2 atmosférico em NH_3 (BOTTOMLEY; MYROLD, 2015). Adicionalmente, alguns micro-organismos do solo são capazes de regular processos importantes para a transformação do N em formas utilizáveis pelas plantas (ROBERTSON; GROFFMAN, 2015).

Os organismos que compõem a microbiota capaz de fixar nitrogênio estão distribuídos nos reinos Archaea e Eubacteria e possuem o complexo de enzimas nitrogenase que hidrolisa as moléculas de ATP para realizar a redução do N_2 atmosférico. Esses micro-organismos procariotos apresentam uma grande diversidade metabólica que resulta em ampla diversificação de ambientes que podem ocupar, trazendo importantes colaborações na entrada de N em diversos ambientes (JÚNIOR; REIS, 2008).

Esses micro-organismos possuem um complexo enzimático redox-ativo chamado de nitrogenase que hidrolisa 16 moléculas de ATP e transfere 8 e^- por molécula de N_2 fixado, um processo que requer grande gasto energético. A nitrogenase é subdivida em duas subunidades: $\alpha\beta_2$ dinitrogenase e dinitrogenase redutase. A primeira apresenta um sítio ativo composto por Mo, Fe e S (MoFe_7S_9) chamada de Fe-Mo-cofator. Os genes que codificam essas nitrogenases nos micro-organismos diazotróficos são chamados de genes Nif, porém em alguns casos, certos micro-organismo produzem nitrogenases alternativas que apresentam o V ou Fe no lugar do Mo, e os genes que codificam essas nitrogenases são Vnf e Anf. O gene *nifH* codifica a nitrogenase reductase presente em todas as bactérias capazes de fixar nitrogênio, não apenas em rizóbios (PÉREZ-YÉPEZ et al., 2014).

As nitrogensases que apresentam molibdênio são mais eficientes na redução do N_2 atmosférico, seguida pela enzima que apresenta V, e a menos eficiente é a que possui o Fe. Alguns fatores podem inibir a atividade da nitrogenase como disponibilidade energética da célula, idade fisiológica, presença de alguns aminoácidos essenciais, disponibilidade de O_2 ,

quantidade excessiva de N na forma de amônio (NH_4^+) no solo (DIXON; KAHN, 2004; SOUZA; FERNANDES, 2006).

Dentre estes micro-organismos, os “rizóbios” são bactérias que formam simbiose com plantas leguminosas, colonizando as raízes do hospedeiro e formando nódulos e, em alguns casos, colonizando o caule dos vegetais (BOTTOMLEY; MYROLD, 2015; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Nessa simbiose ocorre a transferência de fotossintatos do vegetal para a bactéria fixadora de N_2 , que transfere o N fixado para a planta hospedeira (UNKOVICH et al., 2008). Os micro-organismos que são capazes de induzir nódulos em leguminosas pertencem ao filo Proteobacteria (α -proteobacteria e β -proteobacteria), distribuídos em 15 gêneros. Dentre estes, os gêneros *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Microvirga*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, e *Shinnella* pertencem à classe α -proteobacteria, enquanto que *Burkholderia*, *Cupriavidus* são β -proteobacteria (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009; MASSON-BOIVIN et al., 2009; PEIX et al., 2015; WILLEMS, 2006).

Em determinadas associações simbióticas entre rizóbios e plantas ocorre especificidade entre simbionte e hospedeiro, como o que ocorre com *Rhizobium etli* que coloniza exclusivamente o *Phaseolus vulgaris* (WILLEMS, 2006). Porém, existem plantas que podem se associar com uma grande diversidade de espécies de rizóbio (TIAN et al., 2010; WIELBO, 2012). Entre estas podemos citar o feijão-caupi, que é considerado uma planta promíscua devido à larga gama de rizóbios que podem colonizar suas raízes, incluídos os gêneros *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Microvirga*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, (RADL et al., 2014; SINGLETON; BOHLOOL; NAKAO, 1992; WILLEMS, 2006; ZHANG et al., 2007; ZILLI et al., 2006).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) em leguminosas é um processo muito importante de entrada de N tanto em ecossistemas naturais como na agricultura (CARDOSO; NOGUEIRA; FERRAZ, 2007; FREITAS et al., 2007; FREITAS et al., 2010) já que as formas do nitrogênio assimiláveis pelas plantas ocorrem em quantidades muito inferiores às de N total presente no solo (MELO et al., 1989).

Hungria e Vargas (2000) reportaram que a FBN possui um grande papel em sistemas agrícolas em solos tropicais, porque geralmente estes apresentam deficiência de N. Altas temperaturas, estresse hídrico e acidez do solo estão entre os principais fatores que inibem a nodulação das raízes de leguminosas nos trópicos. Altas temperaturas e falta de umidade são as maiores causas de falha da nodulação, afetando todos os estágios da simbiose, limitando o desenvolvimento e a sobrevivência de rizóbios no solo. A acidez afeta várias etapas no

desenvolvimento da simbiose, incluindo a troca de sinais moleculares entre a leguminosa e o microssimbionte.

Para que haja o estabelecimento da relação mutualística entre rizóbios e leguminosas, uma sequência cronológica de sinais fisiológicos deve ocorrer entre ambos (BRENCIC; WINANS, 2005). Inicialmente, substâncias chamadas de flavonóides e isoflavonóides são liberadas por células radiculares no solo, sendo responsáveis por reconhecimento do hospedeiro pelas bactérias presentes no solo (COOPER, 2004; WANG et al., 2012). Essas substâncias tem um papel importante na iniciação da simbiose porque promovem a interação com o simbionte (rizóbio), já que apresentam genes *nodD* que regulam outros genes de nodulação (*nod*) responsáveis pela síntese de sinais bioquímicos recíprocos para as raízes das plantas (GARG; GENSEIGNÉ, 2007). Os genes *nod* são responsáveis pela síntese dos fatores de nodulação, que são secretados e reconhecidos pelo hospedeiro através de receptores dos fatores de nodulação presentes na transmembrana da superfície radicular (WANG et al., 2012). Os fatores de nodulação são formados por grupos de lipochitooligosaccharídeos, responsáveis pelo desenvolvimento simbiótico na maioria das plantas leguminosas (OLDROYD et al., 2011). Além disso, os genes *nod* são relacionados à formação dos nódulos, que são estruturas especializadas onde ocorre a FBN simbiótica (MENNA; HUNGRIA, 2011). Os genes *nodA*, *B* e *C* são o núcleo dos fatores de nodulação e são muito importantes para a interação rizóbio-planta (WANG et al., 2012). O *nodC* é responsável pela codificação da N-acetilglucosaminiltransferase, responsável pelo reconhecimento do hospedeiro pelo rizóbio (ROCHE et al., 1996).

Depois do processo de sinalização, os rizóbios presentes na rizosfera, como saprófitos, geralmente penetram as raízes colonizando os pelos radiculares aderindo-se à parede celular, provocando modificações morfológicas e fisiológicas nas raízes. Ocorre inibição da expansão de células em um lado dos pelos radiculares, fazendo com que ele se enrole e envolva essas bactérias diazotróficas e formando o cordão de infecção que se ramifica e penetra no córtex radicular, provocando divisão e alargamento das células corticais. Posteriormente, a parede celular dissolve-se e os rizóbios, que nesse estágio são chamados de bacterióides, entram no nódulo por endocitose e são envolvidos por uma membrana originada pelo vegetal conhecida como membrana peribacterial formando uma estrutura chamada de simbiossoma, unidade básica de fixação de N (LA PEÑA et al., 2018). Com a formação da estrutura dos nódulos, feixes vasculares do vegetal se estendem para dentro do nódulo para permitir a troca de nutrientes entre os organismos participantes da simbiose (BOTTOMLEY; MYROLD, 2015)

2.3 Métodos para avaliação da FBN

Considerando a importância econômica e alimentícia do feijão-caupi, avaliar e quantificar o N fixado da atmosfera em diferentes situações ambientais, manejo do solo, assim como diferentes características físicas, químicas e biológicas do solo, torna-se relevante para identificar a quantidade de N aportado pelo vegetal, como também os fatores que favorecem a FBN neste cultivo. Neste sentido, estudos com isótopos estáveis têm contribuído para melhor entendimento da ciclagem de N no ambiente (PEREIRA; BENEDITO, 2007).

Chamamos de isótopos, as formas do mesmo elemento que apresentam massas atômicas diferentes e possuem semelhanças quanto a suas características químicas (FREITAS et al., 2010). Os isótopos possuem o mesmo número de prótons (número atômico Z), porém, número diferente de nêutrons (N) no núcleo atômico. Uma vez que a massa atômica (A) é dada pela soma do número de prótons e do número de nêutrons, isótopos de um mesmo elemento têm diferentes massas atômicas. Em geral, os isótopos mais “leves”, ou seja, com menor massa atômica, são mais abundantes na natureza, a exemplo do ^{14}N (99,34%), enquanto que os isótopos que possuem massa atômica maior são mais raros, a exemplo do ^{15}N (0,37%) (MARTINELLI; OMETTO; FERRAZ, 2009). Os isótopos estáveis podem ser utilizados como traçadores, ora com a utilização de material enriquecido com o isótopo estável, ora com o método da abundância natural (TRIVELIN; BOARETTO, 2002). O aparelho utilizado para ionizar moléculas e separar os íons de acordo com a razão massa/carga (m/q) é o espectrômetro de massa (“Mass Spectrometer”), que vem sendo bastante utilizado na busca de informações sobre a estrutura de compostos orgânicos, na análise de misturas orgânicas complexas, na análise elementar e na determinação da composição isotópica dos elementos (MARTINELLI; OMETTO; FERRAZ, 2009). O método da abundância natural de ^{15}N consiste na comparação entre a quantidade de ^{15}N de uma planta que apresenta capacidade de obter N oriundo do N_2 atmosférico, além do N disponibilizado no solo, com uma espécie não fixadora que tem como única fonte de N o solo (SHEARER; KOHL, 1986). Nessa comparação, o valor B é incluído na fórmula do percentual de nitrogênio derivado do ar (%N_{dda}), o qual corresponde a um fator de correção do fracionamento isotópico durante o processo de fixação do N, e representa o valor de δ de uma planta cultivada dependendo exclusivamente do N_2 do ar (HÖGBERG, 1997; SHEARER; KOHL, 1986). Outra forma de avaliar a FBN é através da utilização de material enriquecido em ^{15}N , que aumenta significativamente a diferença das concentrações de ^{15}N do solo e da atmosfera. O método da abundância natural traz menos impacto ao solo já que não

utiliza fertilizantes ou outro tipo de substrato (DANSO; BOWEN; SANGINGA, 1992), além de ser mais barato.

2.4 FBN, inoculação, produtividade e aporte de N em feijão-caupi

Estudos relacionados à avaliação de variedades capazes de fixar elevadas quantidades de N_2 são importantes para a escolha das variedades. Belane e Dakora (2009) avaliaram o desenvolvimento do cultivo, desempenho simbiótico e aporte de N em 30 variedades de feijão-caupi coletados em quatro países africanos. No primeiro ano, os valores $\delta^{15}N$ nas raízes, parte aérea e toda a planta, diferiram significativamente nas 30 variedades de feijão-caupi. Na parte aérea os valores de $\delta^{15}N$ encontrados variaram entre 1,31 ‰ e 5,1 ‰, e nas raízes entre 1,4 ‰ e 4,3 ‰. No entanto, estimativas do N derivado da atmosfera revelaram que apenas 5 das 30 variedades apresentaram valores de N derivado da fixação simbiótica acima de 50%, fato que demonstra a diferença da dependência na fixação de N_2 entre as variedades. Na segunda parte do experimento, 15 dessas variedades foram cultivadas. Os autores relataram que houve uma diminuição dos valores $\delta^{15}N$ quando comparados aos dados obtidos no primeiro ciclo do experimento (-1,1 ‰ a 0,9 ‰, na parte aérea, e 0,2 ‰ a 2,2 ‰, nas raízes). As variedades IT84S-2246, Mchanganyiko, Sanzie, IT93K-2045-29, 1T93K-452-1, Ngonji and TVu11424 destacaram-se e foram capazes de fixar quantidades entre 61 e 171,2 kg ha⁻¹.

Freitas et al. (2012) realizaram um experimento de campo no Centro Agroecológico São Miguel, no município de Esperança, Paraíba, com o objetivo de estimar a FBN e a produtividades de variedades locais (Cariri, Sedinha, Corujinha, Canapu, Sempre Verde, Azul e Costela de Vaca). Essas variedades foram submetidas, ou não, à adubação com material enriquecido com ^{15}N (20 kg ha⁻¹) com três tipos de tratamento com inoculação. Os tratamentos de inoculação consistiam de duas espécies de *Bradyrhizobium*, inoculadas separadamente e tratamento controle sem inoculação. Para estimar a FBN foi utilizado o método de diluição isotópica e foi determinada a biomassa da parte aérea para a avaliação da produtividade. A cultivar Corujinha apresentou maior produtividade de grãos (1147 kg ha⁻¹) diferindo significativamente da Canapu (790 kg ha⁻¹), Sedinha (780 kg ha⁻¹) e Costela de Vaca (381 kg ha⁻¹) apresentou a menor produtividade dentre as cultivares testadas. Costela de Vaca teve o maior aporte de biomassa aérea (2,3 t ha⁻¹), porém, por ter apresentado a menor produtividade de grãos teve o menor índice de colheita (0,14) contra (0,37 e 0,47) das outras variedades. Não

houve diferença significativa na produção de grãos e biomassa aérea devido à fertilização com N.

Freitas et al. (2012) também observaram que a inoculação com as espécies de *Bradyrhizobium* não trouxe aumento significativo na produção de grãos quando comparadas ao tratamento controle, mas houve tendência de menores quantidades quando as plantas não inoculadas foram submetidas a fertilização com N. Essa tendência refletiu no total de N e no N fixados pelas plantas. A cultivar Costela de Vaca além de ter apresentado maior produção de biomassa aérea apresentou maior quantidade de N acumulado na parte aérea ($52,7 \text{ kg ha}^{-1}$), enquanto as outras variedades acumularam entre $14,5$ e $26,8 \text{ kg ha}^{-1}$. Esta variedade também apresentou maior percentual de N oriundo da FBN (79%), correspondendo a 45 kg N ha^{-1} . Não houve diferença significada na quantidade de N na parte aérea (palha e grãos), mas as plantas que não foram inoculadas apresentaram menos N do que as que foram inoculadas com as estirpes BR20001 (38 kg ha^{-1}) e EI6 (61 kg ha^{-1}). Isto sugere que as bactérias dos inoculantes utilizados podem ser mais eficientes do que a bactérias nativas.

Barbosa et al. (2013) realizaram um trabalho a fim de investigar o efeito da inoculação com *Bradyrhizobium* spp. (estirpe BR 3256) no metabolismo do nitrogênio e crescimento de duas cultivares de *Vigna unguiculata* L. contrastantes (uma tolerante a estresse hídrico e uma sensível), em casa de vegetação. As variáveis avaliadas foram teor relativo de água da folha, atividade da redutase do nitrato, compostos de nitrogênio, e os parâmetros de crescimento. Ambas as cultivares apresentaram aumentos em nitrato e prolina, em comparação com as plantas não-inoculadas. A deficiência hídrica induziu reduções mais intensas na matéria seca das plantas não-inoculadas que nas plantas inoculadas. A inoculação também proporcionou aumento da matéria seca da parte aérea.

A inoculação com estirpes de rizóbio pode incrementar a nutrição das plantas como também a qualidade do solo (GRÖNEMEYER et al., 2014), porém o desempenho das estirpes pode ser influenciado por diversos fatores pedoclimáticos e também pela variedade da planta hospedeira (HIRSCH, 1996).

Em 1985, foi realizada a primeira reunião para definir inoculantes e tecnologias de inoculação - a RELARE, (Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola). Desde então, para que haja a recomendação de estirpes de rizóbios como inoculantes comerciais, devem ser seguidas normas de recomendação da RELARE (RELARE, 1985; CAMPOS & HUNGRIA, 2007). A estirpe BR 2001, originada da Libéria – África, foi registrada para a produção de inoculantes comerciais para a cultura do feijão-caupi na RELARE de 1985, porém estudos posteriores

realizados para avaliar a eficiência desta estirpe demonstraram que o desempenho da BR 2001 era inferior a outras estirpes de rizóbios que foram encontradas em solos brasileiros (LACERDA et al., 2004; MARTINS et al., 2003).

Martins et al. (2003) avaliaram a contribuição da FBN para o cultivo de feijão-caupi na região semiárida do Nordeste. Dez estirpes de rizóbio foram testadas na cultivar de feijão-caupi IPA 207, a fim de selecionar as que fossem capazes de garantir a quantidade de N necessária para o desenvolvimento dessa cultura em áreas não irrigadas. Foram realizados experimentos de campo em uma área próxima a Petrolina por dois anos consecutivos no período chuvoso, e dentre as estirpes testadas a BR 3267 mostrou eficiente nodulação. No primeiro ano, foi relatado um total de 30 nódulos por planta para o tratamento inoculado com BR 3267, sendo superada apenas pelas estirpes BR 3271 e BR 3269 que apresentaram valores próximos a 35 nódulos, enquanto que no segundo ano houve uma queda na nodulação para 25 nódulos por planta. As plantas inoculadas com a BR 3267 produziram 693 kg ha^{-1} de grãos no primeiro ano, similar à produção no tratamento com adição de 50 kg N ha^{-1} , e N acumulado nos grãos s em torno de 6g por planta. No segundo o ano a produtividade de grãos foi de 440 kg ha^{-1} . Os autores relataram que no segundo ano, houve um período maior de estiagem que impôs condições severas de estresse nas plantas e que influenciou para diminuição da nodulação e produtividade de grãos.

Lacerda et al. (2004) relataram o efeito da inoculação com estirpes no feijão-caupi. Foram realizados dois ensaios em casa de vegetação utilizando as cultivares BR 14-Mulato e BR 08-Caldeirão cultivados em vasos com Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico. Ao todo foram testadas 10 estirpes (BR 2001, UFLA 03-25, UFLA 03-39, UFLA 03-35 UFLA 03-36, UFLA 03-84, UFLA 03-129, UFLA 03-128, UFLA 03-170 e INPA 03-11B) para que dentre estas as mais eficientes fossem escolhidas para serem utilizadas em ensaios de campo. A BR 2001 que até então era uma estirpe recomendada para a inoculação do feijão-caupi, teve resultados inferiores as das outras estirpes. No ensaio em casa de vegetação, a BR 2001 levou a menor número de nódulos (NN) por planta (89) e matéria seca dos nódulos ($374 \text{ mg planta}^{-1}$), enquanto que a INPA 03-11B destacou-se com o maior número por planta (127). Na matéria seca da parte aérea (MSPA) houve interação significativa entre as cultivares de feijão-caupi e a rizóbios. As estirpes UFLA 03-35, UFLA 03-36 e UFLA 03-129 destacaram-se quando inoculadas na BR 08 Caldeirão, tendo valores de MSPA que em torno de 8 g planta^{-1} enquanto que a BR 2001 apresentou o menor valor ($6,7 \text{ g planta}^{-1}$). Na cultivar BR 14 Mulato, a UFLA 03-36 teve maior contribuição para MSPA ($7,9 \text{ g planta}^{-1}$) e o tratamento com a inoculação com a BR 2001 novamente apresentou MSPA inferior as demais estirpes. No ensaio realizado em

campo, a inoculação com as estirpes INPA03-11B, UFLA 03-36, UFLA 03-129 e UFLA 03-84 aumentou o rendimento de grãos pelo caupi de 23,7 a 31,2% quando comparado aos das plantas não inoculadas e sem adubação mineral (1021 kg ha^{-1}) e com valores equivalentes ao tratamento adubado com 70 kg N ha^{-1} (1413 kg ha^{-1}).

Em 2006, as estirpes SEMIA 6461 (=UFLA 3-84), SEMIA 6462 (=BR3267) e SEMIA 6463 (=INPA 03-11B) foram aprovadas pela RELARE e recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como inoculantes comerciais para a cultura do feijão-caupi substituindo a SEMIA 6145 (=BR 2001) (CAMPO & HUNGRIA, 2007).

Zilli et al. (2009) avaliaram a contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima, testando as três estirpes que já estavam sendo recomendadas para esta cultura (UFLA 3-84, BR 3267 e INPA 03-11B), além de duas outras estirpes (BR 3262 e 3299). Foram realizados experimentos em campo em uma área de cerrado e em uma área de mata, por dois anos, de acordo com as normas da RELARE (Campos & Hungria, 2007). Nos tratamentos inoculados com a BR 3262 o número e a massa seca dos nódulos foram significativamente maiores que o controle (sem inoculação e adubação nitrogenada). A média do número e massa de nódulos foi de 30,4 e $203 \text{ mg planta}^{-1}$, respectivamente, enquanto que no controle foram 25,6 nódulos e $167,2 \text{ mg planta}^{-1}$. A estirpe BR 3262 proporcionou uma média de 1700 kg ha^{-1} de grãos, sendo similar ao observado no tratamento adubado com 50 kg N ha^{-1} , enquanto que as médias das demais estirpes foram em torno de 1600 kg ha^{-1} .

Trabalhos envolvendo pesquisas com estirpes de bactérias diazotróficas têm sido importantes para escolha de inoculantes que favorecem o desenvolvimento do feijão-caupi. Atualmente, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* estão autorizadas para o uso na produção comercial de inoculantes de caupi no Brasil: *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6461 (=UFLA 3-84), *B. yuanmingense* SEMIA 6462 (=BR3267), *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6463 (=INPA 03-11B) e *B. pachyrhiz* SEMIA 6464 (= BR3262) (MARINHO et al., 2014, 2017; ZILLI et al., 2009) BRASIL, 2011).

Marinho et al. (2014) avaliaram a contribuição de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio, na produção de grãos de novas cultivares de feijão-caupi, indicadas para cultivo no Semiárido brasileiro, no Submédio do Vale do Rio São Francisco. Os experimentos foram realizados em duas estações experimentais da Embrapa Semiárido (Bebedouro e Mandacaru). Foram utilizadas cinco estirpes de rizóbio – BR 3267, BR 3262, INPA 03-11B, UFLA 03-84 (*Bradyrhizobium* sp.) e BR 3299^T (*Microvirga vignae*), sendo todas inoculadas

isoladamente, além de um tratamento com nitrogênio e de um controle sem inoculação ou aplicação de N. As cultivares de feijão-caupi avaliadas foram: BRS Pujante, BRS Tapaihum, BRS Carijó e BRS Acauã. Os autores relataram que as plantas inoculadas apresentaram produtividades de grãos similares às das plantas adubadas com 80 kg ha⁻¹ de N. As cultivares BRS Tapaihum e BRS Pujante destacaram-se quanto à produtividade e ao teor de proteínas nos grãos. A produtividade de grãos variou entre 1.091 e 1.629 kg ha⁻¹ no experimento realizado na estação Mandacaru e entre 817 e 1.824 kg ha⁻¹, na estação Bebedouro.

Rufini et al. (2014) avaliaram a eficiência agrônômica das estirpes UFLA 03-84, INPA 03-11B, e BR 3267 na cultivar de BR 17 Gurguéia, em um Latossolo Vermelho eutrófico, em Lavras. No teste de campo houve diferença significativa no N acumulado na parte aérea, onde o único tratamento afetado positivamente foi o que recebeu adubação mineral de N que apresentou o maior valor (595, 4 mg planta⁻¹). O N acumulado na parte aérea dos demais tratamentos variou entre 296,8 mg planta⁻¹ no controle absoluto, e 378, 8 mg planta⁻¹ no tratamento inoculado com a INPA 03-11B. Não houve diferença significativa entre as estirpes de referência e nem destas em relação ao controle adubado com N mineral. A BR 3267 proporcionou um ligeiro aumento na produção de grãos mas não foi significativo em relação as demais estirpes e aos tratamentos controle. A produtividade de grãos variou entre 1269,8 (controle absoluto) e 1381,9 kg ha⁻¹ (BR 3267). Esses dados sugerem que rizóbios nativos apresentam eficiência no fornecimento de N e na produtividade de grãos similar as estirpes recomendadas.

2.5 Técnicas moleculares no estudo de comunidades de bactérias diazotróficas

2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase, em inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR), técnica que foi desenvolvida por Katy Mullis em 1983, possibilitou grandes avanços na biologia molecular. A PCR é uma reação enzimática que permite a amplificação de um fragmento específico de DNA a partir de amostras de DNA em vários tecidos e organismos. Através de pequenas quantidades de DNA é possível gerar várias cópias do fragmento em questão (MULLIS, 1990).

A PCR requer a presença do DNA *template* (DNA que contém o fragmento de DNA que será amplificado), *primers*, nucleotídeos, *buffer*, e DNA Polimerase (Taq Polimerase). Os *primers* são pequenos fragmentos artificiais de DNA que servem como marcadores do início e fim da região do DNA que será amplificada. Eles aderem no DNA *template*, e indicam onde a DNA polimerase vai se ligar e iniciar a síntese de uma nova cadeia de DNA (RAHMAN et al., 2013). Os nucleotídeos (desoxirribonucleotídeos trifosfatados - dNTP's) são quatro bases nitrogenadas, adenina, timina, citosina e guanina (A, T, G, C), que compõe a cadeia de DNA. Os nucleotídeos são adicionados na PCR para compor o DNA que está sendo amplificado. *Buffer* ou tampão é uma solução que tem como objetivo estabilizar os reagentes e o produto da PCR (VARMA; OELMÜLLER, 2007).

DNA Polimerase é a enzima chave para ligar o nucleotídeo e formar novas cadeias de DNA do fragmento alvo. A Taq Polymerase, inicialmente extraída da bactéria *Thermus aquaticus* (que vive em altas temperaturas), é estável e ativa em altas temperaturas, sendo produzida atualmente por bactérias geneticamente modificadas (MULLIS, 1990; VARMA; OELMÜLLER, 2007).

A técnica de PCR é baseada em três passos: 1) desnaturação da dupla fita (cadeia dupla de DNA) a partir da elevação da temperatura (em torno de 90°C); 2) anelamento dos primers com cada fragmento original para síntese de novos fragmentos, em 50°C; e 3) extensão, no qual a polimerase começa a ligar os nucleotídeos adicionados na reação com PCR para a síntese de várias cópias da região de DNA amplificada. Este processo ocorre em temperatura em torno de 60 °C. O termociclador é o aparelho utilizado para que este ciclo ocorra várias vezes para chegar ao resultado desejado (DELIDOW et al., 1993; VARMA; OELMÜLLER, 2007).

2.5.2 Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP)

A análise de Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) consiste na diferenciação em sequências homologas de sequências de DNA que podem ser detectadas pela variação do número e tamanho de fragmentos diferentes após a digestão das amostras de DNA em estudo por endonucleases de restrição específicas (WILLIAMS, 1989). A digestão do DNA amplificado por PCR pelas enzimas de restrição gera perfis com diferentes padrões que são utilizados na diferenciação dos isolados.

Estudos relacionados ao uso da técnica do RFLP têm sido utilizados desde a década de 1990 (DEMEZAS et al., 1991; LAGUERRE; MAVINGUI; ALLARD, 1996), como ferramenta

auxiliar nos trabalhos relacionados à taxonomia de bactérias. A técnica do RFLP por si só não é capaz de trazer respostas significativas com relação à taxonomia de rizóbios, mas, a partir da análise de agrupamento dos isolados, é possível escolher aqueles que são representativos dos grupos encontrados para o sequenciamento dos genes 16S rRNA, IGS, genes constitutivos (housekeeping) e genes simbióticos que determinam a posição filogenética do isolados em estudo (DALL'AGNOL et al., 2016; PUOZAA; JAISWAL; DAKORA, 2017).

Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) é baseada nas variações de sequências de DNA presentes no produto de PCR amplificado da região 16S rRNA. O produto amplificado da PCR do DNA alvo é geralmente digerido por enzimas de restrição (endonucleases) e analisado em gel de agarose ou poliacrilamida (SMIT; LEEFLANG; WERNARS, 1997).

A utilização do 16S rRNA como único marcador pode trazer problemas na identificação de espécies ou estirpes muito próximas, devido à presença de múltiplas cópias no genoma de algumas bactérias, susceptibilidade para recombinação gênica e transferência horizontal de gene, e baixa divergência entre espécies muito próximas (GERMANO et al., 2006; JAISWAL; MSIMBIRA; DAKORA, 2017; MARTENS et al., 2007). Por isso, alguns trabalho tem sido desenvolvidos utilizando o RFLP da região IGS (16S – 23S rRNA) a fim de elucidar se esta apresenta maior poder de discriminação entre espécies ou estirpes diferentes (JAISWAL; MSIMBIRA; DAKORA, 2017; TAMPAKAKI et al., 2017a). Jaiswal et al. (2017) investigaram a diversidade de bactérias diazotróficas isoladas de nódulos extraídos de raízes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), na África do Sul. Neste trabalho, 71 isolados foram obtidos e submetidos à amplificação da região gênica IGS (16S-23S rRNA). Todos os isolados apresentaram uma banda única em gel de agarose. O RFLP da região IGS neste trabalho apresentou um grande poder discriminatório de espécies muito próximas, demonstrando uma grande diversidade de rizóbios pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, capazes de nodular as raízes de amendoim na África do Sul, confirmadas através do sequenciamento e de análises filogenéticas dos genes 16S rRNA e IGS e MLSA de genes *housekeeping*.

2.5.3 Rep-PCR baseadas em fragmentos de DNA repetitivo

A análise de genes ribossomais não consegue diferenciar estirpes, por isso outros métodos têm sido estudados para melhor prospecção da diversidade e caracterização genotípica de estirpes de bactérias (MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009).

A rep-PCR (*repetitive-sequence-based-PCR*) é uma técnica que consiste na amplificação de elementos repetitivos de DNA dispersos no genoma, que geralmente estão localizados no espaço intergênico, e têm trazido resultados interessantes para bactérias, incluindo rizóbios (MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009). Três conjuntos principais de elementos repetitivos que têm sido utilizados na tipagem (*typing*) de bactérias: REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) (35-40 pb) (STERN et al., 1984), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) (124-127 pb) (HULTON; HIGGINS; SHARP, 1991) e BOX—box A (54 pb), box B (43 pb) e box C (50 pb) (MARTIN et al., 1992). A classe BOX consiste de subunidades conservadas, porém a box A tem se mostrado altamente conservada para bactérias (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995).

2.5.4 Análise de sequencias multilocus (MLSA) e genes simbióticos

O 16S rRNA é considerado um bom marcador molecular para a identificação de rizóbios em nível de gênero, porém apresenta alguns problemas para determinação de espécies (KALITA; MAŁEK, 2017). Portanto, a região 16S rRNA deve ser utilizada, preferencialmente, em estudos de taxonomia e filogenia (HUNGRIA et al., 2008).

De acordo com YARZA et al. (2014), sequências de gene 16S rRNA que apresentam índices de similaridade abaixo de 98,7% podem indicar que os isolados podem ser de espécies diferentes. Novas espécies de *Bradyrhizobium* têm sido descritas recentemente e, na maioria dos casos, estas espécies apresentam índices de similaridade iguais ou superiores a 99,5% do sequenciamento da região 16S rRNA. Isso demonstra que índices de similaridade acima de 98,7% nem sempre indicam que dois isolados pertencem à mesma espécie (KALITA; MAŁEK, 2017). Por isso, torna-se necessário realizar o sequenciamento de outros genes para que a identificação em nível de espécie seja mais eficiente.

A utilização de genes constitutivos (*housekeeping genes*) tem sido muito útil para a taxonomia e identificação de bactérias, incluindo vários grupos de rizóbios. Análise de sequências multilocus, *Multilocus sequence analysis* (MLSA) em inglês, é o termo utilizado para designar análise de sequências de múltiplos genes codificadores de proteína para aplicações taxonômicas para o delineamento de espécies dentro de um gênero. A MLSA tem resultado na maior resolução das árvores filogenéticas, favorecendo a diferenciação dos isolados em nível de espécies (GLAESER; KÄMPFER, 2015). Os *housekeeping genes* são utilizados nas análises de MLSA porque codificam proteínas com funções celulares importantes

e são estáveis, não são suscetíveis a mudanças genéticas rápidas (GLAESER; KÄMPFER, 2015).

É recomendado a utilização de pelo menos quatro genes, embora frequentemente se utilizem menos (ZEIGLER, 2003). Em estudos relacionados à diversidade de rizóbios geralmente são utilizados os genes *gyrB*, (DNA gyrase B) *rpoB* (RNA polymerase), *recA* (DNA recombination protein), *atpD* (ATP synthase), *glnII* (glutamine synthetase II) e *dnaK* (Chaperone protein), que são genes amplamente encontrados nesse grupo de bactérias (CHIBEBA et al., 2017; DALL'AGNOL et al., 2016; PUOZAA; JAISWAL; DAKORA, 2017; TAMPAKAKI et al., 2017a).

No estudo realizado por Tampakaki et al. (2017), as árvores filogenéticas separadas e concatenadas de três genes *housekeeping* foram importantes para discriminação de alguns isolados que apresentaram índices de similaridade acima de 99% com estirpes relacionadas às linhagens *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* na árvore filogenética do 16S rRNA e IGS, além de reportar possíveis novas espécies. O isolado VUEP21 na árvore do 16S rRNA ficou agrupado com *B. japonicum* USDA 6^T(99.9%) e, após análises filogenéticas com os genes *recA*, *glnII* e *gyrB*, foi verificado que esse isolado pode se tratar de uma nova espécie já que apresentou similaridade inferiores a 96,5% para as árvores analisadas separadamente com *B. liaoningense* USDA 3622^T, enquanto que na árvore concatenada este isolado apresentou 94,5% de similaridade com *B. liaoningense* USDA 3622^T.

A MSLA trouxe avanços relacionados à taxonomia de rizóbios proporcionando maior definição em nível específico, sendo muito importante para estudos de diversidade desse grupo de organismos. Apesar da grande relevância, estudos taxonômicos desse grupo de bactérias não refletem de maneira global as características simbióticas, principalmente a gama de hospedeiro que estas bactérias podem se associar (LAGUERRE et al., 2001). A definição da gama de hospedeiros é necessária, já que é sabido que muitas bactérias são capazes de nodular diferentes espécies de leguminosas assim como uma planta hospedeira pode ser nodulada por várias espécies de bactérias diazotróficas (LAGUERRE et al., 2001). Por isso, pesquisas relacionadas à diversidade e filogenia dos genes simbióticos, tornam-se importantes para elucidar questões inerentes a amplitude de hospedeiros que determinados rizóbios são capazes de nodular, e serem aplicadas em estudos de eficiência e posteriormente utilizados para incrementar a produção nos sistemas agrícolas, sobretudo em culturas com grande importância alimentícia e econômica.

De acordo com as características simbióticas e análises filogenéticas dos genes simbióticos, os rizóbios podem ser classificados em simbiovares (simbiotic variant). Esta

classificação visa agrupar estirpes dentro de espécies que são capazes de se associar a uma leguminosa específica (PEIX et al., 2015; ROGEL; ORMEÑO-ORRILLO; MARTINEZ ROMERO, 2011). A maioria das simbiovares descritas foram definidas baseadas nas análises do gene *nodC* em bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*. Atualmente, existem 25 simbiovares descritas: *caliandrae*, *mimosae*, *phaseoli*, *officinalis*, *orientalis*, *galicum viciae*, *trifolii*, *mediterraneense*, *acaciallae*, *fredii*, *lancerottense*, *medicaginis*, *melioti*, *rigiduloides*, *acacieae*, *sesbanie*, *ciceri*, *biserrulae*, *loti*, *genistarum*, *glycinearum*, *retamae*, *sierranevadense*, *vignae* e *aegeanense* (PEIX et al., 2015; TAMPAKAKI et al., 2017b). Os genes simbióticos *nodC* e *nifH* são extensamente utilizados para investigar a amplitude de hospedeiros dos rizóbios e o nível de promiscuidade das plantas hospedeiras (LAGUERRE et al., 2001; PERRET et al., 2000). Esses genes simbióticos estão localizados em plasmídeos ou ilhas simbióticas, e podem ser transferidos lateralmente entre diferentes espécies que pertencem ao mesmo gênero e, raramente, espécies de gêneros diferentes (YOUNG, 2016).

2.5.5 Diversidade de bactérias diazotróficas em feijão-caupi

Zilli et al. (2004) avaliaram a diversidade de rizóbios em solos do cerrado no Piauí utilizando o feijão-caupi como planta hospedeira. O feijão-caupi foi cultivado em sete diferentes amostras de solo de áreas previamente cultivadas com soja e ou em sistemas de rodízio de cultura entre arroz e caupi, além de uma área com vegetação típica de cerrado. Foram utilizados métodos fenotípicos e moleculares (ARDRA 16S) para a identificação dos rizóbios. Os dados morfológicos mostraram que as bactérias formaram 20 grupos morfológicos que apresentaram isolados similares a *Bradyrhizobium elkanii* ou *B. japonicum*. Além disso, houve correlação inversa entre o número de cultivo de leguminosas e a diversidade de rizóbios, de acordo com o histórico de cada área, o que sugere a introdução de leguminosas é capaz de selecionar determinados taxa de rizóbios. As análises moleculares mostram que em três áreas onde havia o cultivo de feijão-caupi, houve predominância de isolados do grupo de *B. elkanii*.

Com o objetivo de caracterizar a diversidade morfológica e genética de isolados de amostras de solo coletadas na região do submédio do vale do rio São Francisco, Leite et al. (2009) cultivaram cinco variedades de feijão-caupi (IPA 206, BRS Pujante, BRS Marataoã, Canapu Roxo e Sempre Verde) em sete amostras de solos classificadas de acordo com o seu sistema de uso. Nesse trabalho, 581 isolados formaram 49 grupos morfológicos e foram associados com as variedades de feijão-caupi estudadas. Os maiores índices de riqueza e diversidade foram encontrados nos solos que apresentaram sistema de produção orgânica de

milho consorciado com feijão-caupi. Entre as variedades, a variedade Canapu apresentou índices de diversidade 40% maiores do que a IPA 206, variedade com os menores índices.

Em estudo sobre diversidade genética de isolados de rizóbios em solos da Amazônia utilizando o feijão-caupi como hospedeiro, Silva et al. (2012) registraram a ocorrência de 188 isolados, 32 recuperados na floresta nativa, 31 na área com 18 anos de recuperação, 32 na área com 5 anos de recuperação e 34 no local com 5 anos de recuperação enriquecida com *Parkia multijuga* Benth., *Swietenia macrophylla* King., *Bertholletia excelsa* Bonpl. e *Hevea brasiliensis* Muel. Arg., 29 em uma área de policultura utilizando as espécies *Bertholletia excelsa* Bonpl., *Bactris gasipaes* Kunth. e *Theobroma grandiflorum* Schum. e 30 em uma monocultura de *Theobroma grandiflorum* Schum. Os autores observaram que, com base em perfis da ARDRA, a área nativa apresentava isolados diferentes em relação aos demais locais estudados.

Florentino et al. (2010) avaliaram a diversidade genética de 10 estirpes de *Bradyrhizobium* no feijão-caupi, sendo oito isoladas de amostras de solos coletadas próximo ao sistema radicular de *Sesbania virgata* (Cav. Pers) (Leguminosa), no Sul de Minas Gerais, e duas recomendadas como inoculante para o feijão-caupi (UFLA 03–84/Semia 6461) e INPA 03–11B/Semia 6463) usadas como referências. Para a análise de diversidade genética, foi utilizada a técnica do rep-PCR, com o primer BOX, que revelou alta diversidade já que cada estirpe apresentou perfil único de DNA. O maior nível de similaridade (66%) foi encontrado nas estirpes UFLA 03–33 and UFLA 03–38. De acordo com os autores esses dados corroboram a capacidade do primer BOX em discriminar as estirpes de bactérias.

Guimarães et al. (2012) também utilizaram a técnica de BOX-PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA para avaliar a diversidade genética de 119 isolados de bactérias diazotróficas provenientes de solos da região do alto Solimões (oeste da Amazônia). A variedade de feijão-caupi BR14 Mulato foi utilizada como hospedeiro e os solos diferenciados pelo sistema de uso na região: floresta primária, floresta secundária no estágio avançado de regeneração, floresta secundária no estado inicial de regeneração, sistema agroflorestal, agricultura e pastagem. Dentre os isolados testados, 64 foram autenticados quanto à capacidade de nodular, incluindo as estirpes referência *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424T, *Burkholderia sabiae* BR3405, *Azorhizobium doebereineriae* BR5401T, *Bradyrhizobium* sp. UFLA03-84, *Bradyrhizobium elkanii* INPA 3-11B, *Mesorhizobium plurifarium* BR3804, e *Azorhizobium caulinodans* ORS571T. A análise molecular revelou alta diversidade em 52 dos 62 isolados que nodularam o feijão-caupi. Houve predominância de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, que também apresentou maior diversidade.

Krasova-Wade et al. (2014) avaliaram a diversidade genética de rizóbios em quatro diferentes zonas eco-geográficas no Senegal (Peanut basin, Eastern Senegal, Senegal River valley and Natural region of Casamance) em locais onde há o cultivo feijão-caupi. Cerca de 300 nódulos foram analisados e o sequenciamento da região 16S-23S r DNA, região intergênica (IGS), mostrou que todos os genótipos foram agrupados no gênero *Bradyrhizobium*. No total, 19 tipos IGS foram encontrados e houve predominância de dois genótipos. O IGS tipo I e VI foram predominantes e representaram 84% dos isolados (74% e 14%, respectivamente). O IGS tipo I foi dominante em três regiões ecogeográficas, representando entre 95% e 100% dos nódulos nessas regiões, porém na Senegal River valley, zona onde foi encontrada a maior diversidade de espécies de *Bradyrhizobium*, representou apenas 1,3% dos nódulos. Senegal River valley zone diferiu significativamente das outras regiões em aspectos pedo-climáticos como pH, silte, areia fina e precipitação anual média. Essa região apresenta baixa precipitação e solos levemente alcalinos. O IGS tipo VI foi o segundo mais representativo (53% dos nódulos), porém foi encontrado exclusivamente na região Senegal River Valley. Além do IGS tipo II, oito tipos IGS também foram encontrados exclusivamente nessa região, três na Peanut basin, dois na Eastern Senegal zone. Esses resultados indicam que parâmetros climáticos e do solo podem influenciar a diversidade de rizóbios no feijão-caupi. Além disso, foram realizadas análises do sequenciamento parcial de seis *housekeeping* genes dos dois genótipos predominantes (IGS tipo I e IGS tipo VI), que releveram uma linhagem mais próxima da *B. yuanmingense* e que provavelmente podem ser dois novos táxons.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e delineamento experimental

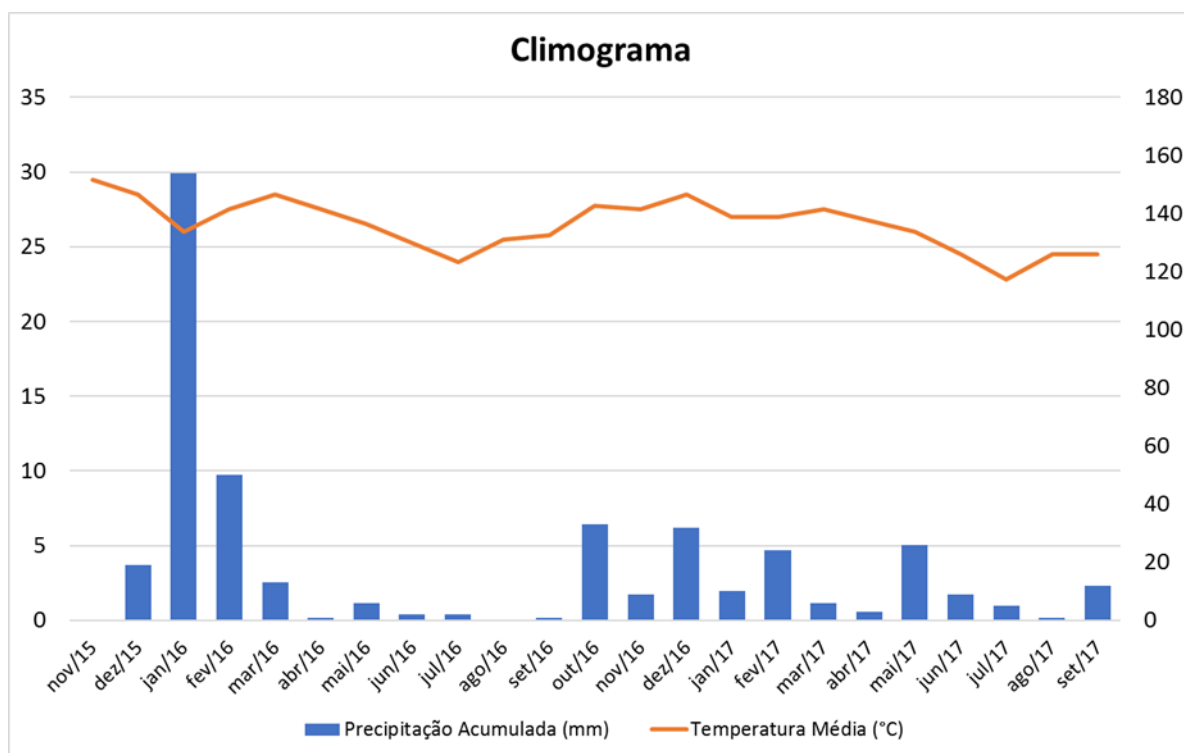
Foram realizados dois experimentos em campo na estação experimental de Bebedouro, que pertence à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Semiárido), localizada em Petrolina, Sertão de Pernambuco (09°09'S; 40°22'W). Os experimentos foram lançados na mesma área, de maneira sucessiva, sendo o primeiro conduzido de maio a julho de 2016, e o segundo de julho a setembro de 2017. Antes da implantação dos experimentos, amostras de solo foram coletadas para análises químicas e físicas (Tabela 1) (EMBRAPA, 2009). O solo da estação experimental de Bebedouro é classificado como Ultissolo Distrófico amarelo-vermelho. De novembro de 2015 a setembro de 2017, a precipitação acumulada foi 418 mm e temperatura média 26 °C (Fig.1).

Tabela 1. Análise química e física do solo da estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE.

Química do solo									
Profundidade	C.E. mS cm ⁻¹	pH H ₂ O	C g kg ⁻¹	P mg dm ⁻³	K	Na	Ca	Mg	Al
					cmol _c dm ⁻³				
0-20 cm	0,21	6,1	4,9	33,3	0,29	0,05	2,6	1	0

Cont. Química do Solo								
Profundidade	H+Al	SB	CTC	V	Cu	Fe	Mn	Zn
		cmol _c dm ⁻³		%	cm _c dm ⁻³			
0-20 cm	2	3,9	5,9	66,8	0,07	0,7	1,4	0,46

Física do Solo						
Profundidade	Densidade		Porosidade	Granulometria		
	Solo	Partículas	Total	Areia total	Silte	Argila
	kg dm ⁻³		%	g kg ⁻¹		
0-20 cm	1,59	2,5	36,4	902	67	31

**Figura 1.** Climograma com temperatura e precipitação no período em que os experimentos foram realizados na estação experimental de Bebedouro (Embrapa Semiárido). Fonte: Embrapa Semiárido e Agritempo.

O primeiro experimento seguiu um arranjo fatorial 10 x 6, em que foram testadas 10 variedades de feijão-caupi, cultivadas com ou sem inoculação com quatro estirpes de bactérias diazotróficas ou recebendo adubação nitrogenada ($80 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$, na forma de ureia), além de um tratamento controle sem inoculação e sem adubação nitrogenada. A adubação nitrogenada foi realizada de maneira fracionada, em que foi aplicada a metade da quantidade de uréia cinco DAP nas parcelas do controle nitrogenado, e a segunda parte foi adicionada 15 DAP. As variedades de feijão-caupi foram: BRS Acauã, BRS Imponente, BRS Nova Era, BRS Marataoã, BRS Pajeú, BRS Potengi, BRS Pujante, BRS Tapaihum, BRS Tumucumaque, e BRS Xiquexique. Essas variedades são recomendadas para a região Nordeste (NEVES et al., 2011). As bactérias foram: BR 3262 (*Bradyrhizobium pachyrhizi*), BR 3267 (*Bradyrhizobium yuanmingense*), INPA 03-11B (*Bradyrhizobium* sp.) e UFLA 03-84 (*Bradyrhizobium* sp.) recomendadas nacionalmente para inoculação da cultura (BRASIL, 2011; LEITE et al., 2018). As sementes das variedades de feijão-caupi testadas neste estudo foram imersas em uma solução de sacarose com inoculante turfoso, sedido pela Embrapa Agrobiologia -RJ, de cada estirpe individualmente.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. As parcelas experimentais eram de $7,5 \text{ m}^2$, consistindo em cinco linhas de 3 m de comprimento, considerando como área útil as três fileiras centrais, espaçadas de 0,50 m e as plantas foram espaçadas de 0,20 m na fileira. Parcelas extras foram adicionadas para cultivo de plantas referência (girassol, algodão e mamona) para estimativa da FBN por meio da técnica da abundância natural do ^{15}N .

No segundo experimento, o arranjo fatorial 5 x 6, em blocos casualizados com quatro repetições em uma área ao lado de onde foi realizado o primeiro experimentando. Foram testadas as cinco variedades que tiveram desempenho discrepantes no primeiro experimento nas variáveis relacionadas a produtividade, que também foram cultivadas com ou sem inoculação com as mesmas quatro estirpes de bactérias recomendadas ou recebendo adubação nitrogenada ($80 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$, na forma de ureia), além de um tratamento controle sem inoculação e sem adubação nitrogenada.. As variedades de feijão-caupi utilizadas foram: BRS Imponente, BRS Marataoã, BRS Pujante, BRS Tapaihum e BRS Tumucumaque.

Ambos os experimentos receberam adubação basal com $20 \text{ kg ha}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$, usando superfosfato simples, e, $20 \text{ kg ha}^{-1} \text{ K}_2\text{O}$ com o cloreto de potássio. O campo foi irrigado por gotejamento com uma mangueira por linha de plantas e foram capinas quinzenais de plantas daninhas. As estimativas da FBN e produção de biomassa e foram realizadas da mesma forma

nos dois experimentos. A área na estação experimental de Bebedouro em que os experimentos foram conduzidos, apresentam histórico de plantio de melancia e cebola antes do primeiro experimento em 2016, e de milho onde foi realizado o segundo experimento.

3.2 Avaliação da produção de biomassa aérea

A coleta da parte aérea (ramos + folhas) também foi realizada 45 DAP. As amostras foram coletadas de uma área útil de 1 m² em uma das fileiras de plantas, as mesmas coletas para avaliação da nodulação e isolamento das bactérias nativas, para a determinação do peso seco, do aporte de N e FBN. Também foram coletadas amostras da parte aérea das plantas referência (algodão, mamona e girassol). Toda essa biomassa foi seca em estufa a 65 °C, e moídas em um moinho de facas do tipo Willey. Alíquotas desse material foram separadas para determinação das concentrações de N total e ¹⁵N, por espectrometria de massa.

3.3 Estimativas da FBN

Para a determinação dessas concentrações, subamostras da biomassa aérea foram colocadas em cápsulas e inseridas em um espectrômetro de massa Thermo Quest-Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT; CA, USA), com interface com um Analisador Elementar (Carlo Erbamodel 1110; Milan, Italy), no Laboratório de Ecologia Isotópica (CENA-USP, Brasil). As razões isotópicas foram determinadas em relação aos padrões internacionais reconhecidos. Materiais de referência (atropina, extrato de levedura e padrão de solo no. 502 – 308 LECO Corporation) foram incluídos em todas as corridas analíticas. As abundâncias naturais do ¹⁵N foram expressas em unidades de δ (‰), que representa o desvio, em relação aos padrões, das razões entre as massas de ¹⁵N e de ¹⁴N, seguindo a equação:

$$\delta = (\text{Ramostra} / \text{Rpadrão} - 1) \times 1000$$

Em que: Ramostra e Rpadrão é a razão ¹⁵N:¹⁴N da amostra e do padrão (N₂ atmosférico). Estimativas da FBN foram realizadas quando a diferença entre as médias dos sinais de $\delta^{15}\text{N}$ das leguminosas e das referências (girassol, algodão e mamona) foram estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Então foi estimado o percentual de nitrogênio derivado do ar (%N_{dda}),

utilizando o método da abundância natural do ^{15}N (SHEARER; KOHL, 1986) por meio da equação:

$$\%N_{\text{dda}} = [(\delta^{15}\text{N}(\text{referência}) - \delta^{15}\text{N}(\text{fixadora})) / \delta^{15}\text{N}(\text{referência}) - B] \times 100$$

Em que $\delta^{15}\text{N}(\text{referência})$ é o valor médio dos $\delta^{15}\text{N}$ das plantas referência de cada bloco, $\delta^{15}\text{N}(\text{fixadora})$ é o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ de cada de cada tratamento e B é o valor de $\delta^{15}\text{N}$ para o feijão-caupi cultivado na ausência de N. Foi utilizado o valor $B = -1,61\%$ (UNKOVICH et al., 2008).

As quantidades de N total na biomassa aérea de cada variedade, em cada tratamento de inoculação, foram calculadas multiplicando-se a biomassa pelos respectivos teores de N médios. As quantidades de N fixadas ($\text{kg ha}^{-1} \text{ano}^{-1}$) foram obtidas multiplicando estas quantidades de N pelos resultados de % N_{dda} médios em cada área.

3.4 Avaliação da produtividade de grãos

Para a avaliação da produtividade, todas as vagens em uma área útil de 3 m^2 foram coletadas 80 DAP e, posteriormente pesadas e debulhadas para pesagem dos grãos coletados.

3.5 Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e transformados utilizando a raiz quadrada ($x^{0,5}$). Em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, através do programa estatístico Sisvar® versão 4.5 (FERREIRA, 2011).

3.6 Diversidade de bactérias diazotróficas no feijão-caupi

3.6.1 Isolamento e caracterização em meio de cultura de bactérias de nódulos

Das raízes das plantas coletadas 45 dias nas parcelas do controle absoluto (sem inoculação) do primeiro experimento, os nódulos foram extraídos e armazenados em sílica gel para o isolamento das bactérias. Dez nódulos foram escolhidos aleatoriamente e isolados de

cada parcela. Os nódulos secos foram novamente hidratados com água destilada autoclavada por 1 hora, desinfestados superficialmente com álcool a 70% por 1 minuto e solução de hipoclorito de sódio (2%) por 3 minutos e lavados 10 vezes em água destilada e esterilizada. Foram então pressionados com pinça em uma placa de Petri contendo meio YMA (FRED; WAKSMAN, 1928; VICENT 1970) e Congo Red (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994). As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento das colônias. Para purificar os isolados, as culturas foram inoculadas sucessivas vezes em meio YMA contendo azul de bromotimol como indicador de pH para obter culturas puras. As culturas puras foram armazenadas em meio YMA contendo glicerol (1:1 v/v) a -80 °C.

Para a caracterização fenotípica dos isolados, foram observados os seguintes aspectos morfo-fisiológicos (VICENT, 1970): 1) tempo de crescimento da colônia (rápido ou lento); 2) forma geométrica da colônia (circular ou oval), 3) borda da colônia (regular ou irregular); 4) tamanho da colônia em mm; 5) pH do meio de cultura (alteração na cor: amarela – ácido; azul – alcalino; e inalterado – neutro); 6) elevação da colônia (plana ou elevada); 7) transparência (opaca ou transparente); 8) cor da colônia (creme, branca ou amarela); 9) presença ou ausência de muco; 10) quantidade de muco; 11) elasticidade da colônia; 12) aspecto da coloração da colônia (homogênea ou heterogênea).

Como estratégia para a seleção dos isolados para posterior sequenciamento e teste de eficiência em casa de vegetação, foi utilizada uma abordagem utilizando a técnica de RFLP da região IGS (16S-23S rRNA). O DNA foi extraído usando o kit de extração de DNA genômico bacteriano Wizard® Genomic DNA Purification da Promega, seguindo as instruções do fabricante. A amplificação dessa região gênica foi realizada feita para todos os isolados. Para as amplificações, pares de *primers* (iniciadores) descritos para a amplificação deste fragmento (TAMPAKAKI et al., 2017a) foram usados para todas as bactérias isoladas e purificadas em placa de petri. Após a amplificação do IGS, o material amplificado foi submetido às reações com endonucleases (*Hin6 I*, *Msp I* e *Dde I*) *overnight* em um incubadora BOD. A reação final foi ajustada para 16 µL, contendo 0,5 µL de endonucleases, 0,1 µL BSA (10 µg mL⁻¹), 1,6 µL do tampão 10 X, 5,8 µL 28 de água ultra pura e 8 µL do produto do de amplificação e o perfis dessas enzimas foram observados em gel de agarose. Os produtos das reações com endonucleases foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% a 100 V por 120 minutos. O gel foi corado com GelRed (Biotium) e a visualização do gel foi feita em um transluminador sob luz UV. Após as reações com enzimas de restrição foram submetidos à análise de agrupamento UPGMA utilizando o software BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

No caso dos isolados provenientes da variedade BRS Nova Era, os grupos dos perfis de RFLP do IGS apresentavam muitos isolados com perfis semelhantes, por isso eles foram submetidos à BOX-PCR para avaliar a diversidade genética entre esses isolados e verificar se eram de estirpes semelhantes ou não.

3.6.2 Amplificação e sequenciamento da região gênica IGS (16S-23S rRNA)

Após o procedimento de RFLP e análise dos dendrogramas com os perfis provenientes da digestão no material amplificado pelas endonucleases, uma nova amplificação do IGS foi realizada com os isolados selecionados. Após a purificação das amostras, estas foram enviadas para o sequenciamento do gene 16S rRNA. A reação de PCR foi dimensionada para 26 µL, contendo 1X buffer, 2 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP, 0,20 uM de cada *primer* e 1 U taq DNA polimerase. O IGS foi amplificado utilizando os *primers* IGS-F1-T7 (TAATACGACTCACTATAGGGGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCG) e IGSbrd-R1-SP6 (GATTTAGGTGACACTATAGGCTTCTTCGCAGCTCCCCACG) (Tampakaki et al., 2017). As condições da reação foram de uma etapa de desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 1 min a 95° C, anelamento por 1 min a 55° C, 2 min a 72° C e 10 min de extensão final a 72° C. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE a 0,5X. Em seguida foram purificados com o Kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN®) e enviados para o sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul) para as reações de sequenciamento.

Para o posicionamento taxonômico dos isolados, foi avaliada a similaridade das sequências obtidas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI. A qualidade das sequências foi verificada utilizando o programa SeqScanner 2.0 (Applied Biosystems). As sequências das estirpes tipo com maior similaridade foram baixadas e alinhadas com as sequências dos isolados obtidos utilizando o algoritmo MUSCLE. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método Neighbor-Joining e o modelo Jukes-Cantor. As análises filogenéticas foram feitas com o auxílio do programa MEGA 7 (TAMURA et al., 2013).

3.6.3 Amplificação do BOX-PCR

Para a PCR, o *primer* Box A1 (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG) foi utilizado (VERSALOVIC et al., 1994). A reação de PCR foi dimensionada para 25 µL, contendo contendo 1X buffer, 3 mM MgCl₂, 1,5 mM dNTP, 1 uM do primer Box A1 e 2,5 U taq DNA polimerase. A amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 7 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min, e 65°C por 8 min com uma extensão final de 65°C por 16 min. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE a 0,5X aplicando-se uma voltagem de 120 volts durante 2,5 horas. Os géis foram observados em transluminador com luz UV e fotografados.

3.6.4 Experimento de autenticação da capacidade de nodular dos isolados sequenciados

Foi implantado um experimento em condições de casa de vegetação para avaliar a capacidade simbiótica dos isolados no feijão-caupi (BRS Pujante e BRS Nova Era). O experimento foi instalado nas dependências da Embrapa Semiárido. Foram avaliados 35 isolados selecionados a partir das amplificações e do sequenciamento do IGS (16S-23S rRNA). Foi incluída ainda como referência a bactéria BR3267 para a cultura do feijão-caupi, recomendada como inoculante comercial para a cultura (BRASIL, 2011). Os isolados bacterianos foram crescidos em meio líquido YM pelo tempo de crescimento adequado para cada bactéria e a inoculação foi feita com 2 mL do caldo de cultivo aplicado diretamente sobre as sementes logo após o plantio. Após a inoculação, as sementes foram cobertas com areia autoclavada para evitar a contaminação. Além da estirpe referência, utilizou-se um tratamento controle absoluto no qual não houve nenhum tipo de inoculação ou suplementação com N, e um controle nitrogenado, o qual recebeu doses semanais de nitrato de amônio (100mg de N planta⁻¹ semana⁻¹) sem a inoculação de isolados bacterianos. Os isolados que foram originalmente recuperados da variedade BRS Nova Era, foram inoculados na mesma variedade, enquanto que os isolados que encontrados em nódulos nas demais variedades foram inoculados na variedade BRS Pujante. As plantas receberam solução nutritiva de Norris e Date (1976) ½ força, sendo aplicados 50mL por planta uma vez por semana. Todas as plantas foram irrigadas manualmente com água destilada e autoclavada, para evitar riscos de contaminação, conforme o necessário.

O experimento foi implantado em vasos de poliestireno com capacidade para 500mL, utilizando areia estéril como substrato. Para a esterilização do substrato, a areia foi autoclavada duas vezes com um intervalo de 48 h entre as autoclavagens.

As sementes foram desinfestadas superficialmente com etanol 96° GL (30 segundos), hipoclorito de sódio (2%) (3 minutos) e 10 lavagens com água destilada autoclavada (VINCENT, 1970). As sementes foram germinadas previamente em placas de Petri contendo ágar-água (Ágar 0,15% p/v) por dois dias. Foram semeadas 3 sementes pré-germinadas por vaso, e aos 15 dias após emergência, foram desbastadas para uma planta por vaso. As plantas receberam água (destilada e autoclavada) conforme necessário e os nódulos foram coletados aos 45 dias após emergência.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos da inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* na FBN, desenvolvimento e produtividade de feijão-caupi.

4.1.1 Experimento 1

Houve efeito positivo da inoculação na produção de biomassa seca ($p < 0,01$) nas variedades BRS Tapaihum, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique e de N acumulado ($p < 0,01$) nas variedades BRS Acauã, BRS Imponente, BRS Tapaihum, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique (Tabela 2). As fontes de N testadas promoveram produção de biomassa seca semelhante ao controle ($p > 0,01$) nas variedades BRS Nova Era e BRS Pujante.

Na variedade BRS Acauã os tratamentos com controle absoluto e inoculado INPA 03-11B e UFLA 03-84 apresentaram biomassas semelhantes à do controle com adição de N mineral (1311 kg ha^{-1}), variando entre 958 e 1154 kg ha^{-1} . Na BRS Imponente, os tratamentos inoculados e o controle absoluto foram responsáveis por um incremento de até 50% (INPA 03-11B) em relação ao controle nitrogenado (816 kg ha^{-1}). No caso da variedade BRS Marataoã, não houve resposta positiva à inoculação com UFLA 03-84, que resultou no pior resultado dentre as fontes N utilizadas (558 kg ha^{-1}), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos que variaram entre 850 (BR3267) e 1186 kg ha^{-1} (C.N). Silva et al. (2008) não encontraram diferença significativa na eficiência dos inoculantes BR 3267, INPA 03-11B e UFLA 03-84

sobre a produtividade da variedade BRS Marataoã, no semiárido paraibano, nem entre os tratamentos inoculados e os controles absoluto e nitrogenado.

Na variedade BRS Pajeú, não houve efeito positivo da inoculação na produção das biomassas aéreas secas, que apresentaram resultados inferiores ao do controle nitrogenado (1311 kg ha^{-1}). A variedade BRS Potengi respondeu positivamente à inoculação com BR 3262 e INPA 03-84, com 1012 e 1460 kg ha^{-1} de biomassa aérea seca, respectivamente. O controle absoluto também se destacou com 1359 kg ha^{-1} , indicando que a população de rizóbios nativos apresenta um grande potencial de FBN tendo contribuído com grande parte do N acumulado nas plantas não inoculadas. Os tratamentos inoculados com UFLA 03-84 e BR 3267 apresentaram os piores resultados dentre os tratamentos inoculados e não proporcionaram ganhos em relação ao controle absoluto, sendo 57 e 62% inferiores, respectivamente, ao tratamento com INPA 03-11B que resultou na maior produção de biomassa seca. Na variedade BRS Tapaihum, as inoculações com BR 3262 e UFLA 03-84 resultaram em rendimento semelhante ao do controle nitrogenado, superior aos dos outros tratamentos. As produções com BR 3262 e UFLA foram superiores em 48% às com inoculação com BR 3267 e do controle absoluto, e 30% menor que com a INPA 03-11B. Na BRS Tumucumaque, os tratamentos com BR 3262 e UFLA 03-84 destacaram-se, proporcionando efeito positivo sobre as biomassas aéreas secas (1831 e 1359 kg ha^{-1} , respectivamente). Estes tratamentos superaram em até 53% o controle nitrogenado. Por fim, a variedade BRS Xique-Xique teve incremento em sua biomassa quando inoculada com BR 3267 (1112 kg ha^{-1}) e INPA 03-11B (1024 kg ha^{-1}), superando as biomassas com as das demais estirpes e do controle absoluto.

No presente estudo foi observado uma variação das respostas das fontes de N testadas em relação às variedades de feijão-caupi cultivadas no desenvolvimento vegetal. Trabalhos tem reportado que a influência dos inoculantes sobre o desenvolvimento do feijão-caupi também depende da variedade cultivada (DE ALCANTARA et al., 2014). Trabalhos realizados no Semiárido nordestino mostram que a produção de biomassa seca produzida quando submetida à inoculação, pode apresentar esse comportamento na produção de biomassa seca em diferentes variedades de feijão-caupi (MARINHO et al., 2014, 2017; MARTINS et al., 2003). Além da capacidade de fixar N, os rizóbios também podem contribuir diretamente para a produção de hormônios vegetais, siderófos nos nódulos e também favorecem a solubilização de fosfato (GOPALAKRISHNAN; SATHYA, 2015; IMADA et al., 2016; SERRANO, 2017) e a interação entre bactérias e o genótipo hospedeiro é muito importante para o desenvolvimento vegetativo e produtividade do feijão-caupi, sendo assim determinante para escolha de inoculantes eficientes para determinadas variedades.

Com relação ao N acumulado na biomassa aérea seca, houve efeito dos tratamentos de inoculação em 7 das 10 variedades testadas (tabela 2). As variedades BRS Nova Era, BRS Pajeú e BRS Pujante não apresentaram resposta às diferentes fontes de N utilizadas. Na variedade BRS Acauã, os tratamentos inoculados com INPA 03-11B e UFLA 03-84 que apresentaram as maiores quantidades de N fixado também acumularam maiores quantidades de N na biomassa aérea (36 e 42 kg ha⁻¹, respectivamente), semelhantes às do controle nitrogenado (48 kg ha⁻¹). Marinho et al. (2014) também reportaram a influência dos inoculantes sobre o N acumulado na biomassa aérea seca nesta variedade, com os melhores resultados obtidos com a inoculação com INPA 03-11B, BR 3262 e BR 3299, com acumulação de 25,4 a 37,2 mg N planta⁻¹. Na variedade BRS Imponente, a FBN proporcionou que tratamentos inoculados com BR 3262, BR 3267 e INPA 03-84 destacaram-se acumulando até 48,5 % a mais de N que o tratamento nitrogenado (30 kg ha⁻¹). A variedade BRS Marataoã inoculada com a UFLA 03-84 teve o pior resultado dentre os tratamentos. Os demais tratamentos inoculados apresentaram resultados semelhantes ao uso de N mineral. Para a variedade BRS Potengi os tratamentos inoculados com BR 3267 e UFLA 03-84, que fixaram menos N que os demais tratamentos, tiveram os piores resultados relacionados ao N acumulado na biomassa aérea (23,8 e 20,3 kg ha⁻¹). Os tratamentos com a estirpe INPA 03-11B e controle absoluto se destacaram com 53 e 49 kg ha⁻¹ de N acumulado, respectivamente.

Na variedade BRS Tapaihum, as plantas inoculadas com BR 3262 (41,7 kg ha⁻¹) e UFLA 03-84 (43,6 kg ha⁻¹) acumularam nitrogênio semelhante ao controle nitrogenado (36,2 kg ha⁻¹) e superior às plantas que não receberam inoculação nem adubação com N. Com a estirpe UFLA 03-84 houve maior acumulação de N e a FBN foi responsável por 63,5 % do montante de N acumulado. Os resultados de N acumulado no tratamento com BR 3262 corroboram o que foi reportado por Marinho et al. (2014), que esta estirpe proporcionou acúmulo de N na biomassa aérea (39,9 mg N planta⁻¹) semelhante ao do tratamento adubado com 80 kg ha⁻¹. Para a variedade BRS Tumucumaque, a estirpe BR 3262 foi responsável pelo maior N acumulado (67,9 kg ha⁻¹), sendo a FBN responsável por mais de 50% deste montante. Os tratamentos com UFLA 03-84 e INPA 03-11B também resultaram em mais N acumulado que os tratamentos controle. A FBN também apresentou um papel importante sendo responsável por 60 e 68%, respectivamente, embora inferior ao do tratamento com BR 3262. A variedade BRS Xique-xique também foi influenciada pela inoculação com as BR 3262 e INPA 03-11B resultando nos maiores valores de N acumulado.

Os sinais isotópicos do N absorvido pelas plantas controle ($\delta^{15}\text{N} = 9,53 \text{ ‰}$) foram maiores que o do feijão-caupi, indicando que houve fixação em todos os tratamentos inoculados

e no controle absoluto. Houve diferença significativa dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ da biomassa aérea no feijão-caupi entre as fontes de N testadas apenas para a variedade BRS Imponente.

Houve diferença significativa no %Ndda nas variedades BRS Imponente e BRS Pajeú. Na variedade BRS Imponente os tratamentos com BR 3262, controle absoluto e UFLA 03-84 tiveram %Ndda superiores aos demais tratamentos. A inoculação com a BR 3262 destacou-se dentre as estirpes recomendadas levando a cerca 62 %Ndda, porém ainda um pouco abaixo do determinado no controle absoluto (69,4 %), indicando que as bactérias diazotróficas nativas tem grande potencial biotecnológico para ajudar o desenvolvimento desta variedade de feijão-caupi. Esses resultados demonstram a importância de realizar estudos para investigar a eficiência da comunidade de bactérias nativas, para encontrar isolados que possam beneficiar o desenvolvimento vegetal isoladamente ou em conjunto com outras estirpes. Na variedade BRS Pajeú, a inoculação com a da inoculação com BR 3262 levou ao maior %Ndda (72 %), enquanto que a UFLA 03-84 resultou no menor (36,3 %).

No aporte de N fixado, as variedades BRS Pajeú, BRS Tapaihum e BRS Tumucumaque foram influenciadas pelas fontes de N utilizadas neste estudo. A variedade BRS Pajeú respondeu positivamente à inoculação com BR 3262, apresentando um montante de N fixado de 23,4 kg ha⁻¹, destacando-se dentre os demais tratamentos. Na variedade BRS Tapaihum, o maior %Ndda encontrado no tratamento com a estirpe UFLA 03-84 refletiu na maior quantidade N fixado entre os tratamentos com 27,2 kg ha⁻¹. A inoculação com BR 3262 também diferiu dos demais tratamentos resultando em 17,7 kg ha⁻¹ de N fixado, enquanto que a fixação no controle absoluto foi de 12 kg ha⁻¹. Com relação a variedade BRS Tumucumaque, as estirpes BR 3262, INPA 03-11B e UFLA 03-84 proporcionaram incrementos no aporte de N fixado em comparação aos demais tratamentos, variando entre 28,6 e 34 kg ha⁻¹.

Houve diferença significativa na produtividade de vagens das variedades BRS Imponente e BRS Nova Era (tabela 3). Na primeira, as estirpes BR 3267, INPA 03-11B e o tratamento controle absoluto trouxeram incremento na produção de vagens obtendo resultados semelhantes ao controle nitrogenado. Na variedade BRS Nova Era as inoculações com BR 3262, INPA 03-11B e UFLA 03-84 favoreceram a produção de vagens em até 31,16% em comparação ao C.A.

A produção de grãos foi afetada pelas fontes de N, com exceção das variedades BRS Acauã, BRS Potengi e BRS Tapaihum (tabela 3). Os resultados das variedades BRS Acauã e BRS Tapaihum diferem dos reportados por Marinho et al. (2014), em experimentos também realizados na estação experimental de Bebedouro (Petrolina – PE), já que no presente estudo foi observado que os tratamentos inoculados com as bactérias recomendadas apresentaram

resultados semelhantes ao controle adubado com 80 kg ha^{-1} e superaram o controle absoluto nestas variedades. Essas diferenças possivelmente ocorreram devido à diferença no período de plantio. O presente estudo ocorreu entre maio e julho de 2016, enquanto que o realizado por Marinho et al (2014) entre dezembro e fevereiro, quando as temperaturas geralmente são mais elevadas. Fatores abióticos, como temperatura, podem influenciar a interação entre bactéria e hospedeiro, que por sua vez interferem no desenvolvimento e produtividade vegetal (GOPALAKRISHNAN; SATHYA, 2015; MARSH et al., 2006). Os tratamentos inoculados não apresentaram efeito positivo sobre a produção de grãos, com resultados inferiores aos do controle absoluto e controle nitrogenado na variedade BRS Imponente. O controle absoluto produziu 1476 kg ha^{-1} , superando os demais tratamentos inoculados em até 45%, indicando que a população de rizóbios nativos tem grande potencial biotecnológico, e que a introdução de outras estirpes não traz benefícios à produtividade para esta variedade. Na variedade BRS Marataoã a inoculação com BR 3267 apresentou a maior produção de grãos (2059 kg ha^{-1}). A estirpe INPA 03-11B e o controle absoluto apresentaram valores inferiores a BR 3267, porém foram superiores aos demais tratamentos inoculados. Na variedade BRS Nova Era, os tratamentos inoculados com BR 3262, INPA 03-11B e UFLA 03-84 tiveram efeito positivo sobre a produção de grãos, não diferindo estatisticamente do controle nitrogenado. As maiores produções de grãos ocorreram no tratamento inoculado com a BR 3262 (2073 kg ha^{-1}), INPA 03-11B (1819 kg ha^{-1}), e UFLA (1704 kg ha^{-1}) superaram os tratamentos com BR 3267 e controle absoluto em 52%. Chagas Júnior et al. (2010) realizaram experimentos com a inoculação com as quatro estirpes recomendadas nas variedades BRS Pujante, BRS Nova Era e Vinagre no Cerrado (Gurupi-TO), e reportaram que dentre os inoculantes testados, apenas a UFLA 03-84 (680 kg ha^{-1}) trouxe ganhos na produção de grãos equivalente ao tratamento com adubação mineral (693 kg ha^{-1}).

Na variedade BRS Pajeú as inoculações com INPA 03-11B e BR 3267 resultaram em incrementos nas produtividades que foram 2093 e 1941 kg ha^{-1} , respectivamente. Os tratamentos com BR 3262 e UFLA 03-84 foram inferiores aos outros tratamentos inoculados, porém superaram o controle absoluto em até 43%. Estes resultados indicam que estas bactérias são mais eficientes do que a população de bactérias nativas para esta variedade, nas condições do experimento.

A variedade BRS Pujante respondeu bem aos tratamentos inoculados com BR 3267 (1941 kg ha^{-1}) e INPA 03-11B (2093 kg ha^{-1}), com rendimentos semelhantes ao do tratamento adubado com N mineral (2119 kg ha^{-1}) e superiores ao controle absoluto. Esses resultados diferem do reportado por Marinho et al. (2014), em que não foi observado incremento na

produção de grãos desta variedade na estação experimental de Bebedouro. No entanto os autores relatam que na estação de Mandacarú (Juazeiro, BA), também no semiárido, as estirpes BR 3267 (*Bradyrhizobium yuanmingense*), UFLA 03-84 (*Bradyrhizobium* sp.), e BR 3299 (*Microvirga vignae*) destacaram-se dentre os inoculantes levando a apresentando produção semelhantes à do tratamento adubado com N mineral. Esse comportamento também foi observado por Marinho et al. (2017) para a variedade BRS Pujante na estação experimental de Mandacarú. Na variedade BRS Tumucumaque com as estirpes INPA 03-11B e UFLA 03-84 as produções foram semelhantes às do controle nitrogenado, e diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. A UFLA 03-84 destacou-se produzindo 2101 kg ha⁻¹, superando o tratamento com BR 3262, que apresentou a menor produção de grãos, em 33%. Na variedade BRS Xique-Xique, com exceção do tratamento com BR 3262, todos os tratamentos inoculados e o controle absoluto tiveram produções de grãos semelhantes às do controle nitrogenado. O controle absoluto foi capaz de produzir 1838 kg ha⁻¹ de grãos, mais que todos os outros tratamentos, indicando que a população nativa de rizóbios foi preponderante. A inoculação da BR 3262 não foi benéfica à produção de grãos para esta variedade, demonstrando que a interação entre estirpes alóctones em determinadas situações pode não ser capaz de trazer benefícios à produção vegetal e realça a importância de estudos relacionados à capacidade biotecnológica das bactérias nativas e sua interação com inoculantes comerciais.

Tabela 2. Biomassa seca, concentração de N (%) e $\delta^{15}\text{N}$ (‰), % N_{dda}, N acumulado e fixado na biomassa aérea seca em dez variedades de feijão-caupi inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* na estação experimental de Bebebedouro, Petrolina-PE, 45 dias após o plantio.

Variedade	Com inoculação/estirpes				Sem inoculação	
	BR 3262	BR 3267	INPA 03-11B	UFLA 03-84	controle absoluto	controle c/ N
	Biomassa seca (kg ha ⁻¹)					
BRS Acauã	575 bB	818 bB	977 aB	1154 aA	958 aA	1312 aA
BRS Imponente	1430 aA	1483 aA	1642 aA	906 aB	1118 aA	816 bA
BRS Marataoã	1061 aA	850 aB	1152 aA	558 bB	1160 aA	1186 aA
BRS Nova Era	1142 aA	669 aB	1279 aA	932 aB	811 aB	946 aA
BRS Pajeú	934 bB	659 bB	657 bB	849 bB	762 bB	1311 aA
BRS Potengi	1012 aA	626 bB	1461 aA	545 bB	1359 aA	1115 aA
BRS Pujante	1208 aA	823 aB	887 aB	814 aB	1029 aA	1246 aA
BRS Tapaihum	1206 aA	640 bB	841 bB	1121 aA	631 bB	1070 aA
BRS Tumucumaque	1831 aA	870 bB	1160 bA	1359 aA	922 bB	858 bA
BRS Xique-Xique	467 bB	1113 aA	1024 aB	675 bB	602 bB	817 aA
	% N total					

BRS Acauã	3,80 aA	3,72 aA	3,74 aA	3,63 aA	3,34 aA	3,72 aA
BRS Imponente	4,06 aA	3,64 aA	3,47 aA	4,08 aA	3,72 aA	3,69 aA
BRS Marataoã	3,39 aA	3,68 aA	3,47 aA	3,74 aA	3,55 aA	3,51 aA
BRS Nova Era	3,42 aA	3,48 aA	3,50 aA	3,61 aA	3,63 aA	3,22 aA
BRS Pajeú	3,73 aA	3,39 aA	3,63 aA	3,68 aA	3,65 aA	3,31 aA
BRS Potengi	3,70 aA	3,81 aA	3,72 aA	3,71 aA	3,68 aA	3,47 aA
BRS Pujante	3,61 aA	3,99 aA	3,48 aA	3,69 aA	3,51 aA	3,47 aA
BRS Tapaihum	3,49 aA	3,46 aA	3,44 aA	3,92 aA	3,41 aA	3,45 aA
BRS Tumucumaque	3,77 aA	3,60 aA	3,68 aA	3,62 aA	3,61 aA	3,52 aA
BRS Xique-Xique	3,90 aA	3,45 aA	3,80 aA	3,51 aA	3,74 aA	3,45 aA
N acumulado (kg ha⁻¹)						
BRS Acauã	21,9 bC	30,1 bB	36,5 aA	41,9 aA	31,7 bB	48 aA
BRS Imponente	56,5 aA	52,6 aA	57,1 aA	36,8 bB	41,6 bA	30 bB

BRS Marataoã	35,9 aB	31,5 aB	40 aA	20,9 bB	40,3 aA	41 aA
BRS Nova Era	38,8 aB	23,2 aB	44,9 aA	33,5 aB	28,8 aB	29,3 aB
BRS Pajeú	33,7 aC	23 aB	23,6 aB	31,3 aB	27,6 aB	42,9 aA
BRS Potengi	37,5 aB	23,8 bB	53 aA	20,3 bB	49,4 aA	38,1 aA
BRS Pujante	43,7 aB	32,9 aB	30,9 aB	29 aB	35,1 aA	43,1 aA
BRS Tapaihum	41,7 aB	21,8 bB	28,4 bB	43,6 aA	21,5 bB	36,2 aB
BRS Tumucumaque	67,9 aA	31,3 cB	44 bA	48 bA	32,1 cB	30,3 cB
BRS Xique-Xique	16,2 bC	43,2 aA	38,9 aA	24,4 bB	22,6 bB	28,2 bB

	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)				
BRS Acauã	3,42 aA	2,18 aB	2,08 aA	3,41 aA	3,96 aA
BRS Imponente	2,69 bA	4,24 aA	5,51 aA	4,89 aA	1,79 bA
BRS Marataoã	5,96 aA	5,83 aA	4,57 aA	4,28 aA	5,85 aA
BRS Nova Era	3,90 aA	3,36 aB	4,19 aA	3,99 aA	2,91 aA
BRS Pajeú	3,86 aA	5,35 aA	3,75 aA	5,48 aA	2,76 aA
BRS Potengi	3,18 aA	2,80 aB	5,20 aA	3,90 aA	2,28 aA
BRS Pujante	4,30 aA	1,77 aB	3,45 aA	4,04 aA	1,50 aA
BRS Tapaihum	4,80 aA	4,54 aA	4,06 aA	2,89 aA	3,32 aA
BRS Tumucumaque	4,00 aA	6,18 aA	3,86 aA	4,67 aA	3,34 aA
BRS Xique-Xique	4,49 aA	4,40 aA	4,96 aA	4,09 aA	2,99 aA

	% Ndda				
BRS Acauã	54,8 aA	66,0 aA	66,9 aA	54,9 aA	50,0 aA
BRS Imponente	61,4 aA	47,5 bA	36,1 bB	58,6 aA	69,4 aA
BRS Marataoã	49,5 aA	33,2 aA	44,5 aB	47,1 aB	46,0 aA
BRS Nova Era	50,5 aA	55,4 aA	48,0 aB	49,7 aB	59,4 aA
BRS Pajeú	72,0 aA	53,1 aA	51,8 aB	36,3 bB	60,8 aA
BRS Potengi	57,0 aA	60,4 aA	38,9 aB	66,1 aA	65,1 aA
BRS Pujante	47,0 aA	69,7 aA	67,8 aA	71,5 aA	72,1 aA
BRS Tapaihum	42,5 aA	44,8 aA	49,1 aB	59,6 aA	55,8 aA
BRS Tumucumaque	49,6 aA	45,4 aA	67,3 aA	60,2 aA	65,8 aA
BRS Xique-Xique	46,0 aA	58,6 aA	41,0 aB	67,8 aA	58,7 aA

	N fixado (kg ha ⁻¹)				
BRS Acauã	12,3 aB	20,4 aA	24,3 aA	22,7 aA	15,7 aB
BRS Imponente	33 aA	20,7 aA	21,8 aA	21,2 aA	28,8 aA
BRS Marataoã	17,7 aA	11,6 aB	19 aA	10,3 aB	17,8 aB
BRS Nova Era	19,3 aA	13,7 aB	22,8 aA	18,6 aB	17 aB
BRS Pajeú	23,4 aA	13,3 bB	12,8 bA	12,1 bB	17,3 bB
BRS Potengi	22 aA	13,6 aB	17,9 aA	13,4 aB	31,9 aA
BRS Pujante	21 aA	22,7 aA	21 aA	20,5 aA	25,3 aA

BRS Tapaihum	17,7 aA	9,7 bB	14,5 bA	27,2 aA	12 bB
BRS Tumucumaque	34,3 aA	14,6 bB	29,8 aA	28,6 aA	21,1 bB
BRS Xique-Xique	7,6 aB	25,3 aA	16,8 aA	16,6 aB	13,6 aB

Letras minúsculas comparam cada variedade de feijão-caupi isoladamente com estirpes de bactérias, enquanto que letras maiúsculas comparam a performance de cada estirpe de bactéria inoculada nas diferentes variedades de feijão-caupi. A análise de variância foi realizada através do teste Scott-Knott à 0,05 de probabilidade.

Tabela 3. Produtividade de vagens e grãos em 10 variedades de feijão-caupi inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* na estação experimental de Bebebedouro, Petrolina-PE, 80 dias após o plantio.

Variedade	Com inoculação/estirpes				Sem inoculação	
	BR 3262	BR 3267	INPA 03-11B	UFLA 03-84	controle absoluto	controle c/ N
Produtividade de vagens (kg ha⁻¹)						
BRS Acauã	2022 aA	1999 aA	2063 aA	2012 aA	2202 aA	1782 aB
BRS Imponente	819 bB	1563 aB	1512 aA	1173 bB	1967 aA	1639 aB
BRS Marataoã	2818 aA	1943 aA	2440 aA	1680 aA	1723 aA	2403 aA
BRS Nova Era	2413 aA	1315 bB	2181 aA	2411 aA	1661 bA	2006 aB
BRS Pajeú	2117 aA	2240 aA	2866 aA	2123 aA	1759 aA	2565 aA
BRS Potengi	2271 aA	2244 aA	2668 aA	2640 aA	2533 aA	2554 aA
BRS Pujante	2626 aA	2873 aA	2373 aA	2138 aA	2207 aA	2875 aA
BRS Tapaihum	2114 aA	2666 aA	2285 aA	2162 aA	2047 aA	1910 aB
BRS Tumucumaque	2544 aA	2222 aA	2580 aA	2568 aA	2157 aA	2519 aA
BRS Xique-Xique	2041 aA	2463 aA	2188 aA	2372 aA	2570 aA	2291 aA
Peso de 100 grãos (g)						
BRS Acauã	17,63 aC	17,07 aC	16,52 aD	17,11 aC	16,21 aD	15,10 aD
BRS Imponente	17,91 cC	33,88 aA	29,78 bA	32,34 aA	31,37 bA	33,04 aA
BRS Marataoã	16,66 aC	16,48 aC	17,40 aD	16,53 aC	16,38 aD	16,76 aD
BRS Nova Era	20,13 aB	22,31 aB	22,90 aB	22,40 aB	23,30 aB	21,77 aB

BRS Pajeú	16,50 aC	16,71 aC	15,81 aD	17,54 aC	15,91 aD	16,30 aD
BRS Potengi	19,78 aB	22,31 aB	20,04 aC	20,70 aB	21,01 aB	20,92 aB
BRS Pujante	21,78 aA	21,08 aB	20,73 aC	21,95 aB	21,63 aB	21,67 aB
BRS Tapaihum	19,21 aB	18,42 aC	19,16 aC	18,92 aC	18,81 aC	18,69 aB
BRS Tumucumaque	22,23 aA	21,50 aB	20,97 aC	21,56 aB	21,55 aB	21,40 aB
BRS Xique-Xique	21,77 aA	21,27 aB	21,97 aB	21,74 aB	21,79 aB	21,25 aB

Produtividade de grãos (kg ha ⁻¹)						
BRS Acauã	1603 aA	1371 aB	1450 aB	1233 aC	1497 aA	1313, aB
BRS Imponente	812 bB	869 bC	912 bC	975 bD	1476 aA	1386 aB
BRS Marataoã	1132 cB	2059 aA	1590 bB	905 cD	1466 bA	1574 bA
BRS Nova Era	2073 aA	995 bC	1819 aB	1704 aB	1194 bB	1575 aB
BRS Pajeú	1658 bA	1941 aA	2093 aA	1481 bB	943 cB	1805 aA
BRS Potengi	1548 aA	1511 aB	1606 aB	1776 aB	1682 aA	1575 aB
BRS Pujante	1679 bA	2093 aA	2354 aA	1596 bB	1424 bA	2119 aA
BRS Tapaihum	1676 aA	2083 aA	1751 aB	1582 aB	1662 aA	1641 aB
BRS Tumucumaque	1408 bA	1579 bB	1799 aB	2101 aA	1443 bA	1737 aA
BRS Xique-Xique	1014 bB	1602 aB	1660 aB	1710 aB	1838 aA	1545 aB

Letras minúsculas comparam cada variedade de feijão-caupi isoladamente com estirpes de bactérias, enquanto que letras maiúsculas comparam a performance de cada estirpe de bactéria inoculada nas diferentes variedades de feijão-caupi. A análise de variância foi realizada através do teste Scott-Knott à 0,05 de probabilidade.

Tabela 4. Desempenho superior das estirpes inoculadas ($p < 0,05$) em dez variedades de feijão-caupi cultivadas na estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE, em relação a controle absoluto.

Variedade	Biomassa seca	N acumulado	N fixado	Produção de grãos
BRS Acauã	-	INPA 03-11B e UFLA 03-84	-	-
BRS Imponente	-	BR3262, BR3267 e UFLA 03-84	-	-
BRS Marataoã	-	-	-	BR3267
BRS Nova Era	-	-	-	BR3262, INPA 03-11B e UFLA 03-84
BRS Pajeú	-	-	BR3262	BR3262, BR3267, INPA 03-11B e UFLA 03-84
BRS Potengi	-	-	-	-
BRS Pujante	-	-	-	BR3267 e INPA 03-11B
BRS Tapaihum	BR3262 e UFLA 03-84	BR3262 e UFLA 03-84	BR3262 e UFLA 03-84	-
BRS Tumucumaque	BR3262 e UFLA 03-84	BR3262, INPA 03-11B e UFLA 03-84	BR3262, INPA 03-11B e UFLA 03-84	INPA 03-11B e UFLA 03-84
BRS Xique-xique	BR3267 e INPA 03-11B	BR3267 e INPA 03-11B	-	-

4.1.2 Experimento 2

No segundo experimento, realizado em 2017, variáveis relacionadas à produtividade foram analisadas para avaliar a influência das fontes de N sobre a produção de feijão-caupi (Tabela 5). Não houve diferença na biomassa das variedades BRS Marataoã e BRS Pujante, com as inoculações e controles. Na variedade BRS Imponente, as inoculações com BR 3262 e INPA 03-11B resultaram em biomassas semelhantes às do controle nitrogenado, enquanto que os demais tratamentos não trouxeram incremento em relação ao controle absoluto. Com a inoculação com INPA 03-11B houve o maior aporte de biomassa (1111 kg ha^{-1}), enquanto com a BR 3267 a menor (692 kg ha^{-1}). No caso da variedade BRS Tapaihum, os tratamentos inoculados levaram a resultados inferiores aos do controle absoluto e nitrogenado. Na variedade BRS Tumucumaque, a inoculação com BR 3262 apresentou biomassas semelhantes às do controle nitrogenado (1041 kg ha^{-1}), e nos demais tratamentos não houve incrementos na parte aérea do vegetal em relação ao controle absoluto.

Na produção de vagens + grãos, as variedades BRS Imponente, BRS Marataoã e BRS Tapaihum não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. BRS Pujante apresentou maiores produções com a inoculação com BR 3267 e os tratamentos controle, variando entre 3231 (BR 3267) e 3683 kg ha^{-1} (controle nitrogenado). Na variedade BRS Tapaihum, os tratamentos com BR 3262, UFLA 03-84 e controle absoluto destacaram-se, sendo o maior valor observado no tratamento com BR 3262 (4521 kg ha^{-1}).

A produção de grãos, no geral foi maior que no ano anterior (Fig. 2). Na variedade BRS Tumucumaque não houve diferença no efeito das fontes de N. Na variedade BRS Imponente, a inoculação com BR 3262, assim como no primeiro experimento, não foi capaz de incrementar a produção grãos e teve o pior resultado dentre os tratamentos, que não diferiram, variando entre 2629 kg ha^{-1} com UFLA 03-84 e 3234 kg ha^{-1} no controle nitrogenado, que pode ter recebido influência de rizóbios nativos. Na BRS Marataoã, o controle nitrogenado foi superior aos demais tratamentos, produzindo 4111 kg ha^{-1} , sendo o tratamento com UFLA 03-84 o de melhor resultado entre os inoculados. Tendo em vista o elevado custo dos adubos nitrogenados, a inoculação com UFLA 03-84 pode ser uma alternativa para incrementar a produção nas condições em que o estudo foi realizado,

podendo ser utilizada por agricultores em pequenas propriedades e agricultura familiar. Na variedade BRS Pujante, que não havia apresentado diferença significativa no experimento anterior, a estirpe INPA 03-11B induziu maior quantidade de grãos (2552 kg ha^{-1}) que os demais tratamentos inoculados e controle absoluto. A variedade BRS Tapaihum também não demonstrou efeito das fontes N sobre a produção de grãos no primeiro experimento de campo, entretanto no segundo experimento os controles nitrogenado e absoluto se destacaram dentre os demais tratamentos. Portanto, a população de bactérias diazotróficas nativas no solo, assim como no primeiro experimento, podem ter estirpes mais eficientes do que os inoculantes comerciais recomendados, sendo importante realizar estudos para aproveitar o seu potencial biotecnológico.

Na variável peso de 100 grãos, as variedades BRS Tapaihum e BRS Tumucumaque não tiveram diferença significativa entre fontes de N. Na variedade BRS Imponente, a estirpe BR 3262 apresentou grãos maiores que nos demais tratamentos, mas esse incremento nos grãos não levou ao aumento na produção. Na variedade BRS Marataoã, a UFLA 03-84 resultou no maior ao peso dos grãos (23 g), que pode ter influenciado na maior produção de grãos (tabela 3). Já na variedade BRS Pujante, a inoculação com UFLA 03-84 levou ao menor peso dos grãos (14,86 g).

Tabela 5. Biomassa seca (45 DAP), produtividade de vagens e grãos em cinco variedades de feijão-caupi (80 DAP) inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* na estação experimental de Bebebedouro, Petrolina-PE.

Variedade	Com inoculação/estirpes				Sem inoculação	
	BR 3262	BR 3267	INPA 03-11B	UFLA 03-84	controle absoluto	controle c/ N
Biomassa seca (kg ha⁻¹)						
BRS Imponente	1005 aA	693 bA	1111 aA	842 bA	768 bB	940 aA
BRS Marataoã	887 aA	887 aA	886 aA	795 aA	912 aB	729 aB
BRS Pujante	873 aA	773 aA	884 aA	877 aA	773 aB	846 aB
BRS Tapaihum	703 bB	655 bA	777 bB	806 bA	1200 aA	1071 aA
BRS Tumucumaque	1041 aA	794 bA	594 bB	831 bA	752 bB	988 aA
Produtividade de vagens (kg ha⁻¹)						
BRS Imponente	1811 aC	2800 aA	2771 aA	2196 aB	2504 aA	2633 aA
BRS Marataoã	2783 aB	2708 aA	2883 aA	3165 aA	2754 aA	2921 aA
BRS Pujante	2642 bB	3231 aA	2612 bA	2387 bB	3450 aA	3683 aA
BRS Tapaihum	3258 aB	3356 aA	3044 aA	2605 aB	3483 aA	3408 aA
BRS Tumucumaque	4521 aA	3254bA	3004 bA	3737 aA	2775 bA	3500 aA

	Peso de 100 grãos (g)					
BRS Imponente	32,2 aA	28,7 bA	22,9 dA	24,9 dA	26,9 cA	26,9 cA
BRS Marataoã	16,4 bC	17,1 bC	16 bB	23 aA	14,3 cC	14,6 cD
BRS Pujante	22,6 aB	20,9 aB	22,8 aA	14,9 bD	21,6 aB	22 aB
BRS Tapaihum	18,4 aC	18,1 aC	17,5 aB	18,5 aC	17,9 aC	18 aC
BRS Tumucumaque	20,4 aB	20,6 aB	21,8 aA	20,8 aB	21,0 aB	20,9 aB

	Produtividade de grãos (kg ha⁻¹)					
BRS Imponente	1305 bC	1980 aB	2012 aB	1753 aB	1978 aB	2156 aB
BRS Marataoã	2014 cB	1880 cB	1957 cB	2324 bA	2170 cB	2741 aA
BRS Pujante	1895 bB	2034 bB	2552 aA	1825 bB	1974 bB	2590 aA
BRS Tapaihum	2221 bA	2483 bA	2230 bB	2359 bA	2746 aA	2789 aA
BRS Tumucumaque	2424 aA	2170 aB	2095 aB	2528 aA	2278 aB	2280 aB

Letras minúsculas comparam cada variedade de feijão-caupi isoladamente com estirpes de bactérias, enquanto que letras maiúsculas comparam a performance de cada estirpe de bactéria inoculada nas diferentes variedades de feijão-caupi. A análise de variância foi realizada através do teste Scott-Knott à 0,05 de probabilidade.

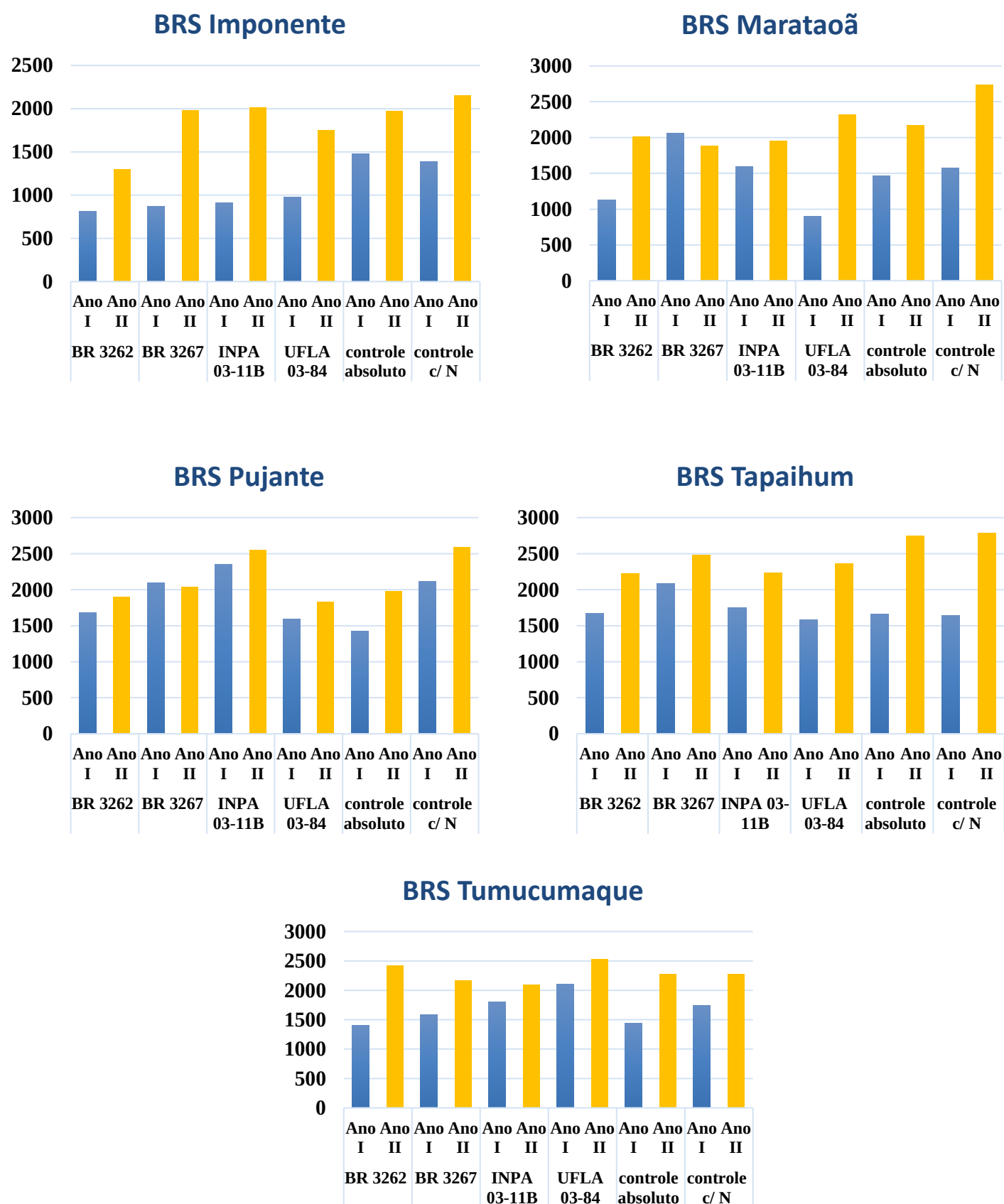


Figura 2. Produção de grãos em cinco variedades de feijão-caupi inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* por dois anos consecutivos na estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE.

4.2 Diversidade de rizóbios em diferentes variedades de feijão-caupi

No total, foram isolados 168 estirpes a partir de nódulos provenientes das 10 variedades de feijão-caupi cultivadas no Campo Experimental de Bebedouro. Os isolados foram nomeados com as iniciais da variedade de feijão utilizadas seguido da numeração referente a quantidade de isolados obtidos por variedade. O produto de PCR, considerando um fragmento que variou entre 595 a 1176 bp da região IGS, de todos os isolados foi utilizado para análises de RFLP que resultaram em padrões de bandas polimórficas quando digeridos com as endonucleases *Msp* I, *Dde* I e *Hin*6 I.

Foram construídos dois dendrogramas utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice, combinando os perfis de digestão das três endonucleases utilizadas. Como a maioria das estirpes foi isolada da variedade de feijão-caupi BRS Nova Era, um dendrograma foi construído somente com as bactérias isoladas desta variedade, com objetivo de não subestimar a diversidade de rizóbios encontrados no solo de Bebedouro. Com base nos agrupamentos e considerando 80% de similaridade foram identificados 22 grupos de estirpes a partir do IGS RFLP (Fig. 3 e 4).

Isolados representativos de cada grupo IGS RFLP foram escolhidos aleatoriamente para o sequenciamento e identificação das bactérias. Para verificar a variabilidade genética de isolados dentro do grupo RFLP XV (Fig. 4), 11 estirpes foram selecionadas aleatoriamente e submetidas à análise do “fingerprint” molecular pela técnica de BOX-PCR (Fig.4). Os isolados NE47, NE49, NE48, NE32, NE33, NE38, NE44, NE50, NE51, NE54, e NE55 foram dispostos nessa ordem no gel de agarose, que resultou em quatro grupos distintos (Fig. 5). Uma estirpe de cada grupo foi escolhida para o sequenciamento, resultando na escolha dos isolados NE49, NE32, NE44 e NE51.

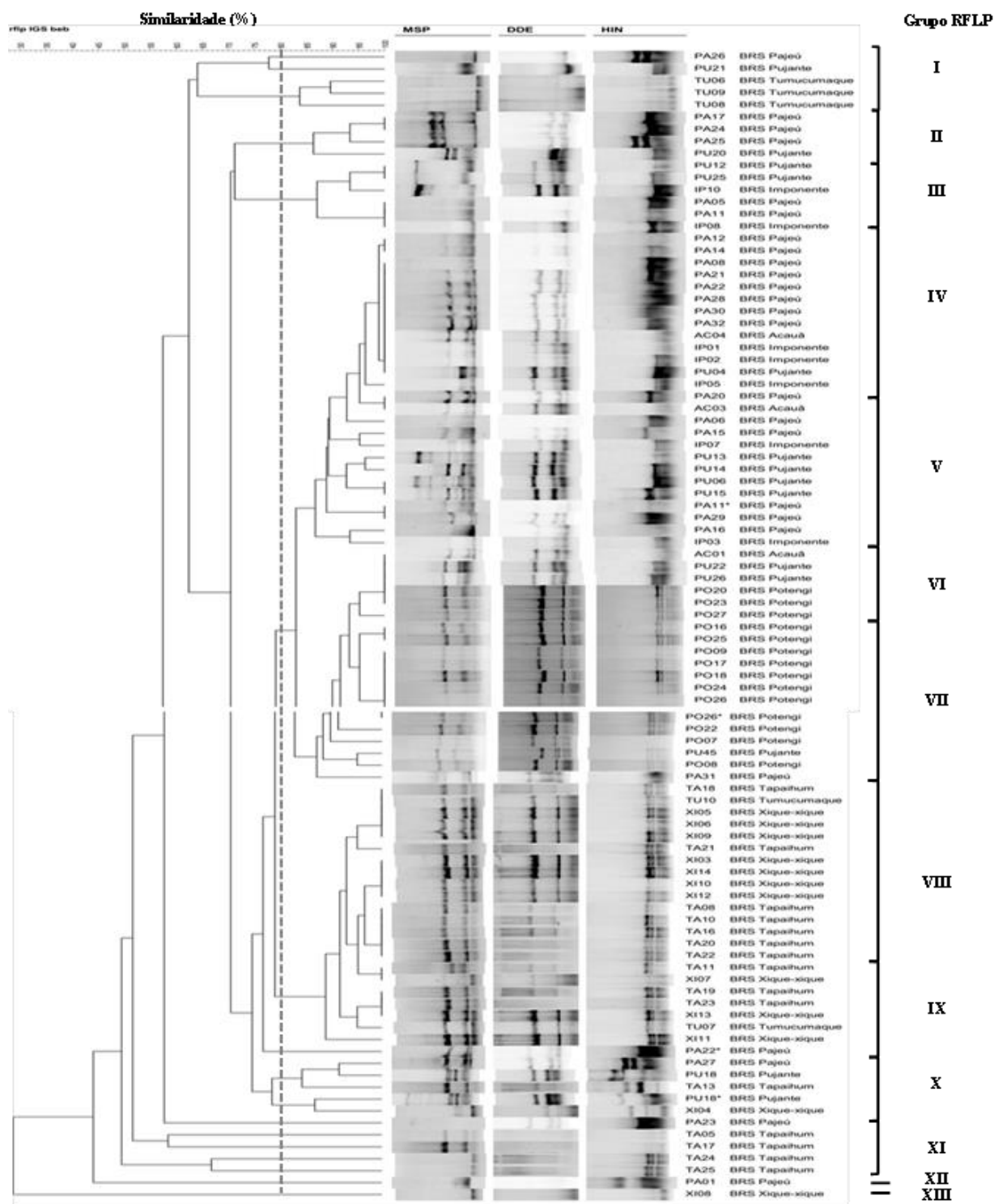


Figura 3. Dendrograma gerado a partir do padrão de bandas da restrição de IGS-RFLP digerido pelas enzimas *Msp* I, *Dde* I e *Hin*6 I de bactérias isoladas de nove diferentes variedades de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.].

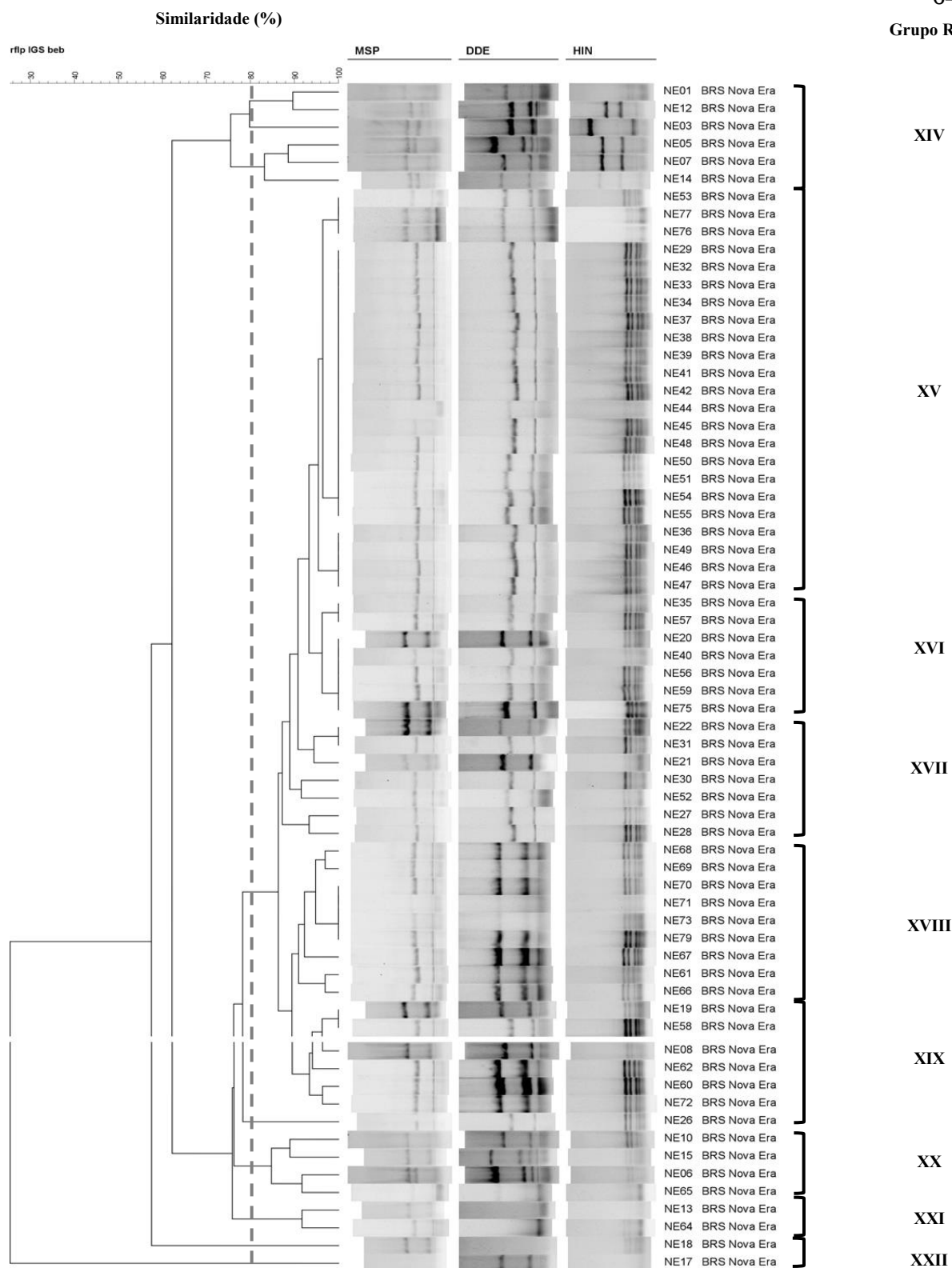


Figura 4. Dendrograma gerado a partir do padrão de bandas da restrição de IGS-RFLP digerido pelas enzimas *Msp* I, *Dde* I e *Hin*6 I de bactérias diazotróficas isoladas da variedade de feijão-caupi BRS Nova Era.

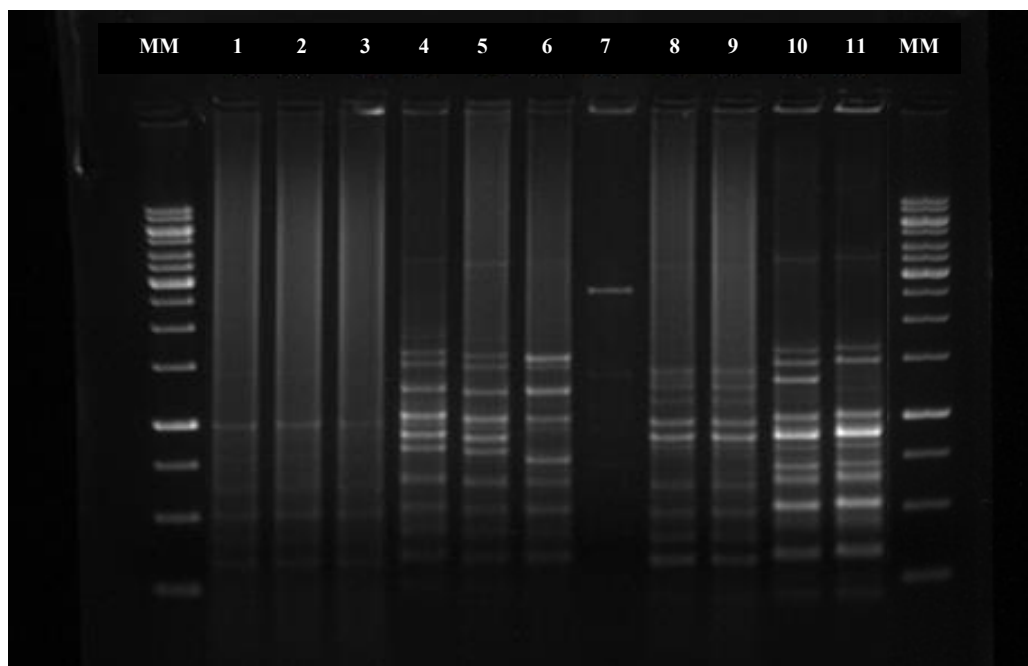


Figura 5. Perfis gerados por meio do *fingerprint* molecular de BOX-PCR de isolados bacterianos do grupo IGS RFLP XV da variedade BRS Nova Era proveniente de nódulos coletados na estação experimental de Bebedouro, Petrolina-PE.

Também foram enviados para sequenciamento produto de IGS-PCR de dois isolados, MA01 e MA02, que não foram colocados para análise de RFLP e BOX-PCR, mas apresentaram características morfológicas distintas dos demais isolados obtidos.

No total, 35 isolados de bactérias tiveram o IGS sequenciado. O isolado PA26 foi identificado como pertencente ao gênero *Pseudomonas* e XI04 e XI09 foram identificados como membro do gênero *Mycobacterium*. Portanto, para estes 35 isolados bacterianos as sequências obtidas apresentaram qualidade satisfatória e foram comparados com aquelas sequências disponíveis no banco de dados do GenBank por meio da ferramenta BLASTn. Dentre as sequências analisadas, 80% pertenceram ao gênero *Bradyrhizobium*, 5,7% a *Rhizobium*, 5,7% a *Microvirga*, 5,7% *Mycobacterium* e 2,9 % a *Pseudomonas* (Tabela 6).

Os isolados que foram encaminhados para sequenciamento apresentaram capacidade de nodular as raízes de feijão-caupi em experimento de autenticação em casa de vegetação, com exceção dos isolados IP08, MA02 e PA25.

Trabalhos tem reportado a presença de estirpes não rizobianas em nódulos de feijão-caupi, que se encontram nos nódulos como bactérias endofíticas, e podem ser capazes de contribuir no incremento de N através do processo de FBN (DA COSTA et al., 2013; LEITE et al., 2017). Costa et al. (2013) relataram que bactérias do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus* foram capazes de nodular raízes da variedade BR-17 Gurguéia. A capacidade de bactérias que “*a priori*” não estão relacionados ao rizóbios nodularem raízes de leguminosas pode estar associada à transferência lateral de genes simbióticos (por exemplo, *nodC*) entre bactérias presentes no solo (BONTEMPS et al., 2010; LEITE et al., 2017; MARTÍNEZ-HIDALGO; HIRSCH, 2017). Leite et al. (2017) também reportam a presença de não-rizóbios em nódulos de feijão-caupi, e onde encontraram sequências de bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Chryseobacterium* e *Sphingobacterium* em maior abundância nos nódulos das variedades BRS Acauã e BRS Pujante. Mesmo não apresentando capacidade de nodular ou de fixar N, bactérias não-rizobianas que são encontradas em nódulos podem apresentar outras funções que favoreçam o desenvolvimento do vegetal, como síntese de hormônios vegetais (por exemplo, auxinas), funções específicas na interação em micro-organismos e produção de celulasas (MARTÍNEZ-HIDALGO et al., 2014; MARTÍNEZ-HIDALGO; HIRSCH, 2017; MISHRA et al., 2009).

O gênero *Bradyrhizobium* é reportado na literatura como o principal grupo de simbiontes capazes de nodular raízes de feijão-caupi (TAMPAKAKI et al., 2017a; WADE et al., 2014), e espécies desse gênero têm sido reportadas em solos do semiárido brasileiro (RIBEIRO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018; SANTOS et al., 2017), inclusive em feijão-caupi (Xavier et al., 1998; Martins et al., 2003; Marinho et al., 2017). No presente estudo, o sequenciamento da região IGS revelou a predominância de isolados (24) que apresentaram entre 92 e 95% de identidade com a estirpe *Bradyrhizobium japonicum* USDA 91, o que corrobora a predominância de *Bradyrhizobium* do clado *B. japonicum* nos solos da região.

Willems et al. (2003) reportam que estirpes do gênero *Bradyrhizobium* que apresentam IGS com identidade abaixo de 95,5% podem representar espécies distintas (MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009; WILLEMS et al., 2003), sendo assim os isolados IP02, IP07, NE01, NE17, NE28, NE31, NE32, NE40, NE44, NE51, NE53, NE60,

NE64, NE67, NE73, PA01, PA05, PA08, PO07, PO08, TA08, TA25, XI06 e XI07 encontrados nesse estudo podem ser pertencentes a novas espécies de *Bradyrhizobium*.

Os resultados indicam que diferentes perfis produzidos pelas endonucleases *Msp* I, *Dde* I e *Hin6* I resultaram na discriminação de grupos de bactérias predominantemente associadas à *B. japonicum* (Tabela 6), sendo relacionado a muitos grupos do IGS-RFLP.

Também foram encontrados isolados relacionados à *Bradyrhizobium* sp. LMG 10697 (99%), *Bradyrhizobium* sp. ORS 3259 (99%) e *Bradyrhizobium* sp. ORS 3650 (99%) (Tabela 6), que são espécies próximas a *B. japonicum* e *B. liaoningense* (KRASOVA-WADE et al., 2003; SENE et al., 2013; WILLEMS et al., 2001). A estirpe *Bradyrhizobium* sp. LMG 10697 foi isolada a partir de nódulos de *Faidherbia albida*, cultivada no Senegal (WILLEMS et al., 2001). A estirpe *Bradyrhizobium* sp. ORS 3259 também foi isolada em solo senegalês, porém foi isolada a partir de nódulos de variedades locais de feijão-caupi (KRASOVA-WADE et al., 2003). A estirpe *Bradyrhizobium* sp. ORS 3650 foi isolada de solos com diferentes plantações com leguminosas também no Senegal (SENE et al., 2013). Essas estirpes foram obtidas em solos de regiões áridas e semiáridas, com condições climáticas semelhantes às da estação de Bebedouro onde os experimentos foram realizados, indicando que estas condições podem favorecer o desenvolvimento dessas bactérias e consequentemente o estabelecimento da simbiose de estirpes do clado *B. japonicum* com o feijão-caupi em solos de regiões semiáridas.

Tabela 6. Identificação dos isolados bacterianos de *Vigna unguiculata* L. em experimento realizado na estação experimental de Bebedouro, Petrolina – PE, por meio da comparação das sequências parciais da região 16S-23S (IGS) com as disponibilizadas pelo NCBI.

Isolado	Origem (Variedade)	Grupo RFLP	pb	Melhor correspondência	Cobertura (%)	Identidade (%)
AC01	BRS Acauã	VI	728	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMG 10697	100	99
IP02	BRS Imponente	IV	823	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	92
IP03	BRS Imponente	V	973	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3259	85	99
IP07	BRS Imponente	V	610	<i>B. japonicum</i> USDA 91	99	95
IP08	BRS Imponente	III	201	<i>Rhizobium</i> sp. S41	82	98
MA01	BRS Marataoã	**	753	<i>Microvirga ossetica</i> V5/3M ^T	99	85
MA02	BRS Marataoã	**	992	<i>Microvirga ossetica</i> V5/3M ^T	77	89
NE01	BRS Nova Era	XIV	986	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	93
NE17	BRS Nova Era	XXII	554	<i>B. japonicum</i> USDA 91	99	95
NE28	BRS Nova Era	XVII	974	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	92
NE31	BRS Nova Era	XVII	800	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	92
NE32	BRS Nova Era	XV	619	<i>B. japonicum</i> USDA 91	99	95
NE40	BRS Nova Era	XVI	994	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	93
NE44	BRS Nova Era	XV	526	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	95
NE49	BRS Nova Era	XV	961	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3650	87	99
NE51	BRS Nova Era	XV	736	<i>B. japonicum</i> USDA 91	97	93
NE53	BRS Nova Era	XV	764	<i>B. japonicum</i> USDA 91	94	93
NE60	BRS Nova Era	XIX	774	<i>B. japonicum</i> USDA 91	94	93

NE64	BRS Nova Era	XXI	838	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	92
NE67	BRS Nova Era	XVIII	1012	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	93
NE73	BRS Nova Era	XVIII	974	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	93
PA01	BRS Pajeú	XII	996	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	93
PA05	BRS Pajeú	III	880	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	92
PA08	BRS Pajeú	IV	693	<i>B. japonicum</i> USDA 91	97	94
PA25	BRS Pajeú	II	855	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3650	77	87
PA26	BRS Pajeú	I	268	<i>Pseudomonas</i> sp. FGI182	83	97
PO07	BRS Potengi	VII	606	<i>B. japonicum</i> USDA 91	99	94
PO08	BRS Potengi	VII	792	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	92
PO09	BRS Potengi	VII	542	<i>Rhizobium</i> sp. CI-39Bx	100	91
TA08	BRS Tapaihum	VIII	629	<i>B. japonicum</i> USDA 91	97	95
TA25	BRS Tapaihum	XI	786	<i>B. japonicum</i> USDA 91	97	95
XI04	BRS Xique-xique	X	536	<i>Mycobacterium</i> sp. YC-RL4	88	84
XI06	BRS Xique-xique	VIII	969	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	93
XI07	BRS Xique-xique	IX	657	<i>B. japonicum</i> USDA 91	100	94
XI09	BRS Xique-xique	VIII	543	<i>Mycobacterium</i> sp. YC-RL4	88	85

Devido à distância filogenética entre os gêneros de rizóbios encontrados nesse estudo, três árvores filogenéticas foram construídas separadamente, com o intuito de manter alinhamentos com um número mínimo de 400 bases contínuas. Para a construção das árvores filogenéticas, algumas sequências dos isolados encontrados nesse estudo que apresentaram tamanhos inferiores de 500 pb foram retiradas das análises filogenéticas.

A árvore filogenética baseada no sequenciamento da região IGS dos isolados relacionados ao gênero *Bradyrhizobium* (Fig. 6) mostra que eles estão inseridos em um clado consistente (85% bootstrap). As estirpes *Bradyrhizobium* sp. LMG 10697, *Bradyrhizobium* sp. LMG 10664, *Bradyrhizobium* sp. LMG 10700, *Bradyrhizobium* sp. ORS 3650 e *Bradyrhizobium* sp. ORS 3651 e os isolados IP02, IP03 e NE31 formaram um subgrupo com *Bradyrhizobium* sp. ORS 3644, *Bradyrhizobium canariense* CCBAU 51257 e *Bradyrhizobium* sp. ORS 3259. Baseado em análises filogenéticas do 16S rRNA e IGS, o gênero *Bradyrhizobium* é dividido em duas linhagens: espécies filogeneticamente mais próximas relacionadas no clado com a *B. japonicum* compõem a linhagem 1, e aquelas que estão no clado de *B. elkanii* formam a linhagem 2 (MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009; TAMPAKAKI et al., 2017a). No presente estudo, os isolados obtidos estão inseridos no grande clado que representa a linhagem 1 (Fig. 6). Este fato pode indicar a dominância de espécies dessa linhagem no solo do experimento, ou a preferência das variedades de feijão-caupi para a realização da simbiose com estirpes mais relacionadas filogeneticamente à *B. japonicum*.

Oliveira (2018) relatou a presença predominante de isolados bacterianos relacionados à *Bradyrhizobium* sp. LMG 10700, e *Bradyrhizobium* sp. ORS 3650 e *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071^T, que pertencem ao clado *B. japonicum*, em um estudo sobre a influência do biochar na interação entre rizóbios e feijão-caupi, em solo coletado no Campo Experimental de Bebedouro. A predominância de bactérias relacionadas ao clado *B. japonicum* também foi reportada por Sena (2018) em feijão-caupi cultivado em solos do Semiárido baiano, e por Santos et al. (2017) em solos coletados em Barbalha – CE e Juazeiro-BA utilizando como hospedeiro o amendoim (*Arachis hypogaea* L.).

As variedades de feijão-caupi nas quais houve a predominância de *Bradyrhizobium* sp. apresentaram valores de produtividade semelhantes ou superiores aos tratamentos adubados com N e inoculados com bactérias comerciais recomendadas para a cultura (tabela 3). Por isso torna-se importante a continuação dos estudos moleculares, sequenciando outros genes (por exemplo, *recA*, *glnII* e *gyrB*) para confirmação se o isolado encontrado de fato é uma nova

espécie, e mais estudos sobre a eficiência agronômica dessa bactéria visando maior produtividade da cultura do feijão-caupi e possível indicação como inoculante para a cultura.

Dos 35 isolados sequenciados apenas dois pertencem ao gênero *Rhizobium*. O isolado PO09 apresentou 91% de identidade com *Rhizobium* sp. CI-39Bx, isolado originalmente em Bondoukou na Costa do Marfim, a partir de nódulos de *Cajanus cajan* (L. Millsp.) (FOSSOU et al., 2016), o clima quente e seco (árido) que possivelmente favorece o desenvolvimento desta espécie. Como citado anteriormente, o percentual de identidade indica que PO09 pode ser uma nova espécie e, assim, mais estudos taxonômicos e moleculares são necessários para a certificação desta espécie. A análise filogenética revelou que o isolado PO09 forma um clado bem consistente (95% de bootstrap) com *Rhizobium* sp. CI-39Bx sendo filogeneticamente mais próxima de espécies relacionada à *R. etli* (Fig. 7). O isolado IP08 também pertence ao gênero *Rhizobium*, porém a sequência foi de baixa qualidade e um pequeno trecho alinha com *Rhizobium* sp. S4, sendo necessária à obtenção de mais sequências para confirmar a posição taxonômica destas bactérias.

Os isolados MA01 e MA02 foram obtidos de nódulos da variedade BRS Marataoã e apresentam 85 e 89% de identidade com *Microvirga ossetica* V5/3M^T (Tabela 6) e provavelmente também seriam uma nova espécie do gênero *Microvirga*. As análises filogenéticas confirmaram que os isolados MA01 e MA02 formam um clado com alto valor de suporte (100% de bootstrap) com a *Microvirga ossetica* V5/3M^T (Fig. 8) que foi isolada de nódulos de *Vicia alpestris* Steven extraídos de solos do Cáucaso (SAFRONOVA et al., 2017). Isolados relacionados a essa espécie também foram relatados por Oliveira (2018) e Sena (2018) em *Vigna unguiculata* L. cultivada em solos do Semiárido nordestino. Nunes et al. 2018) reportaram a presença de uma bactéria do gênero *Microvirga* com características fenotípicas semelhantes às desse gênero e filogeneticamente próximas à espécie *Microvirga vignae*, recuperadas a partir de nódulos de *Stylosanthes capitata* Vogel em solos coletados no Semiárido brasileiro. A alta incidência de recuperação de isolados bacterianos de *Microvirga* em áreas áridas e semiáridas pode fornecer um indicativo da alta competitividade das espécies desse grupo de bactérias em relação a outras espécies nativas. Estudos sobre diversidade de bactérias nativas e inoculação de estirpes de *Microvirga* alóctones pode melhor informar sobre a competitividade e desempenho de estirpes desse gênero na cultura no feijão-caupi.

O gênero *Microvirga* foi descrito por Kanso e Patel (2003) e recentemente quatro novas espécies que apresentam capacidade de fixar N atmosférico foram descritas (ARDLEY et al., 2012; RADL et al., 2014). Dentre estas, a espécie *Microvirga vignae* (RADL et al., 2014) que foi descrita a partir de nódulos de feijão-caupi cultivado na região de Laranjeiras (SE)

(MARTINS; NEVES; RUMJANEK, 1997). Sua capacidade de fixar N e incremento da produtividade na cultura do feijão-caupi tem sido reportada (GUALTER et al., 2011; MARINHO et al., 2014). Marinho et al. (2014) relataram que *Microvirga vignae* BR 3299^T inoculada nas variedades BRS Acauã, BRS Carijó, BRS Pujante e BRS Tapaihum contribuiu para que essas cultivares apresentassem produções de grãos entre 1291 e 1370 kg ha⁻¹ equivalente às dos tratamentos com estirpes de elite recomendadas para a cultura do feijão-caupi no semiárido de Pernambuco.

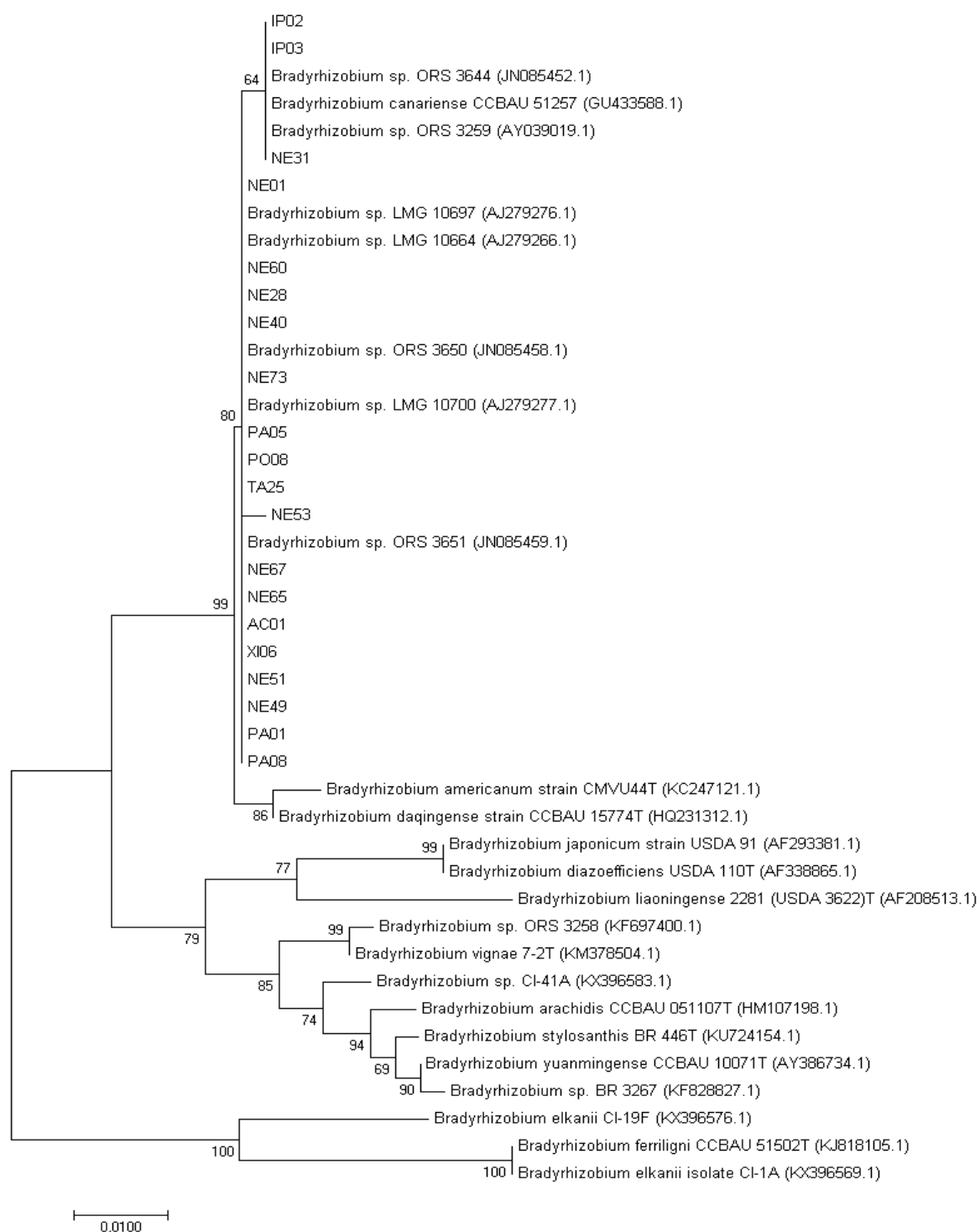


Figura 6. Árvore filogenética com base nas sequências parciais da região IGS (16S – 23S rRNA) dos isolados do gênero *Bradyrhizobium* em diferentes variedades de feijão-caupi. Agrupamento utilizado Neighbor-Joining. Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50% representados.

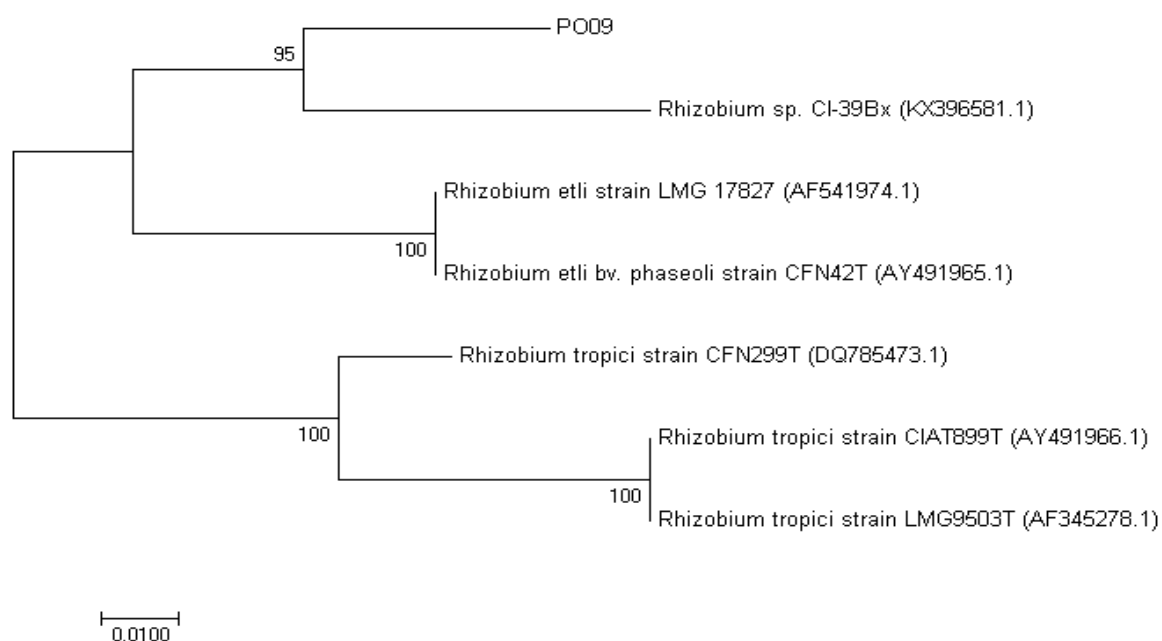


Figura 7. Árvore filogenética com base nas sequências parciais da região IGS (16S – 23S rRNA) dos isolados do gênero *Rhizobium* em diferentes variedades de feijão-caupi. Agrupamento utilizado Neighbor-Joining. Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50% representados.

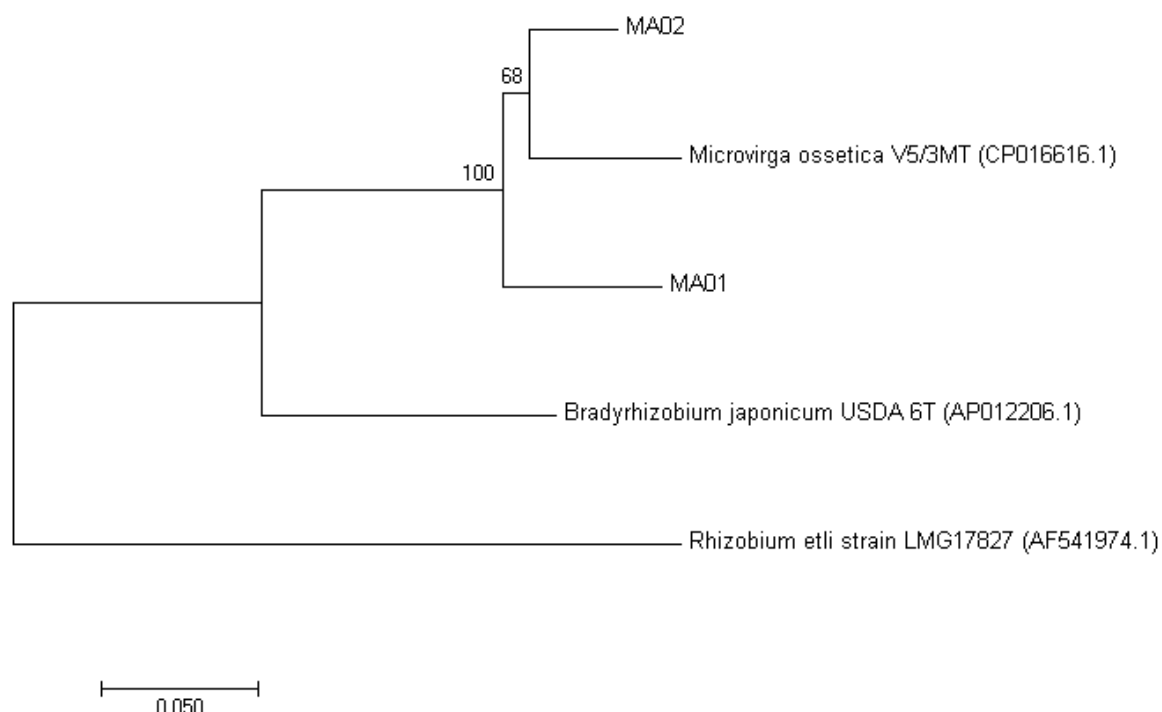


Figura 8. Árvore filogenética com base nas sequências parciais da região IGS (16S – 23S rRNA) dos isolados do gênero *Microvirga* em diferentes variedades de feijão-caupi. Agrupamento utilizado Neighbor-Joining. Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50% representados.

5 CONCLUSÃO

A inoculação de estirpes de bactérias diazotróficas em cultivos de feijão-caupi contribui para o desenvolvimento e aumento da produção vegetal no semiárido de Pernambuco. De forma geral, os inoculantes são importantes para fixação de N nas diferentes variedades de feijão-caupi (com até 70% de N derivado do processo de FBN), resultando em grandes quantidades de nutrientes fixadas e acumuladas na biomassa dessa cultura.

O aporte de N acumulado na biomassa aérea das plantas inoculadas com estirpes de rizóbios é equivalente ou superior ao dos tratamentos com adubação nitrogenada. Assim, além do agricultor se beneficiar com a produção de grãos, é possível utilizar a parte aérea, rica em N, como adubo verde para incorporação de nutrientes ao solo, favorecendo as culturas subsequentes.

Embora não haja especificidade entre estirpes de bactérias e variedades de caupi, as diferenças registradas nos tratamentos para diversos parâmetros avaliados (produtividade de grãos, N fixado, N acumulado na biomassa seca) são bons indicativos de que ocorrem preferências entre os genótipos de plantas e bactérias em condições semiáridas. Contudo, mais estudos sobre essa interação rizóbio x variedade na produção de grãos contribuirão significativamente para a disponibilização de inoculantes eficazes e de baixo custo para o cultivo dessa importante leguminosa nas áreas semiáridas do Brasil.

Os resultados do tratamento “controle absoluto”, representado por ausência de adubação nitrogenada e inoculação com estirpes alóctones, indicam o relevante papel das bactérias nativas. Portanto, o potencial biotecnológico da comunidade nativa pode fornecer melhor opção do que a introdução de estirpes oriundas de diferentes solos/condições ambientais.

A utilização de técnicas moleculares é importante para a identificação da diversidade de bactérias diazotróficas nativas. A predominância de uma possível nova espécie de *Bradyrhizobium* na maioria das variedades, identificada com base em sequências do IGS, demonstra a alta adaptabilidade desta bactéria, capaz de nodular diferentes genótipos de feijão-caupi. Possivelmente, essa espécie bacteriana exerce grande influência no aporte de N através da FBN, desenvolvimento vegetativo e produção de grãos nas variedades de feijão-caupi em que o controle absoluto se destacou.

Além da presença de uma possível nova espécie de *Bradyrhizobium*, também foram registradas duas possíveis novas espécies dos gêneros *Rhizobium* e *Microvirga*. Esses resultados indicam que solos do semiárido do Brasil apresentam uma rica comunidade de

rizóbios que pode ser considerada em futuras pesquisas direcionadas à produtividade de feijão-caupi.

Como perspectivas futuras, a realização de estudos sobre diversidade, eficiência simbiótica e aplicação de estirpes nativas de bactérias em cultivo de caupi poderá contribuir para obtenção de resultados mais promissores do ponto de vista agronômico e ecológico.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J. P. P. DE et al. **Cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp: descrição e recomendações técnicas de cultivo**. Goiania: Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP), 1984.
- ARDLEY, J. K. et al. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 2579–2588, 2012.
- BARBOSA, M. A. M. et al. Bradyrhizobium improves nitrogen assimilation, osmotic adjustment and growth in contrasting cowpea cultivars under drought. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 13, p. 1983–1989, 2013.
- BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Measurement of N₂ fixation in 30 cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes under field conditions in Ghana, using the 15N natural abundance technique. **Symbiosis**, v. 48, n. 1–3, p. 47–56, 2009.
- BONTEMPS, C. et al. Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 44–52, 2010.
- BOTTOMLEY, P. J.; MYROLD, D. D. Biological N Inputs. In: **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 4 ed., ch. 15, 2015, p. 447-470.
- BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2005.
- CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A.; FERRAZ, S. M. G. Biological N₂ fixation and mineral N in common bean-maize intercropping or sole cropping in southeastern Brazil. **Experimental Agriculture**, v. 43, n. 3, p. 319–330, 2007.
- CARVALHO, M. et al. Cowpea: a legume crop for a challenging environment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 13, p. 4273–4284, 2017.
- CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão- Material e métodos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 4, p. 709–714, 2010.
- CHIBEBA, A. M. et al. Isolation, characterization and selection of indigenous Bradyrhizobium strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 246, n. May, p. 291–305, 2017.
- COOPER, J. E. Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. **Advances in Botanical Research**, 2004.
- CRAUFURD, P. Q. et al. Development in cowpea (*Vigna unguiculata*). I. The influence of

- temperature on seed germination and seedling emergence. **Experimental Agriculture**, v. 32, n. 01, p. 1–12, 1996.
- DA COSTA, E. M. et al. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1275–1284, 2013.
- DALL'AGNOL, R. F. et al. Paraburkholderia nodosa is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (Phaseolus vulgaris L.) in the Brazilian “Cerradão”. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 8, p. 1–14, 2016.
- DANSO, S. K. A.; BOWEN, G. D.; SANGINGA, N. **Biological nitrogen fixation in trees in agro-ecosystems** Plant and Soil, 1992.
- DE ALCANTARA, R. M. C. M. et al. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. **Revista Ciencia Agronomica**, 2014.
- DELIDOW, B. C. et al. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocols. In: WHITE, B. A. (Ed.). **Methods in molecular biology**. 1. ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 1993. v. 15p. 29.
- DEMEZAS, D. H. et al. Genetic diversity among Rhizobium leguminosarum bv. trifolii strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, 1991.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.
- EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (Vigna unguiculata L. Walp.). **Field Crops Research**, v. 53, n. 1–3, p. 187–204, 1997.
- EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2009.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Socioeconomia arroz e feijão**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 19 nov. 2018.
- FAO. **Cowpwa (Vigna unguiculata L.)**. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/data/pf000090.htm>>. Acesso em: 19 nov. 2018.
- FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 19 nov. 2018.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 2011.
- FLORENTINO, L. A. et al. Diversity and efficiency of bradyrhizobium strains isolated from soil samples collected from around sesbania virgata roots using cowpea as trap species. **Revista**

Brasileira de Ciência do Solo, v. 34, n. 4, p. 1113–1123, 2010.

FOSSOU, R. K. et al. Two major clades of bradyrhizobia dominate symbiotic interactions with pigeonpea in fields of Côte d'Ivoire. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–11, 2016.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 35–59, 2009.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, Evolução e Domesticação do caupi. **O caupi no Brasil**, p. 722, 1988.

FREIRE FILHO, F. R. et al. **Feijão-Caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2011, p. 85.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. DE A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. 1 ed., Brasília, Embrapa informação tecnológica, 2005, p. 519.

FREITAS, A. D. S. DE et al. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 497–504, 2007.

FREITAS, A. D. S. DE; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. DE S. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 109–114, 2012.

GARG, N.; GENSEIGNÉ, N. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, n. 1, p. 59–68, 2007.

GERMANO, M. G. et al. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 217–229, 2006.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237–245, 2015.

GOPALAKRISHNAN, S.; SATHYA, A. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. **3 Biotech**, p. 355–377, 2015.

GRANGE, L. et al. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 867–876, 2007.

GRÖNEMEYER, J. L. et al. Rhizobia indigenous to the okavango region in sub-saharan Africa: Diversity, adaptations, and host specificity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 23, p. 7244–7257, 2014.

GUALTER, R. M. R. et al. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 303–308, 2011.

- GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6726–6733, 2012.
- HALL, A. E. Breeding for adaptation to drought and heat in cowpea. **European Journal of Agronomy**, v. 21, n. 4, p. 447–454, 2004.
- HIRSCH, P. R. Population Dynamics of Indigenous and Genetically Modified Rhizobia in the Field Published by : Wiley on behalf of the New Phytologist Trust Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. v. 133, n. 1, p. 159–171, 1996.
- HÖGBERG, P. 15N natural abundance in soil – plant systems. **New Phytologist**, 1997.
- HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, 1991.
- HUNGRIA, M. et al. Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR. **Embrapa**, p. 4, 2008.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2–3, p. 151–164, 2000.
- IMADA, E. L. et al. Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter Rhizobium tropici CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. **Research in Microbiology**, n. November, p. 1–10, 2016.
- JAISWAL, S. K.; MSIMBIRA, L. A.; DAKORA, F. D. Phylogenetically diverse group of native bacterial symbionts isolated from root nodules of groundnut (Arachis hypogaea L.) in South Africa. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 215–226, 2017.
- JÚNIOR, P. I. F.; REIS, V. M. **Algumas limitações a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008.
- KALITA, M.; MAŁEK, W. Molecular phylogeny of Bradyrhizobium bacteria isolated from root nodules of tribe Genisteae plants growing in southeast Poland. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 482–491, 2017.
- KANSO, S.; PATEL, B. K. C. Microvirga subterranea gen. nov., sp. nov., a moderate thermophile from a deep subsurface Australian thermal aquifer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 401–406, 2003.
- KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive Streptococcus pneumoniae BOX elements in diverse bacteria. **Genome research**, 1995.

- KRASOVA-WADE, T. et al. Diversity of indigeneous bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa). **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 13–22, 2003.
- LACERDA, A. M. et al. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, v. 51, n. 293, p. 67–82, 2004.
- LAGUERRE, G. et al. Classification of rhizobia based on *nifH* and *nifD* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, n. 2001, p. 981–993, 2001.
- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2029–2036, 1996.
- LA PEÑA, C. T.; FEDEROVA, E.; LUCAS, M. M. The Symbiosome: Legume and Rhizobia Co-evolution toward a Nitrogen-Fixing Organelle? **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. January, p. 1–26, 2018.
- LEITE, J. et al. Biodiversity of rhizobia associated with cow pea cultivars in soils of the lower half of the Sao Francisco river valley. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 33, n. 1, p. 1215–1226, 2009.
- LEITE, J. et al. Cowpea Nodules Harbor Non-rhizobial Bacterial Communities that Are Shaped by Soil Type Rather than Plant Genotype. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. January, p. 1–11, 2017.
- LEITE, J. et al. Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–11, 2018.
- MARINHO, R. DE C. N. et al. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 395–402, 2014.
- MARINHO, R. DE C. N. et al. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian semi-arid. **Bragantia**, v. 76, n. 2, p. 273–281, 2017.
- MARSH, L. E. et al. Temperature Effects on *Bradyrhizobium* spp . Growth and Symbiotic Effectiveness with Pigeonpea and Cowpea. 2006.
- MARTENS, M. et al. Multilocus sequence analysis of Ensifer and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 489–503, 2007.
- MARTIN, B. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of

- Streptococcus pneumoniae. **Nucleic Acids Research**, 1992.
- MARTINELLI, L.; OMETTO, J.; FERRAZ, E. **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. [s.l: s.n.].
- MARTÍNEZ-HIDALGO, P. et al. Endophytic Micromonospora from Medicago sativa are apparently not able to fix atmospheric nitrogen. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 74, p. 201–203, 2014.
- MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; HIRSCH, A. M. The Nodule Microbiome: N₂-Fixing Rhizobia Do Not Live Alone. **Phytobiomes**, v. 1, n. 2, p. 70–82, 2017.
- MARTINS, L. M. V. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 6, p. 333–339, 2003.
- MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 1005–1010, 1997.
- MASSON-BOIVIN, C. et al. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 458–466, 2009.
- MENEZES, R. et al. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3 suppl, p. 643–653, 2012.
- MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glnII, recA, atpD and dnaK genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 2934–2950, 2009.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in Bradyrhizobium: Supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 3052–3067, 2011.
- MISHRA, P. K. et al. Isolation, molecular characterization and growth-promotion activities of a cold tolerant bacterium Pseudomonas sp. NARs9 (MTCC9002) from the Indian Himalayas. **Biological Research**, v. 42, n. 3, p. 305–313, 2009.
- MOREIRA, F. M. DE S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006, p. 729.
- MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, 1990.
- NEVES, A. C. et al. Cultivo do Feijão-caupi em Sistema Agrícola Familiar. **Circular Técnica**

51, 2011.

NUNES, G. F. DE O. et al. Polyphasic characterization of forage legumes root nodule bacteria isolated from semiarid region in Brazil. v. 41, n. 3, p. 612–624, 2018.

OLDROYD, G. E. D. et al. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 119–144, 2011.

OLIVEIRA, G. S. **Influência do biochar na interação rizóbio feijão-caupi em dois solos do sertão do São Francisco**. [s.l.] Universidade Estadual da Paraíba, 2018.

PEIX, A. et al. Bacterial Associations with Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. November 2014, p. 17–42, 2015.

PEREIRA, A. L.; BENEDITO, E. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas. **Revista biociências**, 2007.

PÉREZ-YÉPEZ, J. et al. Evaluation of seven housekeeping genes for multilocus sequence analysis of the genus *Mesorhizobium*: Resolving the taxonomic affiliation of the *Cicer canariense* rhizobia. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 553–559, 2014.

PERRET, X. et al. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity Xavier. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. June, p. 2013, 2000.

PUOZAA, D. K.; JAISWAL, S. K.; DAKORA, F. D. African origin of *Bradyrhizobium* populations nodulating Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc) in Ghanaian and South African soils. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184943, 2017.

RADL, V. et al. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 3, p. 725–730, 2014.

RAHMAN, M. T. et al. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. **Anwer Khan Modern Medical College Journal**, v. 4, n. 1, 2013.

RIBEIRO, P. R. A. et al. Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 212, p. 85–93, 2015.

ROBERTSON, G. P.; GROFFMAN, P. M. Nitrogen Transformations. In: **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 4 ed., ch. 15, 2015, p. 421–446.

ROCHE, P. et al. The common nodABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 26, p. 15305–15310, 1996.

RODRIGUES, D. R. et al. Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 503–512, 2018.

- ROGEL, M. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTINEZ ROMERO, E. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 96–104, 2011.
- RUFINI, M. et al. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutrudox. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 1, p. 115–122, 2014.
- SAFRONOVA, V. I. et al. Microvirga ossetica sp. nov., a species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species Vicia alpestris Steven. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 94–100, 2017.
- SANTOS, J. W. M. DOS et al. Molecular and symbiotic characterization of peanut bradyrhizobia from the semi-arid region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 121, n. August, p. 177–184, 2017.
- SENA, P. T. S. **Caracterização polifásica de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos sob diferentes usos agrícolas do semiárido baiano**. [s.l.] Universidade do Estado da Bahia, 2018.
- SENE, G. et al. The Abundance and Diversity of Legume-Nodulating Rhizobia in 28-Year-Old Plantations of Tropical, Subtropical, and Exotic Tree Species: A Case Study from the Forest Reserve of Bandia, Senegal. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 128–144, 2013.
- SERRANO, L. O. DE. Biotechnology of siderophores in high-impact scientific fields. v. 8, p. 169–178, 2017.
- SHEARER, G.; KOHL, D. H. N₂-Fixation in Field Settings: Estimations Based on Natural ¹⁵N Abundance. **Review Aust. J. Plant Physiol**, 1986.
- SILVA, F. V. et al. Genetic diversity of rhizobia isolates from Amazon soils using cowpea (Vigna unguiculata) as trap plant. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 682–691, 2012.
- SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B.; NAKAO, P. L. Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: myth and realities. In: **Myths and Science of Soils of the Tropics**. 1 ed., Madison, 1992, p. 135-156.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; WERNARS, K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v.23, n. 3, p. 249-261, 1997.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology. **Garber, R. (ed). Springer-Verlag New York**, 1994.
- SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: **Nutrição mineral de plantas**. 1 ed, Viçosa, 2006, p. 215-252.

- STERN, M. J. et al. Repetitive extragenic palindromic sequences: A major component of the bacterial genome. **Cell**, 1984.
- TAMPAKAKI, A. P. et al. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 179–189, 2017a.
- TAMPAKAKI, A. P. et al. A novel symbiovar (aegeanense) of the genus *Ensifer* nodulates *Vigna unguiculata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 13, p. 4314–4325, 2017b.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 2013.
- TIAN, C. F. et al. Population mixing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating *Vicia faba*: The role of recombination and lateral gene transfer. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, n. 3, p. 563–576, 2010.
- TIMKO, M. P.; EHLERS, J. D.; ROBERTS, P. A. Cowpea. **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants: Pulses, Sugar and Tuber Crops**, v. 3, p. 49–67, 2007.
- TIMKO, M. P.; SINGH, B. B. Cowpea, a Multifunctional Legume. **Genomics of tropical crops**, p. 222–258, 2008.
- UNKOVICH, M. et al. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**, 2008.
- VARMA, A.; OELMÜLLER, R. **Advanced Techniques in Soil Microbiology**. Berlin: Springer, 2007.
- VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, 1994.
- WADE, T. K. et al. Eco-geographical diversity of cowpea bradyrhizobia in Senegal is marked by dominance of two genetic types. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 129–139, 2014.
- WANG, D. et al. Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 334–342, 2012.
- WIELBO, J. Rhizobial communities in symbiosis with legumes: Genetic diversity, competition and interactions with host plants. **Central European Journal of Biology**, v. 7, n. 3, p. 363–372, 2012.
- WILLEMS, A. et al. Comparison of sequence analysis of 16S – 23S rDNA spacer regions , AFLP analysis and DNA – DNA hybridizations in Bradyrhizobium groupings in line with previously obtained AFLP data . DNA – DNA hybridizations profiles reflected the overall

- genomic similari. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 2001, p. 623–632, 2001.
- WILLEMS, A. et al. In most Bradyrhizobium groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 203–210, 2003.
- WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: An overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1–2, p. 3–14, 2006.
- WILLIAMS, L.; MILLER, A. Transporter responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 2001.
- WILLIAMS, R. C. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. v. 184, p. 1–10, 1989.
- YARZA, P. et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology**, 2014.
- YOUNG, J. P. W. Bacteria Are Smartphones and Mobile Genes Are Apps. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 12, p. 931–932, 2016.
- ZEIGLER, D. R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1893–1900, 2003.
- ZHANG, W. T. et al. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, 2007.
- ZILLI, J. É. et al. Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 281–287, 2004.
- ZILLI, J. É. et al. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão- caupi em Roraima Contribution of rhizobia strains to cowpea development and grain yield in. **Acta Amazonica**, 2006.
- ZILLI, J. É. et al. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão- caupi em Roraima Contribution of rhizobia strains to cowpea development and grain yield in. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 749–758, 2009.