

LUCIANA REMIGIO SANTOS NASCIMENTO

DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE RIZÓBIOS NATIVOS DO AGRESTE DA  
PARAÍBA, CAPAZES DE NODULAR O FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.)  
Walp)

RECIFE  
PERNAMBUCO - BRASIL  
2009

LUCIANA REMIGIO SANTOS NASCIMENTO

DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE RIZÓBIOS NATIVOS DO AGRESTE DA  
PARAÍBA, CAPAZES DE NODULAR O FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.)  
Walp)

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

Orientadora

Dr<sup>a</sup>. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos

Co-Orientadores

Prof. Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio, PhD.

Dr<sup>a</sup>. Ana Dolores Santiago de Freitas

RECIFE  
PERNAMBUCO - BRASIL  
2009

Ficha Catalográfica

N 244d Nascimento, Luciana Rem ígio Santos  
Diversidade e eficiência de rizóbios nativos do agreste da  
Paraíba capazes de nodular o feijão caupi ( *Vigna unguiculata*  
(L.) W alp ) / Luciana Rem ígio Santos Nascimento. – 2009.  
75 f. : il.

Orientador: Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos  
Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade  
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.  
Inclui referências e anexo.

CDD 631.46

1. Microbiologia do solo
2. Rizóbios nativos
3. Eficiência
4. Caupi
5. Diversidade
6. Paraíba (PB)
  - I. Santos, Carolina Etienne de Rosália e Silva
  - II. Título

**LUCIANA REMIGIO SANTOS NASCIMENTO**

Dissertação defendida e aprovada em 03 de março de 2009 pela banca  
examinadora:

**O R I E N T A D O R A :**

-----  
**Dr<sup>a</sup>. Carolina Etienne de Rosália Silva Santos**  
**(UFRPE)**

**EXAMINADORES:**

-----  
**Dr<sup>a</sup>. Ana Dolores Santiago de Freitas**  
**(UFRPE)**

-----  
**Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina de Luna Galindo**  
**(UFRPE)**

-----  
**Dr. Newton Pereira Stamford**  
**(UFRPE)**

*Ando devagar por que já tive pressa, e levo esse sorriso por que já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe, só levo a certeza de que muito pouco  
eu sei, nada sei*

*Conhecer as manhas e as manhãs, o sabor das massas e das maçãs, é preciso amor  
pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente, compreender a marcha e ir tocando em  
frente, como um velho boiadeiro levando a boiada, eu vou tocando dias pela longa  
estrada eu vou, estrada eu sou*

*Todo mundo ama, um dia todo mundo chora, um dia a gente chega, no outro vai  
embora, cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si carrega o dom de ser  
capaz, e ser feliz*

*Ando devagar porque já tive pressa, e levo esse sorriso porque já chorei demais, cada  
um de nós compõe a sua história, cada ser em si carrega o dom de ser capaz, e ser  
feliz*

*Conhecer as manhas e as manhãs...*

*(Almir Sater)*

Ao meu esposo Clayton Albuquerque de Sousa que sempre esteve ao meu lado incondicionalmente e ao meu filho Lucas Remigio Nascimento de Sousa que é a grande razão de minha vida para perseverar.

#### DEDICO

Aos meus pais Terezinha Santos do Nascimento e Severino Remigio do Nascimento que inestimavelmente apoiaram minhas decisões e por tudo que me ensinaram: saber respeitar, ser verdadeiro e acima de tudo ser humilde de coração.

#### OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos auxilia em todos os momentos de nossas vidas nos fortalecendo na aflição e no desespero, iluminando a nossa trajetória e tornando-a um pouco mais suave através de seu bálsamo.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – pela oportunidade de formação acadêmica no Curso de Zootecnia e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS) pela aceitação, infra-estrutura e formação profissional oferecida pelo quadro de professores e funcionários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida nos dois anos de curso.

Aos meus pais pelo amor incondicional e incentivo aos estudos, por todo o carinho, atenção, preocupação, orientação e confiança, o que até hoje fortalece a força propulsora que sempre me faz seguir em frente.

Ao meu irmão Ricardo Remigio pelo incentivo e confiança depositados em mim.

Ao meu filho Lucas que é a razão maior da minha luta nessa vida. A ele devo tudo.

Ao meu esposo Clayton pelo apoio incondicional tanto nas horas difíceis quanto nas horas alegres, pela cumplicidade, companheirismo, carinho, atenção e amor.

Aos meus tios Mariinha, Eliete e Jonas pelo incentivo aos estudos, perseverança e fé.

Aos primos, parentes e amigos pelo apoio, e a você Fabiana Ribeiro de Paula meu agradecimento pela amizade, respeito e carinho.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos pela atenção e orientação nas horas em que mais precisei no exercício do meu trabalho. E por ter me recebido em sua equipe de pesquisa, me estimulando a percorrer novos caminhos e sendo acima de tudo uma pessoa humilde.

Ao co-orientador Prof. PhD. Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio pelos ensinamentos na iniciação científica e contribuições para este trabalho.

A co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Ana Dolores Santiago de Freitas pela dedicação para as minhas dúvidas, questionamentos, decisões a serem tomadas no trajeto deste trabalho e pela sua amizade e carinho.

Ao Coordenador do PPGCS Prof. Dr. Clístenes Williams Araújo Nascimento pelo seu empenho na área de pesquisa e seu grande desempenho em sua administração.

Aos Professores do PPGCS pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso, em especial a prof. Sheila Bittar pelo incentivo e amizade desde a graduação.

A grande amiga e querida inestimável Iraci Maria Bastos Vieira pela ajuda incondicional na realização deste trabalho, tanto na ordem acadêmica, quanto psíquica e pela grande amizade demonstrada durante toda essa caminhada.

Ao laboratorista Anacleto Júnior, não só pela presteza na realização das análises, mas também pela amizade, carinho e por ter sempre uma palavra de apoio e otimismo.

Aos colegas de turma: Rosemberg Vasconcelos, Luis Guilherme, Rômulo, Patrick Diogo, Carolina Malala, Welka Preston, Terezinha, Carla Regine, Maria da Conceição, André Suêlto, Laerte Amorim, Marise Conceição e aos que partiram em busca de outros horizontes como Susy e Ana Nery pela convivência ao longo desses anos e pelas alegrias e tristezas compartilhadas.

Ao amigo Rosemberg de Vasconcelos Bezerra pela amizade, carinho e por ter me ajudado sempre em palavras, atitudes, sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo pela ajuda, amizade, carinho: Monaliza Mirella (em especial), Antônio, Adeilton, Tatiana, Mariana, Camila, Danielle Braga, Marcelo e Alexandra Oliveira.

Aos amigos Mestres: Maria de Fátima (em especial por ter esclarecido tantas dúvidas), Edivan, Tâmara e Patrícia, pela atenção e amizade.

Aos meus queridos estagiários: Aline, Adriana, Gilka, Carlos Roberto (Júnior) e Alisson (estagiário de última hora), pela grande e infinita ajuda para o término deste trabalho, sem vocês tudo isso não seria possível, o meu eterno agradecimento.

A minha amiga de graduação Érica Carla pela amizade desses anos, pelo apoio, força e carinho.

À Professora Valderez Pontes Matos pelo fornecimento das sementes de algodão e girassol, juntamente com suas co-orientadas Lúcia e Rute.

Aos Laboratórios de Química e Fertilidade do solo pela realização das minhas análises.

Aos funcionários da PPGCS Maria do Socorro dos Santos Santana (Socorro) pela paciência, carinho e atenção prestada quando mais precisava, Severino dos Ramos Basto (Seu Noca) pela alegria que sempre me recebia mesmo que isso incluísse me ver várias vezes ao dia, Josué Camilo por sempre me atender com atenção, e a Seu Narciso o meu muito obrigada por todos os BOM DIAS que fazia questão de me presentear com suas palavras acompanhadas sempre de um sorriso.

A todos aqueles que diretamente e indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
LISTA DE ANEXOS .....	xvi
RESUMO GERAL .....	1
GENERAL ABSTRACT .....	2
INTRODUÇÃO GERAL .....	3
REFERÊNCIAS .....	7
CAPÍTULO I	
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
INTRODUÇÃO .....	13
MATERIAL E MÉTODOS .....	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
CONCLUSÕES .....	36
REFERÊNCIAS .....	37
CAPÍTULO II	
RESUMO .....	43
ABSTRACT .....	44

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS – Experimento 1.....</b>	<b>47</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS – Experimento 2.....</b>	<b>55</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Reação de pH de uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de nódulos de feijão caupi cultivado em solos oriundos de quatro tipos de uso, coletados em três municípios do Agreste da Paraíba.....25
- Figura 2:** Quantidade de muco produzido por uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de nódulos de feijão caupi cultivado em solos oriundos de quatro tipos de uso, coletados em três municípios do Agreste da Paraíba.....28
- Figura 3:** Dendrograma de dados fenotípicos elaborado pelo algoritmo *UPGMA* e matriz de similaridade *Jaccard* mostrando a similaridade entre 52 isolados de rizóbios obtidos de nódulos de plantas de feijão macassar cultivadas em solos do Agreste da Paraíba.....30
- Figura 4:** Índice de diversidade de Shannon em função das coberturas vegetais para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.....32
- Figura 5:** Índice de diversidade de Shannon em função das cultivares de feijão para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.....32
- Figura 6:** Índice de diversidade de Shannon em área de caatinga em função das cultivares de feijão para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.....33
- Figura 7:** Índice de diversidade de Shannon em área de pasto em função das cultivares de feijão para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.....34

<b>Figura 8:</b> Índice de diversidade de Shannon em área de mandioca em função das cultivares de feijão para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.....	34
<b>Figura 9:</b> Índice de diversidade de Shannon em área de feijão em função das cultivares de feijão para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso em três municípios do Agreste da Paraíba.....	35
<b>Figura 1:</b> Biomassa seca da parte aérea de plantas de feijão caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral.....	59
<b>Figura 2:</b> Eficácia relativa da parte aérea de plantas de feijão caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral.....	60
<b>Figura 3:</b> Correlação entre a biomassa seca de nódulos e a biomassa seca da parte aérea de plantas de caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano. Os pontos representam a média de 3 repetições.....	62
<b>Figura 4:</b> Correlação entre a biomassa seca da parte aérea e o nitrogênio total da parte aérea de plantas de caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano. Os pontos representam a média de 3 repetições.....	63
<b>Figura 5:</b> Correlação entre a eficácia relativa e o nitrogênio total da parte aérea de plantas de caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral. Os pontos representam a média de 3 repetições.....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Codificação das características morfofisiológicas dos isolados de rizóbio obtidos em solos sob quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.....	18
<b>Tabela 2:</b> Identificação da origem dos isolados segundo o solo e a variedade.....	21
<b>Tabela 3:</b> Características quanto a elevação, muco, limpa e elasticidade de uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de nódulos de feijão caupi cultivado em solos oriundos de quatro tipos de uso, coletados em três municípios do Agreste da Paraíba.....	27
<b>Tabela 4:</b> Características quanto a cor, forma da borda, transparência e colônia de uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de nódulos de feijão caupi cultivado em solos oriundos de quatro tipos de uso, coletados em três municípios do Agreste da Paraíba.....	29
<b>Tabela 1:</b> Níveis de significância para biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), biomassa seca e número de nódulos (BSN e NN) e nitrogênio total (NT) avaliados em plantas de caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 52 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral.....	52
<b>Tabela 2:</b> Biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), biomassa seca e número de nódulos (BSN e NN) e nitrogênio total (NT) na parte aérea de plantas de feijão caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 52 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral.....	53

**Tabela 3:** Características químicas e físicas do Neossolo Regolítico do município de Remigio – Paraíba, na camada de 0-20cm.....55

**Tabela 4:** Níveis de significância para biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), biomassa seca e número de nódulos (BSN e NN) e nitrogênio total (NT) avaliados em plantas de caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 15 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, presença e ausência de nitrogênio mineral.....58

**Tabela 5:** Níveis de significância das correlações entre biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), biomassa seca e número de nódulos (BSN e NN) e nitrogênio total (NT) de plantas de feijão caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 15 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano.....61

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1:</b> Caracterização fenotípica de uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de nódulos de feijão caupi cultivado em solos oriundos de quatro tipos de uso, coletados em três municípios do Estado da Paraíba.....	70
<b>ANEXO 2:</b> Grupos dos 52 isolados oriundos de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba de acordo com a caracterização fenotípica.....	72
<b>ANEXO 3:</b> Características fenotípicas dos dez diferentes grupos de isolados de rizóbios com 75% de similaridade elaborado pelo algoritmo <i>UPGMA</i> e matriz de similaridade <i>Jaccard</i> .....	73
<b>ANEXO 4:</b> Desenvolvimento das plantas aos 7, 9 14 e 35 dias após germinação (respectivamente A, B, C e D) e os diferentes tratamentos de fontes de nitrogênio (E) em vasos de Leonard.....	74
<b>ANEXO 5:</b> Desenvolvimento das plantas de feijão aos 12 dias após germinação (A); vista geral do experimento (B); plantas de feijão inoculadas com a estirpe recomendada NFB-700 e o isolado S1CV2 A (C); plantas de feijão inoculadas com o isolado S1CV2 A e sem nitrogênio mineral (D); plantas de feijão inoculadas com o isolado S1CV2 A e a estirpe recomendada BR 3267 (E); plantas de feijão inoculadas com os isolados S3CV2 A e S1CV2 A (F)....	75

## RESUMO GERAL

O feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma cultura amplamente distribuída e é capaz de se beneficiar da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) quando em associação com bactérias conhecidas como rizóbios. Essa leguminosa apresenta alta capacidade de nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio na presença de população adequada de rizóbios nativos no solo ou pelo uso de inoculantes eficientes. Através do conhecimento da diversidade de rizóbio presente nos diferentes sistemas agrícolas e das características do rizóbio a ser introduzido, podemos melhorar a adaptabilidade e capacidade competitiva do rizóbio do inoculante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e a eficiência na fixação de nitrogênio (N) de rizóbios isolados a partir de nódulos de feijão caupi cultivado em solos sob diferentes coberturas vegetais do Estado da Paraíba. As amostras de solo foram coletadas da camada arável (0 a 20 cm) de três municípios do agreste paraibano (Solânea, Esperança e Lagoa Seca), com diferentes coberturas vegetais: 1) Caatinga; 2) Pasto; 3) Roçado de Feijão e 4) Roçado de Mandioca. Foram usadas quatro cultivares de caupi (Sempre-Verde, Sedinha, Corujinha e Azul) como plantas iscas. Os nódulos formados tiveram seus rizóbios isolados e caracterizados morfofisiologicamente. Foi realizado o estudo de diversidade para o efeito das coberturas vegetais e para o das cultivares. A avaliação da eficiência foi realizada em duas etapas. Na primeira, 52 isolados foram inoculados na cultivar Sempre Verde, que recebeu também duas estirpes recomendadas, presença e ausência de N mineral, em vasos de Leonard. Na segunda etapa, os 13 melhores isolados oriundos da etapa em vasos de Leonard foram inoculados na mesma cultivar semeada em vasos com solo, bem como as recomendadas e presença e ausência de N mineral. A capacidade de infecção por rizóbios nativos variou entre as cultivares de feijão caupi. A diversidade de rizóbios foi influenciada pelos diferentes manejos agrícolas. Os rizóbios nativos apresentaram alta capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico e foram capazes de promover o desenvolvimento do feijão caupi equivalente à das plantas que receberam adubação com N mineral ou inoculação com estirpes recomendadas.

## GENERAL ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) is a widely spread culture and is able to be benefited by biological nitrogen fixation (BNF) when in association with bacteria known as rhizobia. This legume has a high capacity for nodulation and nitrogen fixation in the presence of appropriate native rhizobia in the soil or by use of efficient inoculants. Through the knowledge of the diversity of rhizobia present in different agricultural systems and the characteristics of the rhizobia meant to be introduced, can improve the adaptability and competitive ability of the rhizobia in the inoculant. The objective of this study was to evaluate the diversity and efficiency in nitrogen fixation (N) of rhizobia isolated from nodules of cowpea cultivated in soil under different vegetation covers in the State of Paraíba. Soil samples were collected from the layer (0 to 20 cm) of three municipalities in Paraíba (Solânea, Esperança and Lagoa Seca), with different vegetation covers: 1) Caatinga 2) Pasture, 3) Beans and 4) Cassava. Four cultivars of cowpea were used (Sempre-Verde, Sedinha, Corujinha and Azul) as test plants. The rhizobia isolated from nodules were morphophysiologicaly characterized. The diversity of rhizobia was studied on the effect of cover crops and on the effect of different cultivars. The efficiency was measured in two steps. At first, 52 isolates were inoculated on cultivar Sempre Verde, who also received two recommended strains, in presence and absence of mineral N in Leonard jars. In the second step, the best 13 isolates from the stage in Leonard jars, were inoculated in the same cultivar cultivated in pots with soil, as well as recommended strains, and the presence and absence of mineral N. The ability of native rhizobia to invade roots varied among cultivars of the same variety of cowpea. The diversity of species of rhizobia was influenced by different agricultural management. The native rhizobia showed high capacity to fix atmospheric nitrogen and were able to promote the development of the cowpea plant equivalent to that received fertilization with mineral N or inoculation with recommended strains.

## INTRODUÇÃO GERAL

O feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), também conhecido como feijão de arranca ou caupi (cowpea), é uma cultura amplamente distribuída no mundo. Provavelmente tem sua origem no continente africano e foi introduzida no Brasil através dos colonizadores portugueses. No Brasil, seu cultivo é concentrado principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde quase toda a produção vem do regime de sequeiro (EMPARN, 2003), sendo uma importante fonte de proteína para a população, especialmente de baixa renda, pois possui elevado valor nutritivo. É uma cultura rústica, pouco exigente em fertilidade de solos, tolerante a altas temperaturas, à seca e à salinidade, além de se beneficiar da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) quando em associação com bactérias conhecidas como rizóbio (MARTINS, 1996).

Historicamente, o caupi apresenta baixa produtividade, devido às condições de cultivos sem adoção de tecnologias avançadas. Em condições experimentais e lavouras melhor tecnificadas, a cultura tem apresentado alto potencial produtivo, que em geral não tem sido explorado. As baixas produtividades nacionais ( $400 \text{ Kg ha}^{-1}$ ) estão muito abaixo do potencial da cultura, que pode chegar a 6 t/ha (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

O nutriente nitrogênio é considerado um dos principais fatores limitantes da produção agrícola e, nos países em desenvolvimento, representa mais que 70% dos custos dos fertilizantes (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Mesmo havendo uma reserva quase ilimitada de nitrogênio na atmosfera, este se encontra numa forma indisponível às plantas. Os adubos nitrogenados, além de onerosos, podem oferecer riscos ao meio ambiente, uma vez que excessivas quantidades de nitrato podem contaminar as águas subterrâneas, com efeitos sobre a saúde humana. Existe também a possibilidade de ocorrer a desnitrificação deste nitrato por bactérias específicas, causando o desprendimento de óxido nitroso, que terá uma influência negativa na camada de ozônio (VIEIRA, 2005).

A simbiose legumínoza-rizóbio é uma das alternativas mais promissoras para a agricultura de baixos insumos nas regiões tropicais e subtropicais. A fixação eficiente depende de diversos fatores, como temperatura, umidade, características químicas e físicas do solo, os quais influenciam tanto a planta

como a bactéria. Outro fator de reconhecida interferência no processo é a compatibilidade entre a planta hospedeira e o rizóbio (JACKSON *et al.* 2002) que, independente das condições do ambiente, permitirá ou não que o processo se estabeleça de maneira que ambos os organismos sejam favorecidos.

Além da capacidade de fixar nitrogênio, contribuindo para o balanço desse nutriente nos ecossistemas, alguns isolados de rizóbio são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis, disponibilizando o fósforo para as plantas e para si mesmos (CHABOT *et al.*, 1998) promovendo, inclusive, ganho no crescimento de culturas não leguminosas como a cevada (PEIX *et al.*, 2001).

A partir dos 25 dias da germinação, a necessidade do caupi em nitrogênio é suprida pela fixação do nitrogênio atmosférico, estendendo-se até a floração (VASCONCELOS *et al.*, 1976; STAMFORD & NEPTUNE, 1979). Essa leguminosa apresenta alta capacidade de nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio na presença de população adequada de rizóbios no solo, sendo que a quantidade de nitrogênio fixada pode variar entre 73 a 240 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (RUMJANEK, 2005). Essa quantidade fixada simbioticamente, somada à que o caupi retira do solo, seria suficiente para atender às necessidades da planta, que são de aproximadamente 100 kg ha<sup>-1</sup> (BARRETO & DYNIA, 1988).

Espécies de leguminosas tropicais, normalmente são capazes de nodular com uma ampla faixa de rizóbios, contribuindo, desta forma, para a FBN nessas regiões. Por outro lado, a introdução de inoculantes contendo rizóbios eficientes é dificultada, pois as espécies nativas são mais competitivas (SANTOS, 2003).

A produtividade do feijão caupi pode ser aumentada pelo uso de inoculantes de rizóbios eficientes, que poderiam suprir as necessidades de nitrogênio da planta contribuindo para elevar a produtividade da cultura em até 50% em algumas áreas produtoras (ZILLI, 2004). Em caupi com rizóbio efetivo foi demonstrado que a fixação biológica pode suprir todo o nitrogênio para a produção satisfatória (STAMFORD *et al.*, 2003).

Para o Brasil, a importância econômica da pesquisa sobre a FBN pode ser exemplificada pelos resultados obtidos com a soja, que devido ao melhoramento vegetal e seleção de rizóbios adaptados, chega a dispensar qualquer adubo nitrogenado e, com isto, retorna anualmente ao sistema solo-

planta um montante de nitrogênio equivalente a três bilhões de dólares (HUNGRIA & CAMPO, 2005). A estimativa da contribuição da FBN em feijão-caupi está na ordem de US\$ 13 milhões, somente para a região Nordeste brasileira (RUMJANEK, 2005).

Estirpes eficientes já foram selecionadas para cerca de 100 espécies por várias instituições de pesquisa brasileira, no entanto, do total de cerca de 26 milhões de doses de inoculantes comercializados em 2003 (produzidos no Brasil e importados), 99% são para a cultura da soja e apenas 1% para as outras espécies, especialmente para o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Portanto, é imprescindível a difusão desta biotecnologia de baixíssimo custo para as outras culturas de leguminosas, especialmente para aquelas cultivadas na agricultura de subsistência, como o feijão caupi (FREIRE FILHO, 1999).

Muitas vezes a inoculação das lavouras de caupi com estirpes de rizóbio selecionadas não apresenta contribuição significativa para o acúmulo de nitrogênio. A simbiose caupi/rizóbio é de baixa especificidade. Em solos de regiões tropicais tem sido observada a presença de elevada quantidade de *Bradyrhizobium* sp., adaptadas às condições edafoclimáticas do local, que normalmente são bastante competitivas na formação de nódulos, porém muito variáveis quanto à eficiência simbiótica (NEVES & RUMJANEK, 1997; ZILLI, 2004). Estas estirpes acabam impedindo a formação de nódulos pela estirpe inoculante. Neste contexto, estudos de seleção de inoculantes que privilegiem testes com rizóbios nativos ou naturalizados no local de seleção têm sido considerados capazes de apresentar melhores resultados, à medida que estirpes já estabelecidas no solo, normalmente são mais competitivas que estirpes introduzidas de outros locais (THIES *et al.*, 1991).

No estado do Ceará, foram realizados experimentos testando estirpes selecionadas de rizóbios e doses variando entre 20 e 40 kg ha<sup>-1</sup> de adubações nitrogenadas, além de ausência de inoculação e ausência de nitrogênio mineral. Os resultados demonstraram a ocorrência de uma população rizobiana autóctone muito eficiente com relação à fixação de nitrogênio em caupi (VASCONCELOS *et al.*, 1976, 1977, 1978), levando os autores a considerar que, nas regiões estudadas torna-se desnecessária tanto a adubação nitrogenada quanto a inoculação.

Em outros trabalhos conduzidos no mesmo estado foram observadas respostas ao nitrogênio (PAIVA, 1973; CRISÓSTOMO *et al.*, 1977), onde os aumentos médios de produtividade com aplicação desse nutriente são pequenos em relação às doses usadas. A prática da inoculação das sementes com estirpes selecionadas de rizóbios, nas situações em que se espera resposta do caupi ao nitrogênio, deve ser estimulada e também pesquisada com maior intensidade, devido ao baixo custo e facilidade de uso que apresenta (BARRETO & DYNIA, 1988).

É a combinação de vários fatores bióticos e abióticos que vai determinar o sucesso da inoculação. Através do conhecimento da biodiversidade presente nos diferentes sistemas agroecológicos e das características do organismo a ser introduzido, podemos melhorar a adaptabilidade e capacidade competitiva do rizóbio, fatores determinantes do sucesso da prática da inoculação (STRALIOTTO, 1999).

Segundo ODUM (1988), dois componentes podem avaliar a diversidade das espécies: a riqueza das espécies, baseada no número total de espécies presentes e a equitabilidade ou uniformidade, baseada na abundância relativa de espécies e no grau de dominância. Os índices de SIMPSON (1949), MARGALEF (1958) e SHANNON & WIENER (1949) são alguns dos mais utilizados.

Esses índices são grandes ferramentas, permitindo uma avaliação da dinâmica populacional frente a diferentes manejos, através de análise da abundância relativa das espécies, dominância e riqueza, sendo importantes para o estudo do comportamento da diversidade de comunidades microbianas.

Portanto, é importante a promoção de inovações tecnológicas com potencial para incrementar a produção de grãos visando à melhoria da renda dos produtores rurais, principalmente aqueles que têm como base a exploração agrícola familiar.

O objetivo deste trabalho é caracterizar a diversidade de rizóbios nativos da região do Agreste da Paraíba e selecionar estirpes de rizóbios para feijão Caupi com maior eficiência para fixação biológica de nitrogênio.

## REFERÊNCIAS

BARRETO, P.D. & DYNIA, J.F. Sistema de produção de caupi em monocultura no trópico semi-árido brasileiro. In: ARAÚJO, J.P.P. de; WATT, E.E. (Org.). O caupi no Brasil. Brasília : IITA/Embrapa, 386-404, 1988.

CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C.J.; KLOPPER, J.W.; AUTON, H. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1615-1618, 1998.

CRISÓSTOMO, L.A.; ALVES, J.F.; PAIVA, J.B.; OLIVEIRA, F.J. Efeitos da adubação nitrogenada e fosfatada sobre a produção de grãos de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: CEARÁ. Universidade Federal. Centro de Ciências Agrárias. Relatório de pesquisa 1976.; Programa de pesquisa com a cultura do feijoeiro. Fortaleza, 32-43, 1977.

EMPARN - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte. Feijão Vigna.2003 <http://www.emparn.rn.gov.br/Arquivos/Agricultura/FeijaoVigna.Htm>.  
Pesquisado em 20/11/2008.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, C.A.F. Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) na região do Nordeste. In: QUEIRÓZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina- PE: Embrapa Semi-Árido, Brasília: Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia, nov. 1999. Disponível em <http://www.cpatsa.embrapa.br>.

FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília. Embrapa. Informação Tecnológica. 2005.

HUNGRIA, M. & CAMPO, R.J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO. Anais. Recife, 2005. 1 CD-ROM.

JACKSON, K.; SAMPAIO, E.V.S.B.; ANDRADE, L.A.; TIESSEN, H. Capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico em variedades de feijoeiro. In: SILVEIRA, L.; PETERSEN, P.; SABOURIN, E. Agricultura familiar e agroecologia no semi-árido: avanços a partir do agreste da Paraíba. Rio de Janeiro: AS-PTA, 288-288, 2002.

MARGALEF, R. Temporal succession. In: POUZZA, T. & TRAVERS, M. (eds). Perspective in marine biology. Berkeley. University of California. 323-347, 1958

MARTINS, L.M.V. Características ecológicas e fisiológicas de Caupi (*Vigna unguiculata*) isoladas a partir de solos da região Nordeste do Brasil. Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 214p,1996. Tese de Mestrado.

MOREIRA F.M.S. & SIQUEIRA J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Ed :Lavras, 449-542, 2006.

NEVES, M.C.P & RUMJANEK, N.G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. Soil Biology and Biochemistry, V.29 (5/6): 889-895, 1997.

ODUM, E. Ecologia. Ed. Guanabara Koogan, 1988.

PAIVA, J. B. Adubação nitrogenada em feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Visando a produção de vagem madura. In: CEARÁ. Universidade Federal. Centro de Ciências Agrárias. Relatório de pesquisa 1973. Fortaleza, 28-31, 1973.

PEIX, A.; RIVAS-BOYERO, A.A.; MATEOS, P.F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C., MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth hamper conditions. Soil Biology and Biochemistry, V.33, 103-110, 2001.

RUMJANEK, N.G. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa, 279-335, 2005.

SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; FREITAS, A.D.S.; NEVES, C.P.; RUNJANEK, N.G.; SOUTO, S.M. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região nordeste do Brasil, na fixação do N<sub>2</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea*) *Acta Scientiarum* V. 27, 305-312, 2003.

SHANNON, C.E. & WIENER, W. The mathematical theory of communication. Urbana: University Illinois Press, 1949.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. *Nature* 163., 688 p, 1949.

STAMFORD, N.P.; FREITAS, A.D.; FERRAZ, D.S.; MONTENEGRO, A.; SANTOS, C.E.R.S. Nitrogen fixation and growth of cowpea and vamb bean in a sodic soil as affected by gypsum and S inoculation. *Tropical Grasslands*, v. 37, 11-19, 2003.

STAMFORD, N.P. & NEPTUNE, A.M.L. Especificidade hospedeira e competição entre estirpes de *Rhizobium* em inoculação cruzada com quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Cad. Ômega, Recife*, v.3, n.1/2, 25-34, 1979.

STRALIOTTO, R. & RUNJANEK, N.G. Aplicação e evolução dos métodos moleculares para estudo da biodiversidade do rizóbio. EMBRAPA. Doc. 93. 1999.

THIES, J.E.; BOHLOOL, B.B.; SINGLETON, P.W. Subgroups of the *Cowpea miscellany*: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea* and *Macroptilum*

*atropurpureum* Applied Environmental Microbiology, Washington, D.C. American Society for Microbiology, v.57, n.5, 1540-1545, 1991.

VASCONCELOS, J.I.; PAIVA, J.B.; CRISÓSTOMO, L.A.; OLIVEIRA, F.J. Confronto entre a inoculação artificial de rizóbios e a adubação nitrogenada em feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., em duas micro-regiões homogêneas do Estado do Ceará. Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 6, n. 1/2, 105-108, 1976.

VASCONCELOS, J.I.; PAIVA, J.B.; HOLANDA, F.J.M.; SOBRAL, C.A.; Efeito da interação rizóbio-adubação nitrogenada em feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Em um podzol arenoso do Ceará. In: CEARÁ. Universidade Federal. Centro de Ciências Agrárias. Relatório de pesquisa 1975; Programa agropecuário com experimentação e tecnologia. Fortaleza,, 86-93, 1977.

VASCONCELOS, J.I.; PAIVA, J.B.; ALVES, J.F.; OLIVEIRA, F.J. de; LANDIM, C.M.U.; OLIVEIRA, V.L. Influência da inoculação artificial de rizóbios e do sulfato de amônio na produção de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., nas micro-regiões homogêneas do Baixo Jaguaribe e da Serra do Baturité, Ceará. In: CEARÁ. Universidade Federal. Centro de Ciências Agrárias. Relatório de Pesquisa 1977; programa de pesquisa com a cultura do feijoeiro. Fortaleza, 37-48, 1978.

VIEIRA, R.F.; TANAKA, R.T.; TSAI, S.M.; PÉREZ, D.V.; SILVA, C.M.M. de S. Disponibilidade de nutrientes no solo, qualidade de grãos e produtividade da soja em solo adubado com lodo de esgoto. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.40, 919-926, 2005.

ZILLI, J.E.; VALISHESKI, R.R.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v.35, 281-287, 2004.

## CAPÍTULO I

### DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS NATIVOS DO AGRESTE DA PARAÍBA CAPAZES DE NODULAR O CAUPI

#### RESUMO

A diversidade das bactérias afeta os agrossistemas através de uma ampla gama de funções e tem sido citada como o indicador para avaliar a sustentabilidade de um ecossistema. Ações antrópicas podem afetar as comunidades desses microrganismos, transformando ecossistemas naturais diversificados em ambientes uniformes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar a diversidade de rizóbios isolados de nódulos de caupi cultivado em solos sob diferentes tipos de uso no Agreste da Paraíba. Quatro cultivares de feijão caupi foram plantadas em solos de caatinga, pasto, mandioca e feijão. Os nódulos obtidos foram isolados e caracterizados morfofisiologicamente para construção de um dendograma de similaridade e cálculo de índices de diversidade. Foram obtidos nove grupos de rizóbios. A maior diversidade foi observada na área de pasto, assim como a riqueza e o equilíbrio, enquanto a área de caatinga apresentou a menor diversidade. Houve diferença para o índice de diversidade de rizóbio para cada cultivar, onde a sedinha demonstrou uma menor capacidade de nodular com diferentes isolados de rizóbio. Na área de caatinga a cultivar Corujinha obteve nodulação com um grupo restrito de isolados de rizóbio, já na cultivar Sedinha não houve nodulação com rizóbios desta área. No pasto, a diversidade de isolados de rizóbio capazes de nodular as cultivares Corujinha, Sempre Verde e Azul foram semelhantes, não havendo dominância de isolados entre as quatro cultivares. Na área de mandioca houve uma maior diversidade de rizóbios provenientes das cultivares Corujinha e Azul, tendo uma dominância de isolados de rizóbios associados a cultivar Sempre Verde. A cultivar Sedinha apresentou baixa diversidade de isolados nas áreas de mata, pasto e mandioca, os isolados desta cultivar foram específicos de área de feijão.

## CHAPTER I

### DIVERSITY OF NATIVE RHIZOBIA FROM AGRESTE REGION OF PARAÍBA THAT NODULATE COWPEA

#### ABSTRACT

The diversity of bacteria affects ecosystems through a wide range of functions and has been cited as an indicator to assess the sustainability of an ecosystem. Human actions can affect the communities of microorganisms transforming natural and diverse ecosystems into uniform environments. The objective of this study was to characterize and evaluate the diversity of rhizobia isolated from soils under different types of uses in the Agreste of Paraíba. Four cultivars of cowpea were planted in soils of caatinga, pasture, cassava and beans. The nodules were isolated and characterized morphophysiological to construct a dendrogram of similarity and calculation of diversity indices. Were obtained nine groups of rhizobia. The highest diversity was observed in the pasture, as well as the richness and equitability, while the area of caatinga had the lowest diversity. There was a difference for the index of diversity of rhizobia for each cultivar, Sedinha showed a lower capacity nodular with different rhizobia. In the area of caatinga, Corujinha obtained nodulation with a small group of strains of rhizobia, cultivar Sedinha no nodulated with rhizobia in this area. The diversity of rhizobia on pasture from the cultivars capable of nodular Corujinha, where Sempre Verde and Azul were similar, with no dominance of isolates among the four cultivars. In the area of cassava was a greater diversity of rhizobia from the cultivars Corujinha and Azul, with a dominance of strains of rhizobia associated with cultivar Sempre Verde. Cultivar Sedinha showed low diversity of isolates on areas of caatinga, pasture and cassava, the isolates from this cultivar were specific for beans area.

## INTRODUÇÃO

A diversidade das bactérias, entre estas os rizóbios, afeta os agrossistemas através de uma ampla gama de funções, distribuídas ao longo de grande número de diferentes grupos tróficos. As características culturais e morfológicas do rizóbio fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento (PELCZAR *et al.*, 1997).

A necessidade de suprimento de nitrogênio fixado é muito importante para a sustentabilidade dos agrossistemas, pois no seu ciclo, o nitrogênio pode sofrer vários processos de perdas como lixiviação, imobilização e desnitrificação, e pode poluir o ambiente (FRANCO & BALIEIRO, 2000).

Quando ocorre uma pressão ambiental rigorosa ou um estresse, num ambiente com alta diversidade, a chance de algumas espécies continuarem existindo e promoverem a resistência ou o retorno ao estado de estabilidade inicial ou próximo do mesmo, é muito maior do que em um ambiente com pouca diversidade (ODUM, 1988). A retirada da vegetação nativa para implantação de monoculturas, mesmo quando essa é uma leguminosa, causa grande impacto na comunidade de rizóbios nativos, pois as leguminosas selecionam alguns tipos de rizóbios, em detrimento de outros. A monocultura provoca perdas na diversidade microbiana do solo, convertendo ecossistemas naturais diversificados em ambientes uniformes.

A dominância de rizóbios nativos em solos brasileiros não cultivados reflete sua abundância em solos tropicais e sugere a importância destes microrganismos para desenvolver os diferentes ecossistemas (OLIVEIRA, 1999; SILVA, 1999).

O conceito de diversidade de espécie pode ser avaliado por meio de dois componentes: (1) riqueza das espécies, baseada no número total de espécies presentes e, (2) equitabilidade ou uniformidade, baseada na abundância relativa de espécies e no grau de dominância (ODUM, 1988). Vários índices têm sido propostos, tais como os de SIMPSON (1949), MARGALEF (1958) e SHANNON & WIENER (1949). Esses índices são ferramentas poderosas para o estudo do comportamento da diversidade de comunidades microbianas, permitindo uma avaliação da dinâmica populacional frente a diferentes manejos.

O Índice de Shannon-Wiener (H) leva em consideração a diversidade das espécies e sua abundância relativa. O valor máximo de H ocorre quando o mesmo número de indivíduos ocorre para cada espécie e é definido em termos de abundância de espécies. Quanto maior a abundância relativa maior será a diversidade das espécies.

O Índice de Simpson (C) é um índice de dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Varia de 0 a 1 e quanto mais alto for, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade.

O Índice de Jackknife ( $E_D$ ) avalia a riqueza das espécies. Quanto maior a riqueza das espécies, maior será a diversidade das espécies (MAGURRAN, 1988).

A aplicação de índices apresenta vantagem, uma vez que a simples contagem das espécies pode incluir espécies raras e levar a conclusões errôneas. Entretanto, os dados dos índices podem ser interpretados de formas diferentes ou confundidos, dependendo do cálculo usado.

É possível encontrar duas comunidades que possuam índices de diversidades semelhantes, entretanto uma ter valor de uniformidade alto e baixo valor de riqueza, enquanto a outra possuir uniformidade baixa e riqueza alta. Uniformidade e riqueza precisam ser consideradas na avaliação da diversidade (KENNEDY, 1999). Os índices que combinam riqueza de espécie e abundância relativa são os mais utilizados.

Neste sentido, a diversidade tem sido citada como um indicador adequado para avaliar a qualidade do solo e a sustentabilidade de um ecossistema (ZAK *et al.*, 1994; BOEHM *et al.*, 1993; STADDON *et al.*, 1997; OVREAS & TORSVIK, 1998).

A interpretação dos índices de diversidade deve ser feita relacionando-se estes valores com as diferentes alterações sofridas recentemente pelo ecossistema. A implantação de agrossistemas convencionais, com aplicação de biocidas e o uso de mecanização entre outros manejos, pode reduzir drasticamente a população total de organismos do solo. Entretanto, algumas espécies resilientes podem ter sua redundância até aumentada. As interações que ocorrem nos agrossistemas devem ser cuidadosamente avaliadas para

que se possa determinar os elementos estabilizantes e desestabilizantes e planejar sistemas harmônicos. Estes índices têm sido utilizados por serem relativamente simples e permitirem comparações de amostras com diferentes tamanhos de populações (ODUM, 1988; MAGURRAN, 1988).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar a diversidade de rizóbios capazes de nodular o caupinativos de solos do Agrete da Paraíba sob diferentes tipos de uso.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta dos solos e variedades utilizadas**

Foram coletadas amostras da camada arável (0 a 20 cm) de solos de três municípios do Agreste paraibano (Solânea, Esperança e Lagoa Seca), com diferentes tipos de uso: 1) caatinga; 2) pasto; 3) roçado de feijão e 4) roçado de mandioca. Como plantas iscas foram utilizadas as variedades de Caupi Sempre-Verde, Sedinha, Corujinha e Azul e três repetições de cada combinação dos solos x variedades.

### **Cultivo e obtenção dos nódulos**

Após a coleta, os solos foram secos ao ar, destorroados e peneirados em peneira de 2mm para obtenção da TFSA (Terra Fina Seca ao Ar). Em casa de vegetação, vasos foram preenchidos com 1 kg cada de um mesmo solo e cultivados com uma variedade de caupi como planta isca, visando à obtenção de nódulos para posterior isolamento de rizóbios. As sementes foram desinfestadas com álcool etílico a 70% por 30 segundos e, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, posteriormente foram feitas 10 lavagens com água destilada para retirar o excesso, deixando de molho em água potável autoclavada durante 12h antes do plantio. Cada vaso recebeu quatro sementes de uma mesma cultivar e uma semana após a germinação foi feito o desbaste deixando duas plantas por vaso. Após 45 dias de cultivo, as plantas foram coletadas, sendo a parte aérea separada das raízes, os maiores nódulos retirados das mesmas e colocados em tubos de ensaio com sílica gel para posterior isolamento dos rizóbios.

### **Isolamento de rizóbios**

Os nódulos coletados foram reidratados, tratados com uma solução de álcool etílico a 70% por 1 minuto, para quebrar a tensão superficial, e com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% por 2 minutos, para desinfestá-los superficialmente sendo em seguida, lavados por 10 vezes com água estéril

para retirar o excesso de hipoclorito. Após esse tratamento, o nódulo foi levemente pressionado com uma pinça sobre uma placa de Petri contendo meio YMA (extrato de levedura, manitol e ágar) e corante vermelho do congo. As placas foram levadas para estufa bacteriológica regulada a 28°C até o aparecimento das colônias. O vermelho do congo é um corante com propriedades fungicidas e foi usado para facilitar a diferenciação entre rizóbio e contaminantes. O rizóbio neste meio é incapaz de absorver o corante, aparecendo com uma coloração rosada difusa. Após purificação, as colônias que se apresentaram isentas de contaminantes foram repicadas com uma alça de platina para placas de Petri contendo meio YMA (extrato de levedura, manitol e ágar) com corante azul de bromotimol e caracterizadas conforme descrito por FRED & WAKSMAN (1928). As placas foram incubadas a 28°C, por uma a duas semanas, até o aparecimento e desenvolvimento das colônias.

#### **Caracterização morfofisiológica dos rizóbios isolados**

A caracterização dos isolados foi adaptada de VICENT (1970), sendo observado em cada um dos isolados características das colônias: 1) tempo necessário em dias para o aparecimento de uma colônia; 2) pH do meio após o crescimento celular (determinado pela coloração do meio de cultura contendo azul de bromotimol, os isolados acidificantes tornam o meio amarelo e os alcalinizantes tornam o meio verde azulado e os neutros não modificam a coloração do meio de cultura.); 3) tamanho da colônia em mm; 4) forma (circular ou irregular da colônia); 5) borda da colônia (lisa ou irregular); 6) aparência da colônia (homogênea ou heterogênea); 7) transparência da colônia; 8) cor da colônia (branca, amarela, creme, rósea); 9) elevação da colônia) e características do muco produzido pelas células (10) quantidade de muco (pouco, médio e muito); 11) faixa de alça (observada pela faixa formada pela alça de platina no muco; 12) elasticidade (observada a partir da formação ou não de fio, no momento da remoção do muco do meio de cultura com o auxílio da alça de platina). Após a caracterização, as colônias isoladas foram purificadas, repicadas em tubos de ensaio contendo meio YMA e devidamente identificadas. Após o aparecimento de abundante massa celular, adicionou-se

vaselina líquida esterilizada, visando à formação de uma barreira que impede o fluxo de oxigênio para as culturas armazenadas.

### Codificação

Após a caracterização morfofisiológica, os dados foram codificados em um sistema binário (Tabela 1).

**Tabela 1:** Codificação das características morfofisiológicas dos isolados de rizóbio obtidos em solos sob quatro coberturas vegetais em três municípios da Paraíba.

Característica	Codificação Binária	
	0	1
Tempo (em dias)	1	2
pH	Ácido	Neutro ou alcalino
Tamanho	Puntiforme, de 1 a 2 mm	> 3 mm
Forma	Circular	Irregular
Borda	Regular	Irregular
Aparência da colônia	Homogênea	Heterogênea
Transparência	Opaco	Transparente
Cor	Branca	Amarela
Elevação	Sem elevação	Com elevação
Quantidade de muco	Pouca	Média e muita
Faixa de alça	Quando retorna	Quando permanece limpa
Elasticidade	Sem elasticidade	Com elasticidade

### Agrupamento

A partir da codificação da caracterização morfofisiológica, agruparam-se os isolados através do programa NtsysPC, utilizando o algoritmo UPGMA e a matriz de similaridade Jaccard. Uma vez construída a matriz, foi feito um

dendrograma com a finalidade de separar os grupos de isolados com maiores similaridades (ROHLF, 1994).

Após a formação dos grupos similares foram calculados os índices de diversidade dos isolados utilizando o software DivEs v2.0 (RODRIGUES, 2007).

#### **Avaliação da diversidade de isolados**

A diversidade de isolados foi avaliada através do Índice de Shannon-Wiener (H), definido por:

$$H = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} p_i \log_e p_i$$

Onde:  $p_i$  é a proporção de indivíduos do  $i^{\text{ésimo}}$  isolado em relação ao total de indivíduos, e S é o número total de isolados.

O valor máximo de H ocorre quando o mesmo número de indivíduos ocorre para cada isolado e é definido em termos de abundância de isolados.

$$H = \log_e N - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{\infty} (p_i \log_e p_i) n_i$$

Onde: N é o número total de indivíduos de todos os isolados, e  $n_i$  é o número de indivíduos do isolado i.

#### **Avaliação da dominância de isolados**

A dominância foi avaliada através do Índice de Simpson (C), calculado como:

$$C = 1 - \frac{\sum n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Onde:  $n_i$  é o número de indivíduos de cada isolado, e N é o número total de indivíduos.

### **Avaliação da equitabilidade de isolados**

A avaliação da equitabilidade se deu através do Índice de Hill (E), dado pela fórmula:

$$E = \frac{\left( \frac{1}{D_s} - 1 \right)}{e^H - 1}$$

Onde:  $D_s$  é o índice de diversidade de Simpson, H é o índice de diversidade de Shannon-Wiener, e é igual a 2,718282.

### **Avaliação da riqueza de isolados**

Calculada pelo Índice de Jackknife 1º Ordem ( $E_D$ ), através da fórmula:

$$E_D = S_{obs} + S_1 \left( \frac{f-1}{f} \right)$$

Onde:  $S_{obs}$  é o número de isolados observados;  $S_1$  é o número de isolados que estão presentes em somente um agrupamento (isolados de um agrupamento) e f é o número de agrupamentos que contém o <sup>iésimo</sup> isolado de um agrupamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bteve-se uma coleção de rizóbios com 52 isolados, a partir dos nódulos radiculares oriundos das diversas variedades de feijão caupi cultivados nos solos com diferentes tipos de uso (Tabela 2).

**Tabela 2:** Identificação da origem dos isolados segundo o solo e a variedade.

<i>N° de Ordem</i>	<i>Solo</i>	<i>Variedade</i>	<i>Isolado</i>
1.	Roçado de Feijão	Corujinha	S1CV1 (A)
2.	Roçado de Feijão	Corujinha	S1CV1 (B)
3.	Roçado de Feijão	Sempre Verde	S1CV2 (A)
4.	Roçado de Feijão	Sempre Verde	S1CV2 (B)
5.	Roçado de Feijão	Sempre Verde	S1CV2 (C)
6.	Roçado de Feijão	Sempre Verde	S1CV2 (D)
7.	Roçado de Feijão	Sempre Verde	S1CV2 (E)
8.	Roçado de Feijão	Sempre Verde	S1CV2 (F)
9.	Roçado de Feijão	Sempre Verde	S1CV2 (G)
10.	Roçado de Feijão	Sempre Verde	S1CV2 (H)
11.	Roçado de Feijão	Sedinha	S1CV3 (A)
12.	Roçado de Feijão	Sedinha	S1CV3 (B)
13.	Roçado de Feijão	Sedinha	S1CV3 (C)
14.	Roçado de Feijão	Azul	S1CV4 (A)
15.	Roçado de Feijão	Azul	S1CV4 (B)
16.	Roçado de Feijão	Azul	S1CV4 (C)
17.	Roçado de Feijão	Azul	S1CV4 (D)
18.	Caatinga	Corujinha	S2CV1 (A)
19.	Caatinga	Corujinha	S2CV1 (B)
20.	Caatinga	Corujinha	S2CV1 (C)
21.	Caatinga	Sempre Verde	S2CV2 (A)
22.	Caatinga	Sempre Verde	S2CV2 (B)
23.	Caatinga	Sempre Verde	S2CV2 (C)
24.	Caatinga	Azul	S2CV4 (A)

Continua...

---

25.	Caatinga	Azul	S2CV4 (B)
26.	Caatinga	Azul	S2CV4 (C)
27.	RoçadoMandioca	Corujinha	S3CV1 (A)
28.	RoçadoMandioca	Corujinha	S3CV1 (B)
29.	RoçadoMandioca	Corujinha	S3CV1 (C)
30.	RoçadoMandioca	Corujinha	S3CV1 (D)
31.	RoçadoMandioca	Corujinha	S3CV1 (E)
32.	RoçadoMandioca	Sempre Verde	S3CV2 (A)
33.	RoçadoMandioca	Sempre Verde	S3CV2 (B)
34.	RoçadoMandioca	Sempre Verde	S3CV2 (C)
35.	RoçadoMandioca	Sempre Verde	S3CV2 (D)
36.	RoçadoMandioca	Sedinha	S3CV3 (B)
37.	RoçadoMandioca	Azul	S3CV4 (A)
38.	RoçadoMandioca	Azul	S3CV4 (B)
39.	RoçadoMandioca	Azul	S3CV4 (C)
40.	RoçadoMandioca	Azul	S3CV4 (D)
41.	Pasto	Corujinha	S4CV1 (A)
42.	Pasto	Corujinha	S4CV1 (B)
43.	Pasto	Corujinha	S4CV1 (C)
44.	Pasto	Sempre Verde	S4CV2 (A)
45.	Pasto	Sempre Verde	S4CV2 (B)
46.	Pasto	Sempre Verde	S4CV2 (C)
47.	Pasto	Sempre Verde	S4CV2 (D)
48.	Pasto	Sempre Verde	S4CV2 (E)
49.	Pasto	Sedinha	S4CV3 (A)
50.	Pasto	Azul	S4CV4 (A)
51.	Pasto	Azul	S4CV4 (B)
52.	Pasto	Azul	S4CV4 (C)

---

Dentre os isolados obtidos na região do Agreste paraibano, 100% formaram colônia após um dia de repicados, sendo classificados como de crescimento muito rápido em meio de cultura. De acordo com VICENT (1970), as colônias de estirpes ou isolados de rizóbio em meio YMA podem ser

diferenciadas com base no tempo de crescimento em (a) rápidas - aquelas que produzem crescimento moderado a abundante em 3 a 5 dias, e (b) lentas - aquelas que tem pouco crescimento em 5 dias e crescimento moderado em 10 dias.

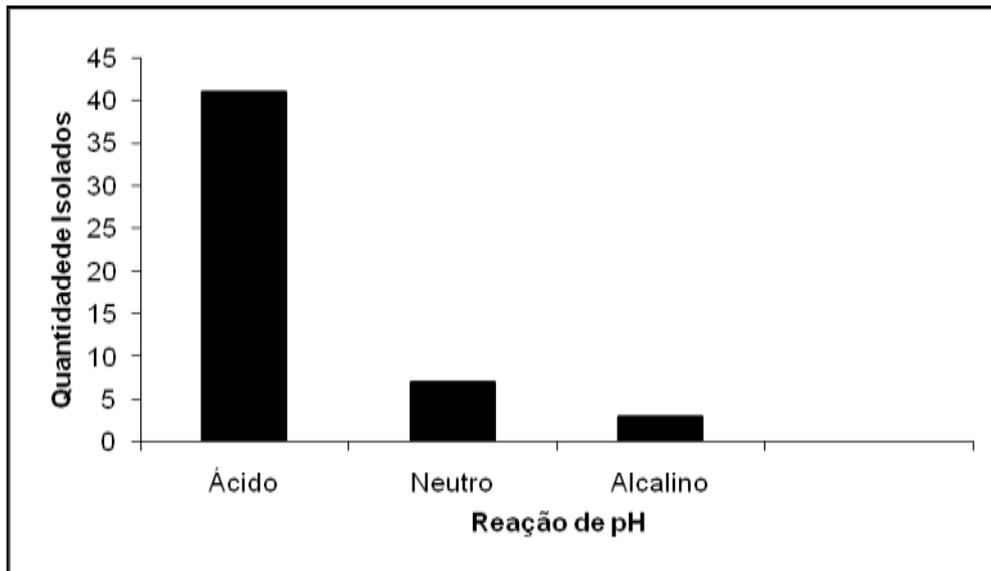
Estes resultados vai de encontro a regra geral de que as bactérias que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) têm sido consideradas rotineiramente como pertencentes ao grupo miscelânea "caupi" ou *Bradyrhizobium* spp., compreendendo um número grande de estirpes de crescimento lento capazes de nodular inúmeras espécies de leguminosas herbáceas comuns nas regiões tropicais (JORDAN, 1984).

MARTINS *et al.* (2001) observaram uma distinção dos isolados quanto às características de crescimento e reação de pH, ou seja, os isolados de rizóbios que apresentaram crescimento rápido acidificaram e alcalinizaram o meio YMA, indicando que o limite das estirpes capazes de nodular o caupi vai além do grupo *Bradyrhizobium* spp.

SPRENT (1994) sugeriu que bactérias de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas, porque a habilidade para fixar N não é a maior prioridade para os rizóbios - sobreviver no solo é muito mais importante. É possível que nesta região a alta incidência de rizóbio de crescimento rápido tenha propiciado uma alta taxa de nódulos formados por estes grupos. Em consenso com a hipótese de SPRENT (1994), BARNET & CATT (1991) em seu trabalho de estudo de característica e distribuição de bactérias isoladas de nódulos de raiz de *Acácia* spp., em diferentes localizações geográficas da Austrália, mostraram que os isolados foram influenciados de forma marcante pela localização geográfica, em que estirpes de crescimento rápido foram obtidas somente nos sítios de zonas áridas. Estes resultados indicam que pode ser esperado um alto grau de rizóbio de crescimento rápido nodulando leguminosas tropicais nativas. Leguminosas nativas australianas tradicionalmente têm sido consideradas semelhantes ao caupi quanto à nodulação por estirpes de *Bradyrhizobium* spp (BOWEN, 1965; LANGE, 1961). Porém, LAWRIE (1983) isolou várias estirpes de crescimento rápido a partir delas, o que já havia sido demonstrado por TRINICK (1980), que, no entanto considerou que estas estirpes de crescimento rápido não pertencem aos grupos clássicos reconhecidos por inoculação cruzada.

NORRIS (1965) desenvolveu um esquema para descrever rizóbio baseado em taxa relativa de crescimento. Ele especulou que estirpes de crescimento rápido, produtoras de ácido (capazes de acidificar o meio), são originárias de regiões temperadas, ao passo que estirpes de crescimento lento e produtoras de base se originam de regiões do Trópico úmido. Este esquema, no entanto, não pode ser usado indiscriminadamente. MARTINS *et al.* (1997) observaram que a maioria de isolados de rizóbio que nodulam caupi são tipicamente de crescimento lento, capazes de alcalinizar o meio e obtidas de região tropical, porém existem várias estirpes de rizóbio de crescimento rápido que são capazes de nodular tanto caupi quanto soja e são obtidas também de região tropical. Porém, esses critérios de lento versus rápido e produção de ácido versus produção de álcali são, em larga extensão, dependentes do meio em que o rizóbio está crescendo. Segundo TAN & BROUGHTON (1981), certas combinações de aminoácidos e açúcares (em geral, glutamina e galactose) promovem uma acidificação do meio após o crescimento de microrganismos de crescimento rápido, ao passo que os microrganismos de crescimento lento alteram o pH do meio para alcalino. Microrganismos de crescimento rápido utilizam mais galactose durante o crescimento, quando comparados com os de crescimento lento, enquanto que ambos os tipos de rizóbio sintetizam e liberam uma ampla faixa de aminoácidos para o meio de cultura. Estes mesmos autores sugerem que mudanças no pH produzidas por rizóbio crescido em meio YMA são causadas pela utilização preferencial de açúcares por organismos de crescimento rápido, e de compostos nitrogenados, pelos de crescimento lento.

Os isolados estudados neste trabalho tiveram comportamentos diferentes em relação ao pH. 42 isolados acidificaram o meio YMA (com azul de bromotimol), 7 foram neutros e 3 alcalinos, mesmo tendo crescimento em um dia (Figura 1). Estes nódulos foram isolados de solos de caatinga com pH 6,5, pasto com pH 6,4, roçado de feijão com pH 7,1 e roçado de mandioca com pH 6,6.



**Figura 1:** Reação de pH de uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de nódulos de feijão caupi cultivado em solos oriundos de quatro tipos de uso, coletados em três municípios do Estado da Paraíba.

Os rizóbios podem ser divididos em três classes quanto à alteração de pH produzida no meio de cultura: estirpes que acidificam o meio, estirpes que alcalinizam o meio, e estirpes que não alteram o pH do meio de cultura. As placas do meio YMA (FRED & WAKSMAN, 1928) recém preparadas com azul de bromotimol, têm um pH em torno de 6,8 e cor verde. Os rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio de cultura, causando uma mudança na cor do indicador para azul, enquanto que os rizóbios de crescimento rápido geralmente acidificam o meio tornando-o amarelo.

Ao contrário do esperado, as estirpes produtoras de ácido não são mais tolerantes à acidez do solo (NORRIS, 1965), mas seu crescimento rápido parece conferir certa vantagem competitiva na rizosfera devido a maior competição com outros microrganismos. O autor sugere ainda que esta vantagem competitiva pode ser explicada pela maior ou menor capacidade das estirpes em sobreviverem num determinado pH e cita como exemplo estirpes isoladas de solos ácidos que são capazes de excretar, em meio de cultura, substâncias que alcalinizam o meio, enquanto que estirpes isoladas de solos alcalinos excretam substâncias que acidificam o meio, o que parece ser um mecanismo de adaptação a condições adversas. Posteriormente, em 1967, esse mesmo autor observou que, se o rizóbio que nodula uma espécie de

leguminosa é normalmente produtor de ácido, essa leguminosa deverá nodular com uma faixa estreita de estirpes e, de modo geral, será dificilmente nodulada em solos ácidos.

HALLIDAY (1978) constatou que a produção de ácido ou base é consequência da fonte de carbono e não uma característica intrínseca do rizóbio, o que sugere que o comportamento seja dependente de atributos do, quantidade e qualidade de nutrientes disponíveis.

NORRIS (1965) sugeriu que *Rhizobium* poderia ser rapidamente diferenciado em estirpes que produzem ácidos e *Bradyrhizobium* produzem bases. PARKER (1971), TAN & BROUGHTON (1982) e PADMANABHAN *et al.* (1990) sugeriram que a preferência por uma fonte particular de carbono (e nitrogênio) é uma particularidade dependente da estirpe. Concluindo, de modo geral os rizóbios preferencialmente metabolizam carboidrato, enquanto os *Bradyrhizobium* utilizam os constituintes extraídos da levedura do meio, acarretando mudanças de pH do meio de cultura observadas por NORRIS (1965).

Contudo, entre os *Bradyrhizobium* existem exceções a esta regra. PADMANABHAN *et al.* (1990) encontraram 7 isolados de *Bradyrhizobium* que, dependendo do carboidrato utilizado, podem abaixar o pH do meio. Dois destes, UMKL22 e UMKL55, apresentaram esta resposta com 5 diferentes carboidratos. Além disso, o aumento do pH observado por estes isolados correlacionou-se negativamente com o pH inicial. Estes dados sugerem que estirpes de *Bradyrhizobium* spp podem, dependendo das fontes de carbono e/ou nitrogênio, regular o pH do ambiente de acordo com os produtos excretados.

Todos os isolados tiveram tamanho puntiforme. As colônias puntiformes apresentam diâmetro inferior a 1,0 mm. Ao passo que colônias com 1,0 mm de diâmetro geralmente são circulares e não coalescem. As que variam de 1,0 até 2,0 mm são circulares, porém alguns grupos com este diâmetro apresentam forma irregular. HERRIDGE & ROUGHLEY (1975) encontraram uma relação entre as características de colônias dos isolados originais e eficiência simbiótica. Todas as sub-estirpes de tamanho puntiforme, colônias secas, foram muito eficientes; colônias de tamanho médio apresentaram níveis médios de eficiência, enquanto que isolados de colônias mucóides e grandes

produziram sub-estirpes que foram de baixa eficiência ou completamente ineficientes.

A forma das colônias isoladas geralmente é dependente do dia de caracterização e da consistência do muco produzido.

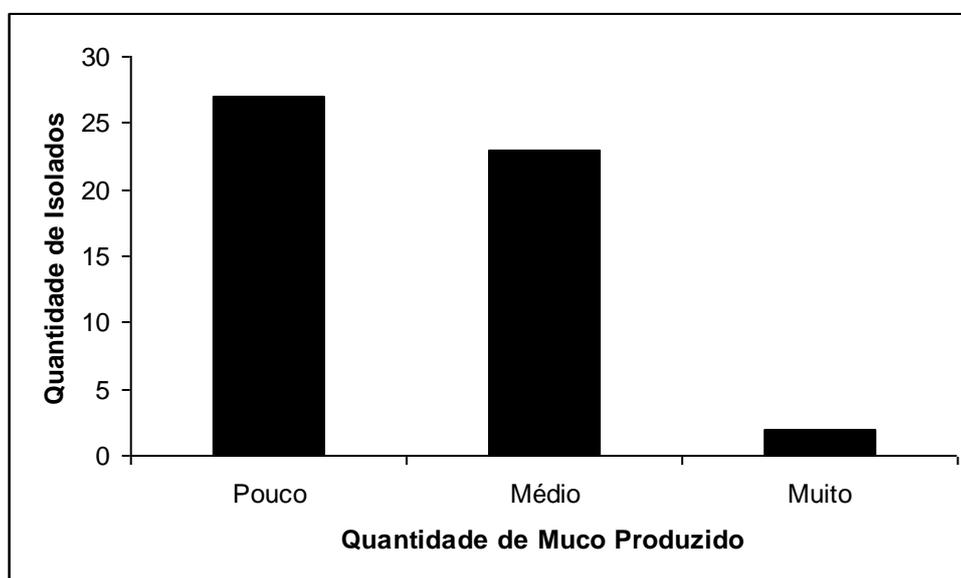
Foi encontrada uma pequena diversidade em relação à consistência do muco produzido pelas colônias isoladas, que se relaciona com as demais características anteriormente discutidas, mas todos os isolados produziram muco com elevação (Tabela 3). De um modo geral, os isolados que não produzem muco são definidos como secos, ou então, produzem grande quantidade de muco.

**Tabela 3:** Características quanto a elevação, muco, limpa e elasticidade de uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de nódulos de feijão caupi cultivado em solos oriundos de quatro tipos de uso, coletados em três municípios do Estado da Paraíba.

	<i>Elevação</i>	<i>Muco</i>	<i>Limpa</i>	<i>Elasticidade</i>
Sim	100 %	100 %	86 %	92 %
Não	0 %	0 %	14 %	8 %

A consistência viscosa foi a de maior ocorrência, com 92% dos isolados apresentando elasticidade (Tabela 3). Essa consistência é assim definida pela característica da colônia de grudar na alça de platina. A viscosidade é uma característica de isolados lentos e rápidos, apresentando variações intrínsecas, como por exemplo, pouca, média e muita elasticidade do muco produzido. Uma boa parte desses isolados gotejaram nas tampas das placas que foram incubadas invertidas. Segundo ARAÚJO (1994) essa frequência de produção de muco se deve à produção de exopolissacarídeos (EPS), polímeros de glicose e outras hexoses que compõem as cápsulas das bactérias. Além da elasticidade, 86% dos isolados apresentaram limpa da placa quando a colônia foi riscada com a alça de platina (Tabela 3).

Neste trabalho, a produção de muco foi analisada visualmente e de forma comparativa com os demais isolados, onde 23 isolados produziram uma quantidade média de muco e 25 produziram pouco muco (Figura 2). CUNNINGHAM & MUNNS (1984) demonstraram que estirpes de *Rizobium phaseoli* produtoras de polissacarídeos extracelulares (EPS), o que está correlacionado com a formação de colônias mucóides, foram mais tolerantes à acidez em meio de cultura mas, segundo estes autores, a produção de EPS deve ser somente uma das muitas possibilidades estratégicas de sobrevivência da bactéria.



**Figura 2:** Quantidade de muco produzido por uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de nódulos de feijão caupi cultivado em solos oriundos de quatro tipos de uso, coletados em três municípios do Estado da Paraíba.

Para MOREIRA (1991) esta característica não é usada na classificação de rizóbio, mas diversos resultados têm mostrado diferenças intrínsecas e ecológicas entre estirpes com colônias mucosas e secas. A forma da colônia está diretamente correlacionada com a presença de muco, o que é muito comum no gênero *Bradyrhizobium* (FURHMAN, 1990). A maioria dos isolados formaram colônias com formato circular (Tabela 4).

**Tabela 4:** Características quanto a cor, forma da borda, transparência e colônia de uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de nódulos de feijão caupi cultivado em solos oriundos de quatro tipos de uso, coletados em três municípios do Agreste da Paraíba.

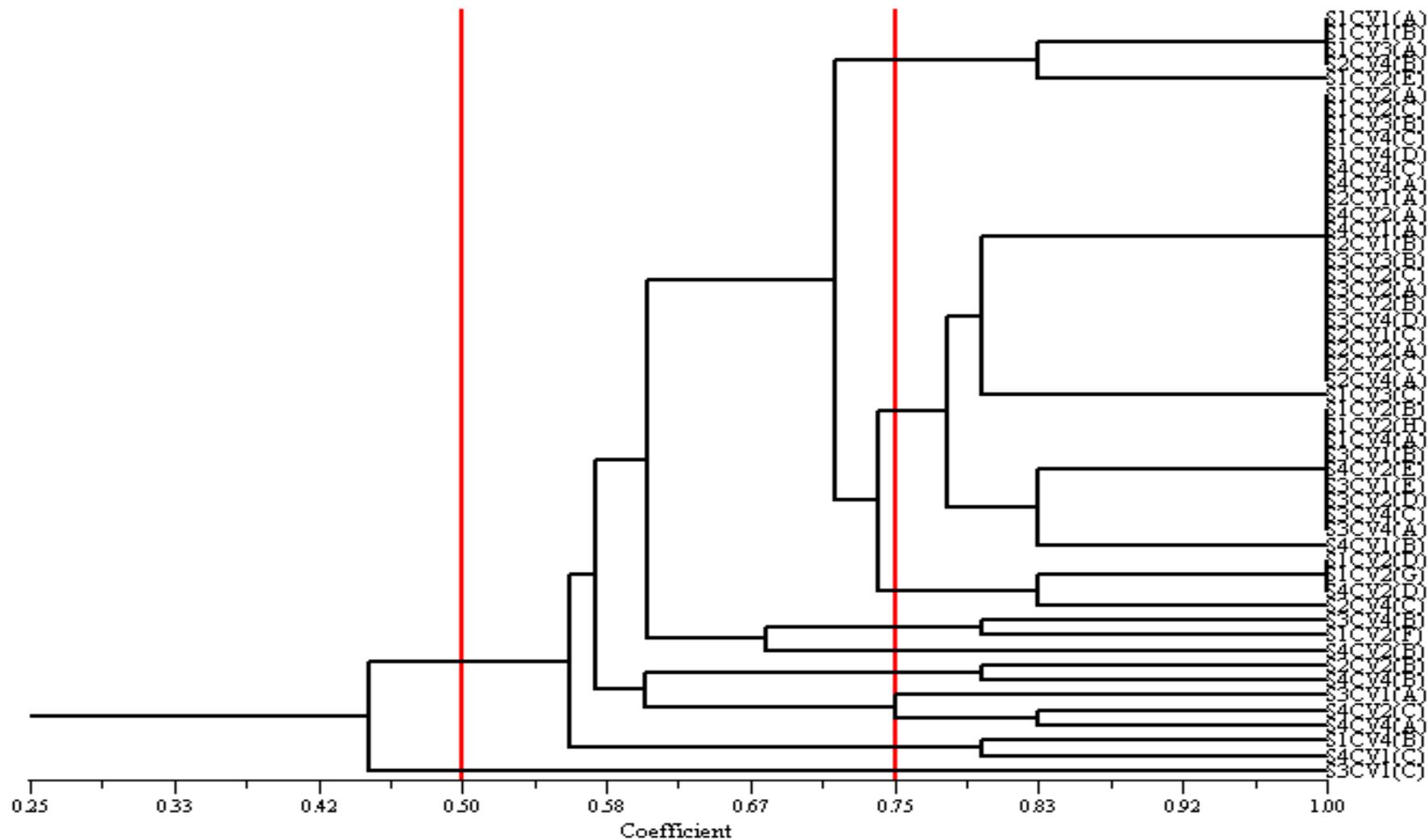
<i>Cor</i>	<i>Borda</i>	<i>Transparência</i>	<i>Colônia</i>
4% branca	92% regular	67% translúcida	94% homogênea
96% creme	8% irregular	33% opaca	6% heterogênea

A transparência é definida pela passagem da luz através da colônia. Os isolados caracterizados neste trabalho variaram de opacos a translúcidos, onde a colônia opaca não permite a passagem da luz e não evidencia o brilho característico das colônias translúcidas caracterizadas por essa passagem de luz através das mesmas. Dos 52 isolados estudados, 17 foram opacos e 35 foram translúcidos (Tabela 4). O muco coalescente ou aquoso está, de modo geral, associado com colônias translúcidas, enquanto que aquelas com o muco compacto e consistente são opacas.

Também foram observados, dentro desse grupo, alguns isolados que apresentaram colônias de cor branco-leitosa, ao contrário da maioria, que apresentou colônia de cor creme (Tabela 4).

Quanto a homogeneidade desses isolados, apenas 3 se comportaram heterogêneos e 49 foram homogêneos (Tabela 4).

De uma maneira geral, os isolados apresentaram-se bastante homogêneos em suas características morfofisiológicas (Anexo 1), o que possibilitou a análise de agrupamento pelo programa NtsysPC e obtenção do dendrograma de similaridade entre os isolados (Figura 3).



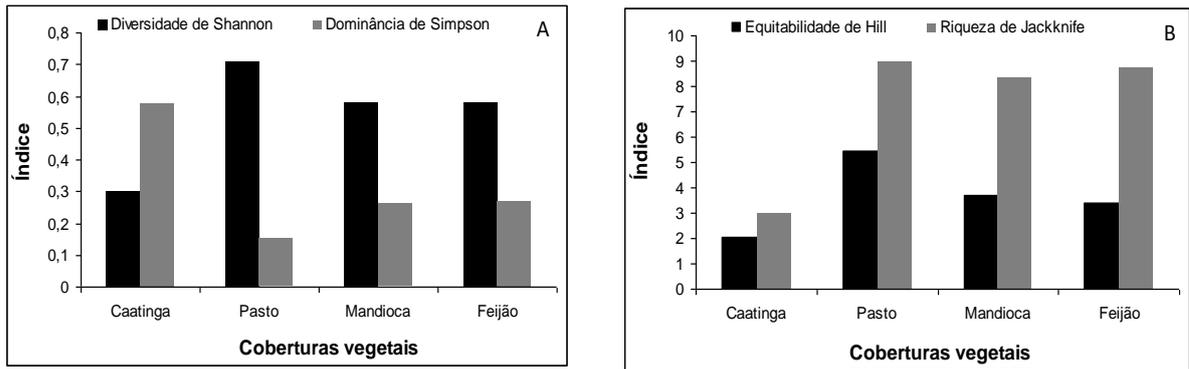
**Figura 5.** Levantamento de cepas fúngicas e agrupamento por algoritmo U-GMA em função de similaridade Jaccard para uma coleção de 52 isolados de rizópodios a partir de rodúlos de feijão-caupi cultivados em solos oriundos de quatro tipos de uso, todos os sítios em três municípios do Estado da Paraíba.

Nove diferentes grupos de isolados com 75% de similaridade (Anexos 2 e 3) foram obtidos a partir do dendrograma, visando o estudo da diversidade da população, da confirmação da capacidade de nodulação e fixação de N atmosférico dos isolados.

A diversidade de grupos morfofisiológicos de rizóbios isolados de nódulos de feijão caupi mostrou comportamento diferente entre as áreas estudadas. A área de pasto apresentou a maior diversidade de isolados de rizóbio, enquanto a área de caatinga apresentou a menor diversidade (Figura 4A). A diversidade de rizóbio, de uma maneira geral, foi influenciada pela cobertura vegetal. Solos sob pastagens normalmente contém teores elevados de matéria orgânica, contribuindo para a manutenção da população e diversidade microbiana. A inserção de árvores e animais contribui para o aumento da fertilidade do solo, acúmulo de matéria orgânica, aumento de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> e as interações da vida no solo (STINNER, 1990).

À medida que a diversidade aumentou, a dominância teve comportamento oposto. Áreas com alta diversidade apresentam elevado número de espécies, fazendo com que não haja predominância de uma espécie sobre outra ou outras. PEREIRA (2000) encontrou maior densidade e eficiência de bactérias que nodulam leguminosas em áreas de pastagem do que em áreas ocupadas por culturas, capoeiras, florestas perturbadas e sistemas agroflorestais.

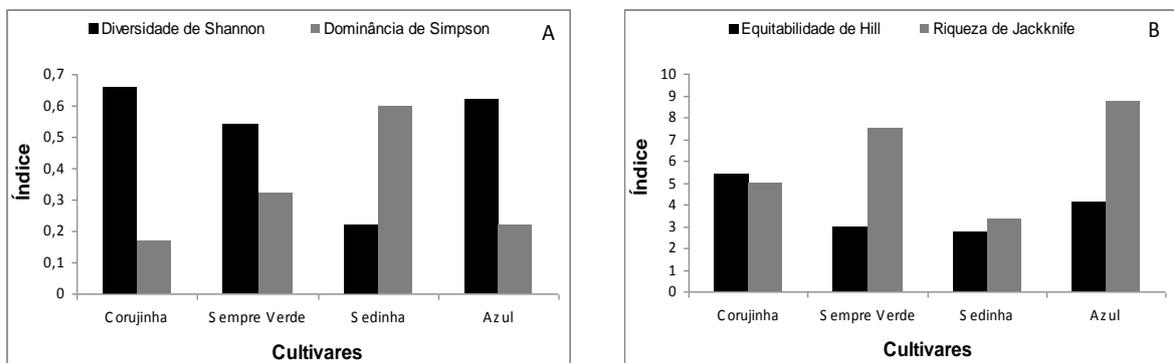
O equilíbrio entre o número de grupos morfofisiológicos de rizóbios foi maior para a área de pasto, que também apresentou a maior riqueza de grupos (Figura 4B). As áreas de mandioca e feijão tiveram uma riqueza de grupos de isolados semelhante à área de pasto, mas com um equilíbrio menor. A comunidade de plantas também pode influenciar a presença e ausência de estirpes de rizóbios específicas afetando, dessa forma, a diversidade desse grupo de microrganismos (STRAIN *et al.*, 1994).



**Figura 4:** Índices de Diversidade de Shannon e Dominância de Simpson (A), Equitabilidade de Hill e Riqueza de Jackknife (B) em função das coberturas vegetais para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.

A figura 5 mostra que houve diferença na diversidade de rizóbios capazes de nodular cada cultivar. A cultivar sedinha demonstrou uma menor capacidade de nodular com diferentes isolados de rizóbios, tendendo a nodular com um grupo mais seletivo de rizóbios em relação às outras cultivares (Figura 5A), as quais demonstraram maior capacidade de reconhecer os rizóbios nativos das diferentes áreas estudadas.

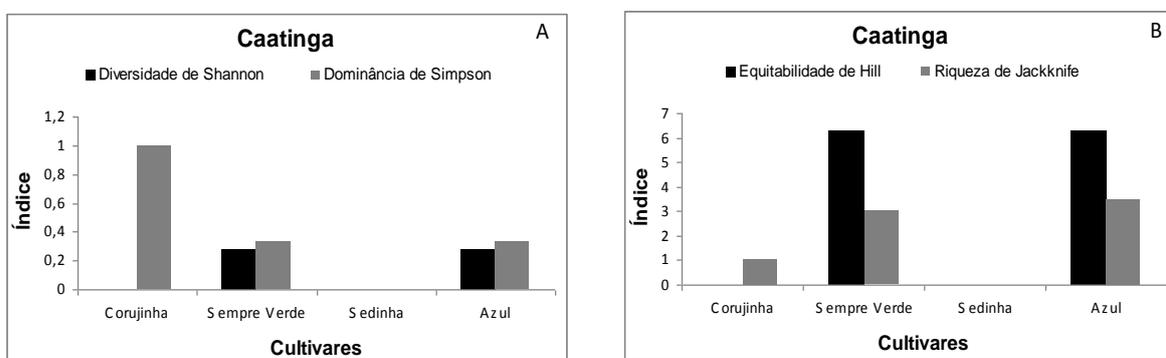
O equilíbrio no número de grupos de isolados de rizóbios foi maior na cultivar corujinha (Figura 5B). As maiores riquezas de isolados de rizóbio foram observadas com as cultivares sempre verde e azul, possivelmente podendo ter nodulado com um maior grupo de isolados de rizóbio diferentes.



**Figura 5:** Índices de Diversidade de Shannon e Dominância de Simpson (A), Equitabilidade de Hill e Riqueza de Jackknife (B) em função das cultivares de

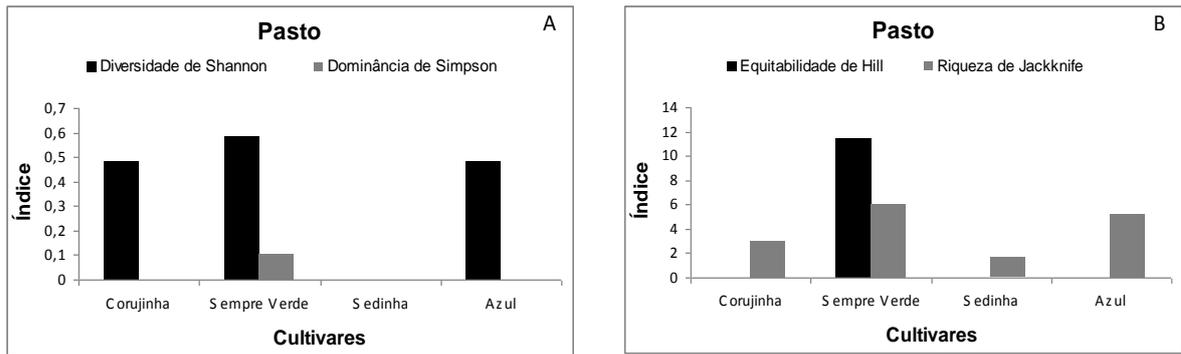
feijão para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.

Na área de caatinga, a cultivar corujinha obteve nodulação com um grupo restrito de isolados de rizóbio (Figura 6A), o que pode ser justificado pela baixa riqueza que nodula especificadamente esta cultivar (Figura 6B). Para a cultivar sedinha não houve nodulação com rizóbios desta área, reforçando a característica de especificidade entre bactéria e hospedeiro (Figura 6A e 6B). LEWIN *et al.* (1987) encontraram que *Vigna unguiculata* foi o hospedeiro de mais baixa especificidade na simbiose com 35 estirpes de rizóbio de crescimento rápido testadas, quando comparada com *Leucaena leucocephala* e *Macroptilium atropurpureum*.



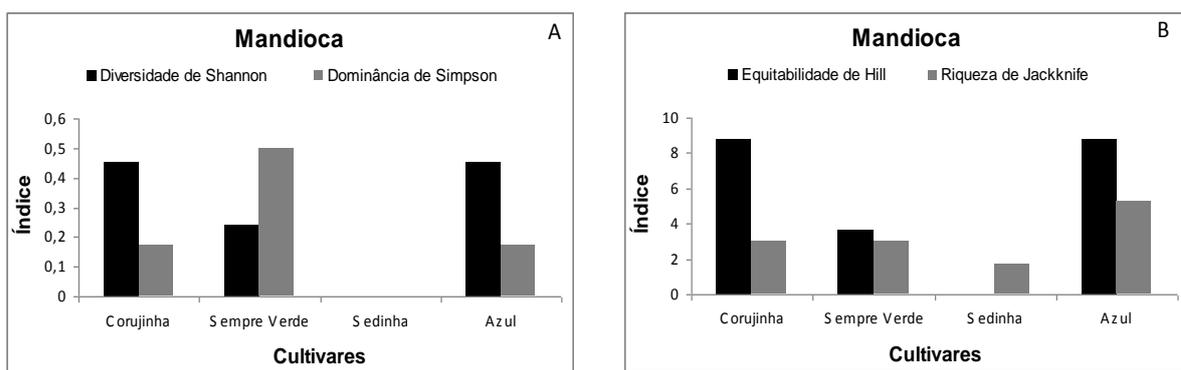
**Figura 6:** Índices de Diversidade de Shannon e Dominância de Simpson (A), Equitabilidade de Hill e Riqueza de Jackknife (B) em área de caatinga em função das cultivares de feijão, para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.

No pasto, a diversidade de isolados de rizóbio capazes de nodular as cultivares corujinha, sempre verde e azul foram semelhantes, não havendo dominância de grupos de isolados entre as quatro cultivares (Figura 7A), além disso, foi observada a equitabilidade e maior riqueza de isolados associados a cultivar sempre verde (Figura 7B).



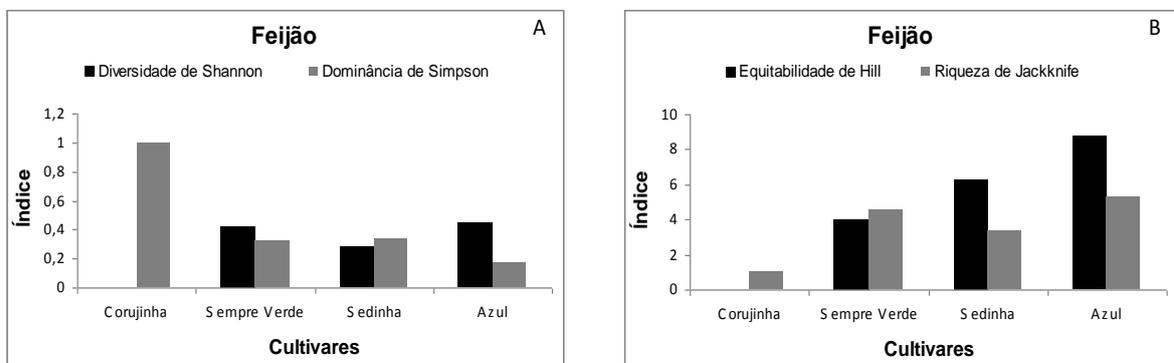
**Figura 7:** Índices de Diversidade de Shannon e Dominância de Simpson (A), Equitabilidade de Hill e Riqueza de Jackknife (B) em área de pasto, em função das cultivares de feijão, para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.

Para a área de mandioca observou-se uma maior diversidade de isolados de rizóbios provenientes das cultivares corujinha e azul, tendo uma dominância de isolados associados a cultivar sempre verde (Figura 8A). Já a cultivar sedinha apresentou menor riqueza e equitabilidade de isolados de rizóbios nesta área (Figura 8B). Práticas agrícolas produzem alterações no perfil da população de rizóbios nativos ou introduzidos. A menor diversidade e riqueza de rizóbios encontradas em solos cultivados, em relação aos solos sob vegetação nativa, são atribuídas às modificações impostas pelo sistema agrícola (OLIVEIRA, 1999).



**Figura 8:** Índices de Diversidade de Shannon e Dominância de Simpson (A), Equitabilidade de Hill e Riqueza de Jackknife (B) em área de mandioca, em função das cultivares de feijão, para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.

Na área de feijão a nodulação da cultivar corujinha foi dominada por um grupo de isolados de rizóbio (Figura 9A e 9B). A cultivar sedinha apresentou baixa diversidade nas áreas de mata, pasto e mandioca, o que fez perceber que os rizóbios isolados obtidos desta cultivar foram específicos de área de feijão. Estirpes de rizóbios com maior especificidade hospedeira sempre foram consideradas como sendo mais eficientes em fixar  $N_2$  (VARGAS, 1994; STAMFORD *et al.*, 1999). A influência da leguminosa na população de rizóbio é um fato comum e tem sido indicada como o fator mais importante para a composição da comunidade de rizóbio no solo (WOOMER *et al.*, 1988; ZILLI, 2000).



**Figura 9:** Índices de Diversidade de Shannon e Dominância de Simpson (A), Equitabilidade de Hill e Riqueza de Jackknife (B) em área de feijão, em função das cultivares de feijão, para uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de quatro tipos de uso, em três municípios do Agreste da Paraíba.

## CONCLUSÕES

Os isolados de rizóbios apresentaram homogeneidade em suas características fenotípicas.

A capacidade de infecção por isolados de rizóbios nativos da região do Agreste da Paraíba variou entre as cultivares de feijão caupi, sendo maior para as cultivares Corujinha e Azul.

A diversidade de isolados de rizóbios foi influenciada pelos diferentes tipos de uso.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, R. S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R.S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Embrapa, Brasília, DF. 157-170. 1994.

BARNET, Y.M. & CATT, P.C. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from australian *Acacia* spp. Plant and Soil, Dordrecht, v.135, 109-120, 1991.

BOEHM, M.J.; MDDEN. L.V.; HOITINK, H.A.J. Effect of organic matter decomposition level on bacteria species diversity and damping-off severity. Applied and Environmental Microbiology 59 (12): 4171-4179, 1993.

BOWEN, G.D. Nodulation of legumes indigenous to Queensland. Journal of Agricultural Science, Cambridge, v.13, 47-60, 1965.

CUNNINGHAM, S.D. & MUNNS, D.N. Effects of rhizobial extracellular polysaccharide on pH and aluminium toxicity. Soil Science Society America Journal, Madison, v.48, 1276-1279, 1984.

FRANCO, A.A. & BALIEIRO, F.C. The role of biological nitrogen fixation in land reclamation. Agroecology and Sustainability of Tropical Agriculture. EMBRAPA - CNPBS, Seropédica, 223 p, 2000.

FRED, E.B. & WAKSMAN, S.A. Yeast Extract-Manitol Agar Laboratory. Manual of General Microbiology, New York: McGraw Hill, 145p, 1928.

FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean *bradyrhizobia* as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.56, 224-229, 1990.

HALLIDAY, J. Field responses by tropical pasture legumes to inoculation with *rhizobium*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 10p, 1978.

HERRIDGE, D.F. & ROUGHLEY, R.J. Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of *rhizobium*. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.38, 19-27, 1975.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agricultural Ecosystems and Environmental*.7: 65-67, 1999.

JORDAN, D.C. Family rhizobiaceae. In: KRIEGER, N.R.; HOLT, J.G. Ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 234-256, 1984.

LANGE, R.T. Nodule bacteria associated with the indigenous *leguminosae* of south-western Australia. *Journal of General Microbiology*, Washington, v.26, 351-359, 1961.

LAWRIE, A.C. Relationships among rhizobia from native Australian native legumes. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v.45, 1822-1828, 1983.

LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, H.; WONG, C.; NELSON, L.; MANEN, J.F.; STANLEY, J.; DOWLING, D.N.; DÉNARIE, J.; BROUGHTON, W.J. Multiple Host-Specificity Loci Of The Broad Host-Range *Rhizobium* sp. NGR 234 Selected Using The Widely Compatible Legume *Vigna unguiculata*. *Plant Molecular Biology* 8, 447-459, 1987.

MAGURRAN, A. E. Ecological diversity and its measurement. London: Croom Helm, 179 p, 1988.

MARGALEF, R. Temporal succession. In: POUZZA, T. & TRAVERS, M. (eds). *Perspective in marine biology*. Berkeley. University of California. 323-347, 1958.

MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Characteristics of cowpea rhizobia isolated from the northeast region of Brazil. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, Ed. Pergamon Press, v. 29, n. 5/6. 1005-1010, 1997.

MARTINS, C.M.; LOUREIRO, M.F.; SOUTO, S.M.; FRANCO, A.A. Eficiência da fixação biológica de nitrogênio de isolados de nódulos de raiz e caule de *discolobium* spp. Revista Agrícola Tropical, 5, 67-79, 2001.

MOREIRA, F.M. de S. Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de leguminosa e introduzidas ou nativas da Amazônia e mata atlântica. Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 160p, 1991. Tese de doutorado.

NORRIS, D.O. Acid production by *rhizobium* a unifying concept. Plant and Soil, the Hague, v.22, n.2, 143-166, 1965.

ODUM, E. Ecologia. Ed. Guanabara Koogan, 1988.

OLIVEIRA, M.V. Diversidade genética de rizóbios em amostras ambientais analisadas através de sondas moleculares e primers específicos. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 1999. Tese de Doutorado.

OVREAS, L & TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agriculture soil communities. Microbial. Ecology 36: 303-315, 1998.

PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: Cultural characteristics of *bradyrhizobium* and *rhizobium* sp. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.22, 23-28. 1990.

PARKER, C.A. the significance of acid and alkali production by rhizobia on laboratory media. In: Fourth Australian Legume Inoculants Conference, Canberra, Paper n<sup>o</sup> 11, 1971.

PELCZAR, JR.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia do Solo e do Ar. In: PELCZAR, JR.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. Vol II, Makron Books do Brasil Editora Ltda. 306-336. 1997.

PEREIRA, E.G. Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na região amazônica. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil, 2000. Tese de doutorado.

RODRIGUES, W.C. DivEs v.2.0 - Diversidade de Espécies - Guia do Usuário. Seropédica: Entomologistas do Brasil. 9p. 2007. Disponível em: <<http://www.ebras.bio.br/dives/>>.

ROHLF, F.J. NTSYS- S-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.8. Applied Biostatistics Inc, Statistics and Computing 7: 75-83, 1994.

SHANNON, C.E. & WIENER, W. The mathematical theory of communication. Urbana: University Illinois Press, 1949.

SILVA, F.V. Diversidade de rizóbio em áreas sob diferentes coberturas vegetais do programa *SHIFT* localizado na região amazônica. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999. 85p. Tese de Mestrado.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. Nature 163, 688 p, 1949.

SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos or theory? Plant and Soil, Dordrecht, v.161, 1-10, 1994.

STADDON, W.J.; DUCHESNE, L.C.; TREVORS, J.T. Microbial diversity and community structure of post disturbance forest soils as determined by sole-carbon-source utilization patterns. Microb. Ecol. 34: 125-130, 1997.

STAMFORD, N.P.; SANTOS C.E.R.S.; MEDEIROS, R.; FREITAS, A.D.S.  
Efeito da fertilização com fósforo, potássio e magnésio em jacatupé infectado com rizóbios em um latossolo álico. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília: v. 34, n. 10, 1831-1838, 1999.

STINNER, B.B.R. & BLAIR, J.M. Ecological and Agronomic Characteristics of innovative Cropping Systems. In: EDWARDS, C.C; LAL,R.; MADDEN, P.; MILLER, R.H.; HOUSE, H. (eds) Sustainable Agricultural Systems. Ste Lucie Press, Delray Beach, 123-140. 1990.

STRAIN, S.R.; LEUNG, K.; WHITTAM, T. S.; BRUIJM, F. S.; BOTTOMLEY, P. J. Genetic structure of 1994.

TAN, I.K.P. & BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes - Biochemical basis of acid and alkali reactions. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.13, 389-393, 1981.

TAN, I.K.P. & BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes - Ion uptake differences between fast and slow-growing strains. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.14, 295-299, 1982.

TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureos*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa spp.*, *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v.49, 39-53, 1980.

VARGAS, M.T.; SUHET,A.R.; MENDES, I. de C.; PRES, J.R.R. Fixação Biológica de Nitrogênio em solos de Cerrados. EMBRAPA- CNAC-SP 1- 83 p,1994.

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Scientific Publications Oxford: Blackwell Scientific, 164 p, 1970.

ZAK, J.C.; WILLG, M.R.; MOORHEAD, L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. Soil Biology and Biochemistry. 26 (9): 1101-1108, 1994.

ZILLI, J.E.; Caracterização e Seleção de Estirpes de rizóbios para inoculação do caupi (*Vigna unguiculata*) em áreas de Cerrado. Tese de Mestrado UFRRJ, 2000.

WOOMER, P.; SINGLETON, P.W.E.; BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. Applied Environmental Microbiology, v.54, 1112-1116, 1988.

## CAPÍTULO II

### EFICIÊNCIA DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO AGRESTE DA PARAÍBA EM FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)

#### RESUMO

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa de ampla distribuição mundial, estando presente principalmente nas regiões tropicais. A fixação biológica do nitrogênio é o processo realizado por bactérias denominadas diazotróficas, conhecidas por rizóbios, e apresenta baixo custo, quando comparada aos fertilizantes nitrogenados. A introdução de inoculantes contendo rizóbios eficientes é dificultada, pois as estirpes nativas, em geral, são muito competitivas. Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência da inoculação com rizóbio nativo em feijão caupi cv. Sempre-Verde, cultivado em vasos de Leonard com substrato estéril, e em solo do Agreste da Paraíba. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação. No primeiro experimento foram testados 52 isolados nativos, a estirpe recomendada BR 3267, a estirpe NFB-700 e dois tratamentos, um com adição de N mineral e outro com ausência de N mineral e de inoculação. Foram utilizados vasos de Leonard confeccionados de garrafa PET de 2L, preenchidos com areia lavada autoclavada. Foram selecionados 13 isolados que promoveram os melhores conteúdos de nitrogênio total aos 45 dias após a germinação. No segundo experimento, os 13 melhores isolados foram testados, além das mesmas estirpes recomendadas e os tratamentos com e sem nitrogênio mineral, em vasos contendo um Neossolo Regolítico de Remigio, PB. Apenas um dos isolados promoveu matéria seca da parte aérea do caupi e eficácia relativa menor que as plantas que receberam N mineral ou as estirpes recomendadas. A matéria seca da parte aérea e o nitrogênio total no feijão caupi correlacionaram-se altamente com a eficácia relativa dos isolados testados

## CHAPTER II

### EFFETIVINESSE OF NATIVE RHIZOBIA FROM NODULES OF COWPEA (*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP) GROWN ON SOIL OF PARAIBA STATE

#### ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) this legume have a wide distribution in the world, being present mainly in tropical regions. The process of biological nitrogen fixation is carried by diazotrophic bacteria known as rhizobia, and offers low cost when compared to nitrogen fertilizers. The introduction of efficient inoculants containing rhizobia is complicated, because the native strains, in general, are very competitive. This study aimed to evaluate the efficiency of inoculation with native rhizobia on cowpea cv. Sempe Verde, cultivated in Leonard jars with sterile substrate and soil from Agreste region of Paraíba. The experiment was conducted in a greenhouse for two steps. In the first step were tested 52 native rhizobia, the recommended strain BR 3267 and NFB-700 strain and two treatments with presence and absence of mineral N and rhizobia inoculation. Leonard jars were used for PET bottle up to 2L of autoclaved filled with washed sand. 45 days after germination were selected the 13 isolates that promoted the highest content of total nitrogen. In the second step, the 13 best isolates were tested, a recommended strains and the treatments of mineral nitrogen udesd in the first step. Only one isolate promoted shoot dry matter and relative effectiveness of cowpea smaller than the plants that received mineral N or the recommended strains. The shoot dry matter and total nitrogen in cowpea is highly correlated with the relative effectiveness of isolates tested.

## INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), conhecido vulgarmente como feijão-macassar ou de corda, é uma leguminosa de ampla distribuição mundial, estando presente principalmente nas regiões tropicais do globo, pois estas têm características edafoclimáticas semelhantes às do seu provável berço de origem, a África (MOUSINHO, 2005). É a cultura de grãos mais importante da região semi-árida brasileira, alcançando de 95 a 100 % do total das áreas plantadas com feijão nos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte (SANTOS *et al.*, 2000) – em sua maioria por pequenos produtores, com baixa capacidade financeira. O Estado do Ceará é o maior produtor nacional de caupi, seguido pelo Piauí.

A Fixação Biológica do Nitrogênio é o processo realizado por microrganismos, denominados diazotróficos, que tornam o nitrogênio atmosférico em uma forma disponível (amônia) para as plantas e outros microrganismos. Esse processo constitui-se no principal meio de incorporação do nitrogênio atmosférico ao solo, sendo responsável por cerca de 65% do nitrogênio anualmente fixado na Terra (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; HUNGRIA & CAMPO, 2005). Quando comparada ao uso de fertilizantes nitrogenados (fixação industrial), a fixação biológica apresenta vantagens como baixo custo, ausência de problemas ambientais e abundância do nitrogênio na atmosfera.

Espécies de leguminosas tropicais normalmente são capazes de nodular com uma ampla faixa de rizóbios, contribuindo, desta forma, para a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) nessas regiões. Por outro lado, a introdução de inoculantes contendo rizóbios eficientes é dificultada, pois as estirpes nativas, em geral, são muito competitivas (SANTOS, 2001). Frente a esta situação, torna-se interessante estudar estratégias para avaliar a composição e a contribuição de estirpes de rizóbios nativos do solo onde se pretende introduzir o inoculante visando realizar uma eficiente fixação do  $N_2$  (ZILLI, 2001).

Em condições de clima tropical, os principais fatores abióticos que afetam o potencial da FBN são: acidez do solo, toxidez de alumínio, salinidade e baixa fertilidade do solo, disponibilidade de N mineral no solo, deficiência de

nutrientes como o fósforo e molibdênio, altas temperaturas no solo e baixa precipitação pluviométrica (MACCIÓ *et al.*, 2002; QUAGGIO *et al.*, 2004; HUNGRIA & VARGAS, 2000; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Com relação aos fatores bióticos pode se destacar a presença de antagonistas como fungos, bactérias e bacteriófagos, além de protozoários predadores de nódulos (THIES *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 1996, KAHINDI *et al.*, 1997).

Outro aspecto a ser observado é que, muitas vezes, uma estirpe eficiente utilizada como inoculante de qualidade pode começar a perder sua eficiência algum tempo depois, devido ao uso de estirpes melhores ou mesmo de novas cultivares do hospedeiro, que se associam mais eficientemente com outras bactérias (HAFEEZ *et al.*, 2001).

A observação de características relativas à especificidade é importante na seleção de estirpes que visem obtenção de um inoculante com maior afinidade com a planta hospedeira e que seja capaz de colonizar as raízes mais eficientemente do que as estirpes nativas (RUMJANEK *et al.*, 2005). Por essa razão, é comum não se verificar resultados positivos decorrentes da inoculação, uma vez que as espécies indígenas ou nativas são mais adaptadas e se tornam mais competitivas deslocando rapidamente as estirpes inoculantes dos sítios de infecção (SANTOS, 2001).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência da inoculação com rizóbio nativo no feijão caupi cultivado em um Neossolo Regolítico da região do Agreste do Estado da Paraíba.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Experimento 1 - Eficiência e seleção dos isolados de rizóbio em vaso de Leonard

#### Localização do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

#### Características das estirpes utilizadas

A estirpe BR 3267 foi inicialmente isolada em experimento com caupi, realizado em Petrolina, com a participação da equipe da EMBRAPA - Agrobiologia - EMBRAPA - Semi-árido. A estirpe apresenta resistência a temperaturas elevadas e é eficiente em solo com deficiência de umidade, tendo sido recomendada, em caráter provisório, pela RELARE (Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola).

A estirpe NFB 700 foi isolada de guandu, em experimento realizado em casa de vegetação, e selecionada para caupi em experimento de campo, conduzidos pela equipe do Núcleo de Fixação Biológica do Nitrogênio nos Trópicos - UFRPE.

52 isolados nativos foram provenientes de solos de três municípios do Agreste paraibano (Solânea, Esperança e Lagoa Seca), ocupados com diferentes tipos de uso: 1) caatinga; 2) pasto; 3) roçado de feijão e 4) roçado de mandioca. Foram utilizadas quatro variedades de caupi: Sempre-Verde, Sedinha, Corujinha e Azul, como planta isca para obtenção dos isolados em experimentos realizados em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O solo dos diferentes tipos de uso foram coletados na camada de 0-10 cm. Vasos foram preenchidos com 1 kg de um mesmo solo. Foram utilizadas três repetições de cada combinação de solo e variedade, totalizando 48 vasos (4 solos x 4 variedades x 3 repetições). As sementes de feijão foram desinfestadas com álcool etílico a 70% por 30s, e em seguida, imersas em

hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, posteriormente foram feitas 10 lavagens com água destilada, deixando-as de molho em água potável autoclavada durante 12h antes do plantio. Cada vaso recebeu quatro sementes de uma mesma cultivar e uma semana após a germinação foi feito o desbaste deixando duas plantas por vaso. Após 45 dias de cultivo, as plantas foram coletadas, sendo a parte aérea separada das raízes, foram escolhidos os dois maiores nódulos e colocados em tubos de ensaio com sílica gel para desidratação e armazenamento. Para o isolamento dos rizóbios, os nódulos foram reidratados imersos em água potável durante 24h sendo posteriormente tratados com uma solução de álcool etílico a 70% por 1 min, para quebrar a tensão superficial, e com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% por 2 min, para desinfestação superficial, sendo em seguida, lavados por 10 vezes, com água estéril para retirar o excesso de hipoclorito. Após esse tratamento, o nódulo foi levemente pressionado com uma pinça sobre uma placa de Petri, contendo meio YMA (extrato de levedura, manitol e ágar) e corante vermelho do congo (VINCENT, 1970). As placas foram levadas para estufa bacteriológica regulada a 28°C até o surgimento das colônias. As colônias que se apresentaram isentas de contaminantes foram repicadas com uma alça de platina para placas de Petri, contendo meio YMA (extrato de levedura, manitol e ágar) com corante azul de bromotimol. As placas foram incubadas a 28°C, por uma a duas semanas, até o aparecimento e desenvolvimento das colônias.

### **Tratamentos**

Os tratamentos consistiram de fontes de nitrogênio através da inoculação dos 52 isolados nativos de solos do Agreste da Paraíba, a estirpe recomendada BR 3267, proveniente da Embrapa Agrobiologia; a estirpe NFB-700, selecionada pelo Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio nos Trópicos (NFBNT); um tratamento com adição de N mineral ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de solução nutritiva) na forma de uréia e ausência de inoculação; e outro tratamento com ausência de N mineral e de inoculação. Foi utilizada a cultivar sempre verde de feijão caupi.

### **Vasos de Leonard e substrato**

Foram utilizados vasos de Leonard confeccionados de garrafa PET de 2 L, esterilizados com hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo por trinta minutos e lavados com água destilada autoclavada para retirar o excesso. Cada vaso recebeu 1,5 kg de areia lavada autoclavada e 500 mL de solução nutritiva de Norris isenta de N (NORRIS, 1964).

### **Tratamento das sementes e preparo dos inoculantes**

As sementes de feijão foram desinfestadas com álcool etílico a 70% por 30 segundos para quebrar a tensão superficial, em seguida foram imersas em hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, sendo posteriormente feitas 10 lavagens com água destilada para retirar o excesso, deixando de molho em água potável autoclavada para o plantio no dia seguinte.

Os inoculantes foram produzidos no Núcleo de Fixação Biológica do Nitrogênio nos Trópicos – UFRPE. As bactérias foram cultivadas em meio líquido contendo extrato de levedura e manitol (YM) com utilização do caldo de cultura após 48h de crescimento sob agitador horizontal e uma concentração mínima de  $10^8$  células viáveis.

### **Plantio, inoculação e condução do feijão**

Foram semeadas quatro sementes por vaso. Após cinco dias de germinadas foi feito o desbaste, deixando duas plantas por vaso e imediatamente realizada a inoculação com 1 mL do inoculante líquido por semente. Após dez dias foi feita uma reinoculação com a mesma quantidade de inoculante por planta.

Durante todo o período de condução, a cada três dias foi realizada a reposição da solução nutritiva de Norris isenta de nitrogênio (NORRIS, 1964) com 50 mL de solução para os tratamentos que não receberam N mineral. A mesma quantidade de solução de Norris completa foi fornecida para as plantas que receberam N mineral.

## **Coleta e análise das plantas**

As plantas foram coletadas por bloco aos 45 dias após germinação. A parte aérea foi separada da raiz e foram feitas as seguintes avaliações: a) biomassa seca da parte aérea; b) biomassa seca da raiz; c) biomassa seca e número de nódulos; d) N total na parte aérea.

A coleta antes do florescimento permitiu a avaliação da capacidade de nodulação e fixação do N<sub>2</sub> no período crítico do pré-florescimento, quando a simbiose se estabelece com massa nodular máxima, sem que ainda tenha iniciado o processo de senescência dos nódulos.

Para a avaliação da biomassa seca da parte aérea das plantas os ramos foram colocados em sacos de papel, devidamente identificados, levados para estufa de circulação de ar forçada à temperatura de 65-70°C até massa constante, em seguida pesados em balança de 0,01 g de precisão. As raízes foram devidamente identificadas e armazenadas em freezer para posterior contagem dos nódulos. Após a contagem os nódulos foram colocados para secar em estufa com circulação de ar forçada à temperatura de 65-70°C até atingir massa constante.

A parte aérea seca foi moída em micro-moinho tipo Willey para determinação do N total, realizada pelo método semi-micro Kjeldhal, em auto-analisador TECATOR Kjeltec, de acordo com BEZERRA NETO & BARRETO (2004). O N acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se as suas respectivas massas secas (g) pelos seus respectivos teores de N.

## **Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 56 tratamentos como fontes de N (52 isolados de rizóbio + 2 estirpes recomendadas + presença e ausência de N mineral) com três repetições, totalizando 168 unidades experimentais.

Os dados do experimento foram submetidos aos testes de adequação aos pré-requisitos da análise de variância, utilizando o procedimento GLM do SAS (SAS INSTITUTE, 1999). Os dados de biomassa seca de raiz e número de nódulos foram transformados para  $\sqrt{x}$ . As médias foram comparadas pelo

teste de Dunnet a 5% de probabilidade, adotando o tratamento com a estirpe recomendada BR 3267 como controle. Este teste permitiu a comparação pareada do controle com cada um dos demais tratamentos de fontes de N. Os isolados que obtiveram os melhores resultados para biomassa seca da parte aérea e nitrogênio total foram selecionados para o teste de eficiência em vasos com solo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 1

A análise de variância mostrou resultados significativos para todas as variáveis analisadas (Tabela 1).

**Tabela 1:** Níveis de significância para biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), biomassa seca e número de nódulos (BSN e NN) e nitrogênio total (NT) avaliados em plantas de caupi, (cv. Sempre) Verde cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 52 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral.

	BSPA	BSR	BSN	NN	NT
Isolado	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CV%	18	30	31	26	36
R <sup>2</sup>	0,88	0,63	0,80	0,84	0,90

Transformações: BSR e NN -  $\sqrt{x}$

CV% - Coeficiente de variação e R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação

Dos 52 isolados testados, 21 deles proporcionaram um desenvolvimento de biomassa seca da parte aérea do feijão caupi semelhante ao da estirpe BR 3267, recomendada nacionalmente, e boa parte desses 21 isolados tiveram desempenho superior ao tratamento com fornecimento de nitrogênio mineral. Este também não demonstrou o mesmo desempenho que a estirpe recomendada nacionalmente, com relação à produção de biomassa seca da parte aérea (Tabela 2).

**Tabela 2:** Biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), biomassa seca e número de nódulos (BSN e NN) e nitrogênio total acumulado (NT) na parte aérea de plantas de feijão caupi cv. Sempre Verde cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 52 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral.

Fonte de N	BSPA (g)	BSR (g)	BSN (g)	NN	NT (mg)
BR 3267 (controle)	3,84	0,933	0,2580	54	113,57
NFB 700	1,69*	0,350	0,0573*	33	32,17*
Com N mineral	2,57*	1,100	-	-	31,36*
Sem N mineral	1,51*	0,210*	-	-	7,96*
S1C V1(A)	3,97	0,933	0,2290	15*	147,31
S1C V1(B)	2,86	0,516	0,1541	16*	109,77
S1C V2(C)	1,40*	0,375	-	-	14,13*
S1C V2(A)	3,61	0,508	0,2126	17*	136,81
S1C V2(B)	2,25*	0,416	0,1578	3*	52,88*
S1C V2(D)	1,71*	0,440	-	-	29,39*
S1C V2(E)	3,00	0,950	0,1621	4*	103,32
S1C V2(F)	3,65	0,916	0,2783	27	142,54
S1C V2(G)	1,45*	0,375	-	-	15,13*
S1C V2(H)	1,62*	0,541	-	-	19,07*
S1C V3(C)	1,59*	0,425	-	-	17,77*
S1C V3(A)	1,35*	0,333	0,0024*	1*	12,45*
S1C V3(B)	1,78*	0,258	0,0518*	4*	29,58*
S1C V4(C)	1,62*	0,366	-	-	11,92*
S1C V4(A)	1,35*	0,393	0,0901*	8*	13,98*
S1C V4(B)	1,64*	0,433	-	-	14,40*
S1C V4(D)	1,50*	0,208	-	-	16,37*
S2C V1(C)	1,66*	0,150*	0,0184*	10*	15,84*
S2C V1(A)	3,30	0,900	0,2106	13*	136,20
S2C V1(B)	3,36	1,091	0,2196	42	120,94
S2C V2(C)	1,57*	0,475	-	-	9,50*
S2C V2(A)	3,47	1,033	0,2120	35	130,03
S2C V2(B)	4,11	0,950	0,2633	44	118,48
S2C V4(C)	1,62*	0,275	-	-	15,57*
S2C V4(A)	3,50	0,916	0,2115	44	127,02
S2C V4(B)	4,43	0,975	0,2951	36	125,68
S3C V1(C)	1,70*	0,583	-	-	16,21*
S3C V1(A)	1,63*	0,275	0,0023*	1*	11,65*
S3C V1(B)	1,65*	0,266	-	-	12,86*
S3C V1(D)	1,66*	0,053*	0,0317*	2*	19,79*
S3C V1(E)	1,51*	0,191	-	-	16,43*
S3C V2(C)	1,61*	0,308	0,0045*	2*	14,69*
S3C V2(A)	3,51	0,650	0,2390	70	110,66
S3C V2(B)	4,15	0,975	0,2323	47	154,27
S3C V2(D)	1,59*	0,251	0,0008*	1*	11,47*
S3C V3(B)	3,24	0,791	0,2595	17*	108,21
S3C V4(C)	1,56*	0,143*	0,0082*	5*	15,64*
S3C V4(A)	2,32*	0,491	0,0636*	2*	59,90
S3C V4(D)	1,49*	0,310	0,1325	17*	42,26*
S3C V4(B)	3,10	0,816	0,1773	27	34,14*
S4C V1(C)	1,47*	0,316	-	-	12,40*
S4C V1(A)	3,97	0,800	0,2415	27	141,12
S4C V1(B)	3,39	0,816	0,2483	45	110,23
S4C V2(C)	1,48*	0,341	-	-	18,33*
S4C V2(A)	1,61*	0,308	-	-	17,72*
S4C V2(B)	2,98	0,691	0,2178	20	116,66
S4C V2(D)	1,49*	0,458	-	-	18,02*
S4C V2(E)	1,80*	0,250	0,0764	1*	26,87*
S4C V3(A)	3,24	0,658	0,2016	29	121,65
S4C V4(C)	1,58*	0,300	-	-	8,27*
S4C V4(A)	3,78	0,941	0,2365	29	149,04
S4C V4(B)	3,24	0,791	0,1771	20	129,41

\* Diferença significativa em relação ao controle, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnet

A biomassa seca da raiz das plantas de caupi foi influenciada pelos diversos isolados e tratamentos nitrogenados. Ao contrário da massa seca da parte aérea, as plantas que receberam o nitrogênio mineral desenvolveram biomassa seca de raiz semelhante ao controle, e as plantas que receberam 46 dos isolados tiveram o mesmo comportamento, não diferindo do controle (Tabela 2). Este fato demonstra possivelmente a eficiência da fixação do nitrogênio atmosférico por alguns dos isolados testados e a grande influência do N mineral no crescimento e desenvolvimento das raízes, que mesmo esse desenvolvimento não tendo sido repassado na mesma proporção para a parte aérea, foi bastante significativo.

Um total de 21 isolados proporcionou nitrogênio total na parte aérea semelhante ao das plantas que receberam a inoculação com a estirpe recomendada. Isto comprova a boa eficiência dos isolados em fixar o N atmosférico (Tabela 2).

Com relação ao número de nódulos, dos 52 isolados que foram inoculados nas plantas de feijão caupi, apenas 34 formaram nódulos. Desses 34 nodulantes, 15 formaram número de nódulos semelhante ao formado pelas plantas que receberam a estirpe recomendada (Tabela 2).

Com relação à biomassa seca de nódulos, 21 dos isolados testados produziram biomassa semelhante à estirpe de recomendação, sendo este um parâmetro considerado de maior importância que o número de nódulos em avaliações de eficiência nodulante e indiretamente, de eficiência em fixar o nitrogênio (Tabela 2).

Dos 52 isolados testados em vasos de Leonard, 13 foram selecionados para avaliação de eficiência em solo: S3CV2 (A), S1CV2 (E), S4CV4(A), S4CV3 (A), S4CV1(A), S2CV1(A), S2CV2(A), S2CV4(A), S1CV2(F), S2CV4(B), S1CV2(A), S1CV1(A), S3CV2 (B). Inicialmente estava prevista a seleção dos 10 melhores isolados através da avaliação do N total e biomassa seca da parte aérea para o segundo experimento, quantidade que foi ampliada para os 13 melhores (em valores absolutos das mesmas variáveis seletoras), devido à quantidade de isolados com resultados não significativos com relação ao controle e ainda haver disponibilidade de solo para utilização de mais tratamentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Experimento 2 - Eficiência e seleção dos isolados de rizóbio em vaso com solo

#### Localização do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

#### Caracterização do solo

O solo utilizado foi um Neossolo Regolítico do município de Remígio, mesorregião do Agreste do Estado da Paraíba, microrregião de Esperança. A área de coleta havia sido ocupada anteriormente, há 10 anos, com a cultura da batatinha e atualmente está sob pastagem nativa de Braquiária. Foram realizadas as análises de: pH,  $H^+ + Al^{+3}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{+2} + Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ , P, C.O., M.O. e granulometria de acordo com a EMBRAPA (1999), e a determinação da população rizobiana nativa capaz de nodular o feijão caupi cv. Sempre Verde, através da técnica do Número Mais Provável (NMP) de acordo com a RELARE (2007). Os resultados constam na Tabela 3.

**Tabela 3:** Características químicas, físicas e microbiológicas do Neossolo Regolítico do município de Remígio – Paraíba, na camada de 0-20 cm.

pH	$H^+ + Al^{+3}$	$Al^{+3}$	$Na^+$	$K^+$	$Ca^{+2} + Mg^{+2}$	$Ca^{+2}$	P	C.O	M.O
(água – 1:2,5)	----- (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ) -----						(mg/dm <sup>3</sup> )	-----g/kg-----	
7,1	2,93	0,0	0,03	0,13	3,00	1,95	50	3,78	6,52
Classe textural			Areia			Silte		Argila	
Arenoso			836			80		84	
População rizobiana					1,14 x 10 <sup>8</sup> ufc.g de solo				

Análises realizadas pelos Laboratórios de Fertilidade do Solo, Física do Solo e Microbiologia do Solo da UFRPE - PE

## **Tratamentos**

Os tratamentos consistiram de fontes de nitrogênio através da inoculação de 13 isolados de rizóbio nativos no feijão caupi (cv. Sempre-verde), provenientes da seleção em vaso de Leonard; da estirpe recomendada BR 3267, proveniente da Embrapa Agrobiologia; da estirpe NFB-700, selecionada pelo Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio nos Trópicos (NFBNT); além de dois tratamentos, um com adição de N mineral (80 kg N/ha) na forma de nitrato de amônio e ausência de inoculação, e outro com ausência de N mineral e de inoculação.

## **Preparo do solo e adubação**

O solo foi seco ao ar após a coleta, destorroado e peneirado em peneira de 6mm, acondicionados em vasos de 2kg para serem cultivados com feijão caupi cv. Sempre-Verde.

Todos os vasos receberam adubação mineral de fósforo (P) e potássio (K). O P foi fornecido na dosagem  $20 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  na forma de supertríplo e o K fornecido na dosagem  $40 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  na forma de cloreto de potássio segundo as RECOMENDAÇÕES DE ADUBAÇÃO PARA O ESTADO DE PERNAMBUCO (1998). Para as plantas que receberam o tratamento com nitrogênio mineral, este foi fornecido na dosagem de  $80 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  (RELARE) na forma de nitrato de amônio.

## **Tratamento das sementes e preparo dos inoculantes**

Idem ao experimento 1.

## **Plantio, inoculação e condução do feijão caupi**

O semeio, desbaste e a inoculação foram feitos de modo semelhante ao experimento 1.

Durante todo o período de condução, a irrigação foi realizada a cada dois dias com água corrente até drenagem dos vasos.

### **Coleta e análise das plantas**

Idem ao experimento 1 adicionada a análise da eficácia relativa dos isolados (FARIA & FRANCO, 2002), segundo a fórmula:

$$ER = \frac{BSPA_{isolado}}{BSPA_{N\text{ mineral}}} \times 100$$

Onde: ER é a eficácia relativa,  $BSPA_{isolado}$  é a biomassa seca da parte aérea do isolado testado e  $BSPA_{N\text{ mineral}}$  é a biomassa seca da parte aérea da planta que recebeu o tratamento com N mineral.

### **Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 17 tratamentos como fontes de N (13 isolados de rizóbio + 2 estirpes recomendadas + presença e ausência de N mineral) e quatro repetições, totalizando 68 unidades experimentais.

Os dados do experimento foram submetidos aos testes de adequação aos pré-requisitos da análise de variância, utilizando o procedimento GLM do SAS (SAS INSTITUTE, 1999). Os dados de número de nódulos foram transformados por  $\text{Log}_{10}(x)$  e os de nitrogênio total por  $\sqrt{x}$ . As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Análise de correlação foi feita entre as variáveis biomassa seca da parte aérea, biomassa seca da raiz, biomassa seca e número de nódulos, nitrogênio total e eficácia relativa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 2

Os resultados da análise de variância dos tratamentos estudados no experimento com solo e seus níveis de significância encontram-se na Tabela 4. Houve efeito significativo entre as fontes de N para biomassa seca da parte aérea e para eficácia relativa.

**Tabela 4:** Níveis de significância para biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), biomassa seca e número de nódulos (BSN e NN), nitrogênio total (NT) e eficácia relativa (ER) avaliados em plantas de caupi cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral.

	BSPA	BSR	BSN	NN	NT	ER
Isolado	0,0007	0,3819	0,1324	0,1619	0,1036	0,0008
CV%	16	42	26	6	15	17
R <sup>2</sup>	0,80	0,61	0,47	0,40	0,77	0,73

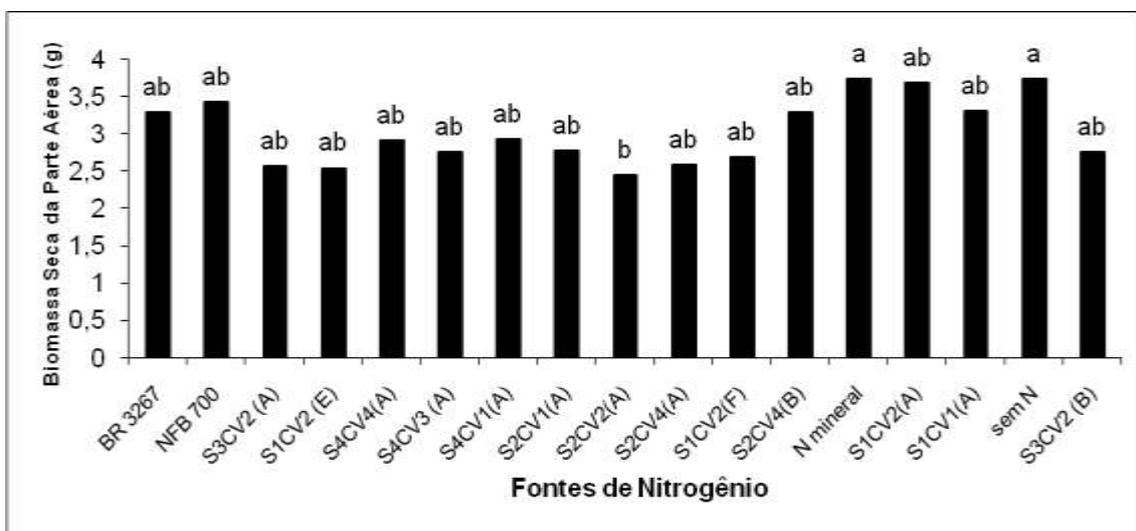
Transformações: NN - Log<sub>10</sub> (x); NT -  $\sqrt{x}$

CV% - Coeficiente de variação e R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação

Entre todos os isolados testados, apenas o S2CV2(A) não conseguiu promover um ganho de biomassa na parte aérea equivalente às plantas que receberam as estirpes recomendadas ou o nitrogênio mineral (Figura 1). Este fato demonstra a eficiência em fixação do nitrogênio atmosférico pelos isolados utilizados, ou a capacidade fixadora de outros rizóbios nativos do solo. A análise do número mais provável de células de rizóbio do solo utilizado apresentou uma grande população de rizóbios capaz de nodular o feijão caupi cv. Sempre Verde, tendo uma população de  $1,14 \times 10^6$  ufc.g de solo<sup>-1</sup>, o que pode justificar uma competição entre os rizóbios inoculados e os rizóbios nativos pelos sítios de infecção, já que o solo não foi esterilizado.

Contudo, MARTINS *et al.* (2003) verificou a benefício da inoculação com estirpes recomendadas para o caupi no aumento da população de rizóbios em campo e no número de nódulos formados pelas estirpes inoculadas em detrimento ao número de nódulos formados pela nodulação espontânea.

THIES (1991) avaliou a capacidade de nodulação e de fixação de nitrogênio de nove leguminosas, entre elas o caupi, através da inoculação de estirpes recomendadas em solos com populações de rizóbios nativos que variaram de 0 a  $5,3 \times 10^4$  ufc.g de solo<sup>-1</sup>. Neste estudo, a competição do rizóbio indígena por ocupação de nódulo não foi necessariamente o principal fator determinante do fracasso para obter uma resposta significativa da inoculação. Os resultados sugeriram que a presença de uma adequada população rizobiana conhecedora dos requisitos para fixação de N<sub>2</sub> do hospedeiro foi a razão principal para o fracasso das culturas para responder a inoculação.

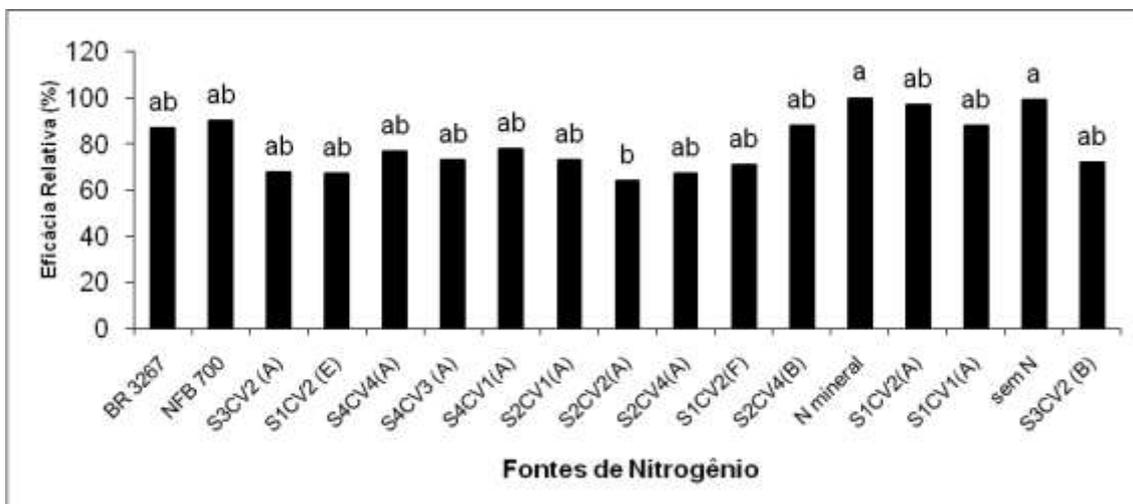


**Figura 1:** Biomassa seca da parte aérea de plantas de feijão caupi cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral.

Isolados provenientes de populações nativas podem ser igualmente eficientes às estirpes recomendadas na fixação biológica de nitrogênio. Além disso, trabalhos têm demonstrado alta similaridade entre isolados nativos e estirpes introduzidas a partir de inoculantes (FERREIRA & HUNGRIA, 2002).

Os resultados corroboram (NASCIMENTO *et al.*, 2008), avaliando o desenvolvimento e a produção do feijão caupi em condições de campo, onde a inoculação com estirpes recomendadas, ou a eficiência simbiótica da população nativa de rizóbio, permitiu produção de biomassa e grãos no caupi semelhante à da adubação com  $50 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  de N.

Os isolados testados apresentaram grande eficácia na fixação do nitrogênio, e parte deles com produção de biomassa equivalente a 80% ou mais, da biomassa produzida pelo tratamento com N mineral (Figura 2).



**Figura 2:** Eficácia relativa da parte aérea de plantas de feijão caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral.

SOARES *et al.* (2006) encontrou comportamento semelhante com relação a BSPA do caupi e a eficácia relativa de dois isolados nativos de solos da amazônia, quando comparados com o tratamento nitrogenado. Esses mesmos isolados foram considerados adaptados a alta temperatura e acidez do solo, com potencial para utilização como inoculante para o feijão caupi cultivado na região Nordeste (MOREIRA, 2005).

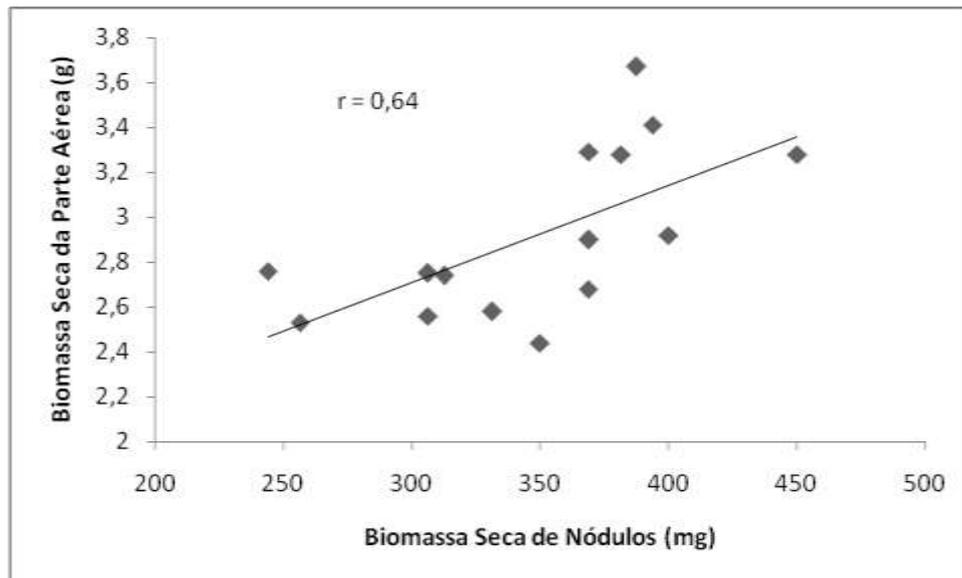
Foram encontradas correlações altamente significativas envolvendo todas as variáveis. Exceção observada para as correlações envolvendo NN com BSR e NT, não significativas, confirmando o fato de que o NN não é bom preditor do que acontece com outras variáveis de desenvolvimento (Tabela 5).

**Tabela 5:** Níveis de significância das correlações entre biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), biomassa seca e número de nódulos (BSN e NN), nitrogênio total (NT) e eficácia relativa (ER) de plantas de feijão caupi, cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano.

<i>Variáveis</i>	<i>BSN</i>	<i>BSR</i>	<i>NN</i>	<i>NT</i>	<i>ER</i>
<i>BSPA</i>	0,58*	0,71*	0,33*	0,88*	<0,0001
<i>BSN</i>		0,34*	0,44*	0,41*	<0,0001
<i>BSR</i>			ns	0,65*	<0,0001
<i>NN</i>				ns	0,0017
<i>NT</i>					<0,0001

À medida que houve aumento da biomassa seca de nódulos, aumentou também a biomassa seca da parte aérea (Figura 3). O melhor coeficiente de correlação encontrado para a BSN correlacionado a BSPA confirma a preferência por esta variável em relação ao número de nódulos para predizer relações com as outras variáveis associadas ao desenvolvimento do feijão caupi.

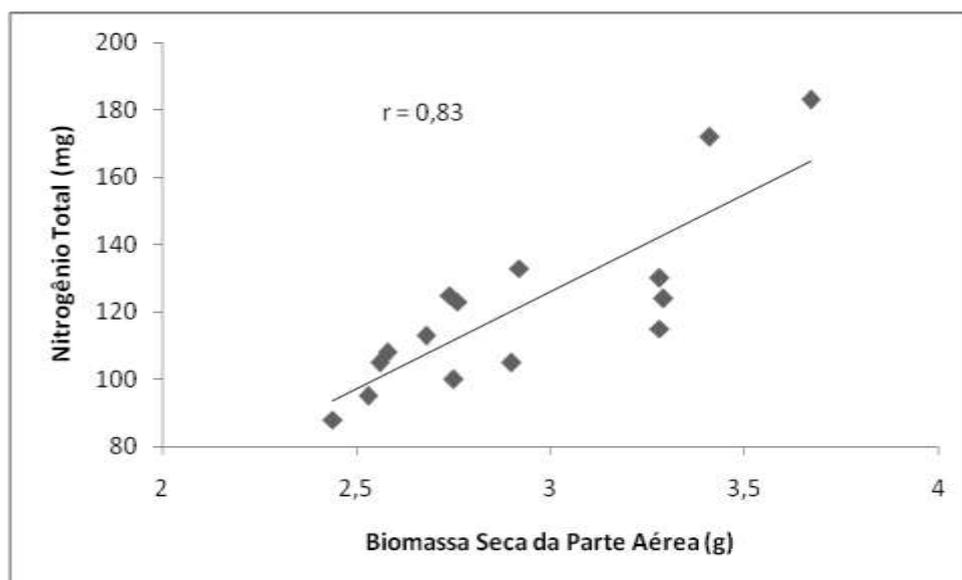
Além disso, PIMRATCH *et al.* (2004a e 2004b) sugeriram que o acúmulo de BSPA é a característica mais confiável para seleção de cultivares com maior potencial simbiótico em solos com baixa disponibilidade de nitrogênio.



**Figura 3:** Correlação entre a biomassa seca de nódulos e a biomassa seca da parte aérea de plantas de caupi cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano e duas estirpes recomendadas. Os pontos representam a média de 3 repetições.

O nitrogênio total teve uma alta correlação com a biomassa seca da parte aérea, já que é diretamente influenciado por esta (Figura 4).

Este resultado corrobora BOHRER & HUNGRIA (1998) avaliando o potencial simbiótico de cultivares de soja, indicando que estas seriam duas das variáveis que melhor exprimem o processo da FBN.



**Figura 4:** Correlação entre a biomassa seca da parte aérea e o nitrogênio total da parte aérea de plantas de caupi cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano e duas estirpes recomendadas. Os pontos representam a média de 3 repetições.

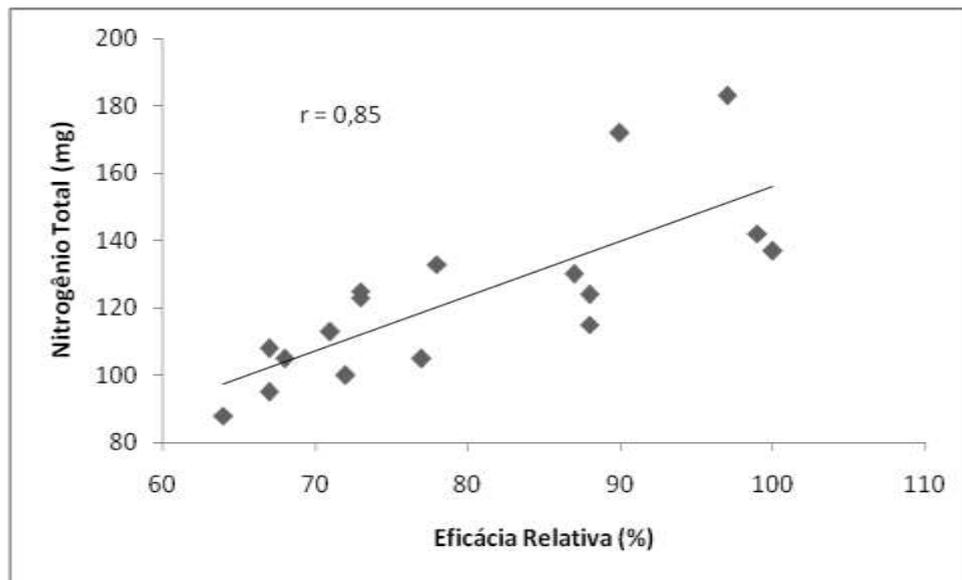
Além da biomassa seca da parte aérea e do nitrogênio total, outra variável citada por BOHRER & HUNGRIA (1998), que melhor exprime o processo da FBN é eficácia relativa dos isolados. O potencial em fixar nitrogênio dos isolados foi de fundamental importância para a produção de biomassa, que demonstrou dependência da efetiva capacidade de fornecimento de N pelos isolados testados, demonstrado pelo alto coeficiente de correlação encontrado para a eficácia relativa e a produção de biomassa seca da parte aérea.

Da mesma forma que a produção de biomassa, o nitrogênio total foi influenciado pela eficiência dos isolados em fixar nitrogênio. Quanto maior a eficácia do isolado, maior a quantidade de nitrogênio presente na planta (Figura 5).

SILVA (2007) também encontrou alta correlação envolvendo as variáveis biomassa seca da parte aérea, nitrogênio total e eficácia relativa de isolados inoculados em plantas de amendoim cultivadas em solo da Zona da Mata de Pernambuco.

Apesar da alta correlação entre as variáveis relacionadas fixação biológica de nitrogênio e biomassa seca da parte aérea, ressalva deve ser feita

com relação à importância do processo de fixação biológica com relação ao feijão caupi, quando se tem por objetivo a produção de grãos. PIM RATCH *et al.* (2004b) relatam alta correlação entre o acúmulo de MSPA e o peso de 100 grãos, indicando que a FBN pode contribuir para aumento de produtividade, entretanto, em menor escala quando comparada à contribuição para o crescimento vegetativo.



**Figura 5:** Correlação entre a eficácia relativa e o nitrogênio total da parte aérea de plantas de caupi cv. Sempre Verde cultivadas em vasos com solo, inoculadas com 13 isolados de rizóbios de solos do agreste paraibano, duas estirpes recomendadas, presença e ausência de nitrogênio mineral. Os pontos representam a média de 3 repetições.

## CONCLUSÕES

A cultivar de feijão caupi Sempre Verde respondeu à adição de nitrogênio, independente da fonte utilizada.

Os isolados de rizóbio ou os rizóbios nativos do solo do município de Remígio apresentaram alta capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico.

Os isolados de rizóbio ou os rizóbios nativos foram capazes de promover o desenvolvimento do feijão caupi equivalente à das plantas que receberam adubação com N mineral ou inoculação com estirpes recomendadas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diversos tipos de uso das terras agricultáveis promovem impactos na microbiota do solo de forma diferenciada, que pode resultar em uma seleção de diferentes espécies de microrganismos. Apesar disto, os isolados de rizóbios apresentaram homogeneidade em suas características fenotípicas, o que pode indicar um direcionamento para a permanência de apenas um gênero.

Mesmo assim, a menor diversidade microbiana resultante da ação antrópica nas áreas agrícolas, pode ter uma grande capacidade de adaptação ao ambiente modificado, implicando no possível surgimento de novas habilidades associativas que envolvem microrganismos.

Neste aspecto, se torna importante não somente prospectar sobre os possíveis benefícios que este conhecimento pode trazer, mas acima de tudo, que seja utilizado de forma correta, sempre levando em consideração e em primeiro lugar, o desenvolvimento do ser humano e a máxima preservação do meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

- BEZERRA NETO, E. & BARRETO, L.P. Métodos de análises químicas em plantas. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 165p, 2004.
- BOHRER, T.R.J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v.33, n.12, 937-952, 1998.
- FERREIRA, M.C. & HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. Fields Crops Research v.79, 139-152. 2002.
- HAFEEZ, F.Y. Competition between effective and less effective strains of *Bradyrhizobium* spp. for nodulation in *Vigna radiata*. Biology and Fertility of Soils, New York, v.33, n.5, 382-386, 2001.
- HUNGRIA, M. & CAMPO, R.J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 30, 2005, Recife. Anais. Recife, 1 CD-ROM, 2005.
- HUNGRIA, M. & VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field Crops Research, Amsterdam, v.65, n.2, 151-164, 2000.
- KAHINDI, J.H.P. et al. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. Applied Soil Ecology, Amsterdam v.6, n.1, 55-76, 1997.
- MACCIÓ, D.; FABRA, A.; CASTRO, S. Acidity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and the attachment to peanut roots. Soil Biology & Biochemistry, Elm sford, v.34, n.2, 201-208, 2002.
- MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen

fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, New York, v. 38, n.6, 333-339, 2003.

MOREIRA, F.M.S. Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para produção de inoculantes comerciais. Lavras, Universidade Federal de Lavras. *Boletim de Extensão*, n. 102, 2005.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: UFLA, 729p, 2006.

MOUSINHO, F.E.P. Viabilidade econômica da irrigação do feijão-caupi no Estado do Piauí. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, 97p, 2005. Tese de Doutorado.

NASCIMENTO, C. S.; STAMFORD, N. P.; LIRA JUNIOR, M. A.; FREIRE, M. B. G. S.; SOUSA, C. A.; Nodulação e produção do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) sob efeito de plantas de cobertura e inoculação. *Revista Brasileira De Ciência do Solo*, Viçosa, v.32, n.2, abr.2008.

NORRIS, D. O. Some concepts and methods in sub-tropical pasture research. London: Commonwealth Bureau of Pasture and Field Crops, (Bulletin, 47), 1964.

PIMRATCH, S. Heritability and correlation for nitrogen fixation and agronomic traits of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Songklanakarin Journal Science Technology*, v.26, n.3, 305-315, 2004a.

PIMRATCH, S.; JOGLOY, S.; TOOMSAN, B.; JAISIL, P.; KESMALA, T.; PATANOTHAI, A. Evolution of seven peanut genotypes for nitrogen fixation and agronomic traits. *Songklanakarin Journal Science Technology*, v.26, n.3, 295-304, 2004b.

QUAGGIO, J. A. Peanut response to lime and molybdenum application in low pH soils. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v.28, n.4, 659-664, 2004.

RECOMENDAÇÕES DE ADUBAÇÃO PARA O ESTADO DE PERNAMBUCO (2ª aproximação) por Francisco José de A. Cavalcanti. Recife, IPA, 198p, 1998.

RELARE – Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola. Anais da XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola. Londrina: Embrapa Soja, 212p, 2007.

RUMJANEK, N.G. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa, 279-335, 2005.

SANTOS, C.A.F.; ARAÚJO, F.P.; MENEZES, E.A. 147:378-382, 1995. Comportamento produtivo do caupi em regime irrigado e de sequeiro em Petrolina e Juazeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 35:2229-2234, 2000.

SANTOS, C.E.R. S. Diversidade de rizóbio nativo na Região Nordeste do Brasil capaz de nodular amendoim (*Arachis hypogaea*) *Stylosanthes* e *Aeschynomene*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 174p, 2001. Tese de Doutorado.

SAS INSTITUTE. The SAS System for Windows. CD-ROM for Windows 32-bits.1999.

SILVA, M.F. Efetividade da inoculação com *bradyrhizobium* spp. em amendoim cultivado em solo da zona da mata de Pernambuco. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 56p, 2007. Dissertação de Mestrado.

SOARES, A.L.L. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG): I - caupi. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 30, n. 5, 795-802, 2006.

TEIXEIRA, M.L.F.; COUTINHO, H.C.L.; FRANCO, A.A. Effects of *Cerotoma arcuata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on predation of nodules and on N<sub>2</sub> of *Phaseolus vulgaris* Row crops, forage and small grains. Entomological Society of America, College Park, v.89, n.3, 165-169, 1996.

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

THIES, J.E.; WOOMER, P.L.; SINGLETON, P.W. Enrichment of *Bradyrhizobium* spp. populations in soil due to cropping of the homologous host legume. Soil Biology and Biochemistry, Elmsford, v.27, n.4, 633-636, 1995.

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Scientific Publications Oxford: Blackwell Scientific, 164 p, 1970.

ZILLI, J. L. E. Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para inoculação de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em áreas do cerrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 137 p, 2001. Dissertação de Mestrado.

## ANEXO 1

Caracterização fenotípica de uma coleção de 52 isolados de rizóbio obtidos a partir de nódulos de feijão caupi cultivados em solos oriundos de quatro tipos de uso, coletados em três municípios do Estado da Paraíba

Código	Lia	Forma	Borça	Larano	pH	Elevação	Transparência	Cor	Muco	Quantidade	Limpa	Elastocidade	Colônia
SI07(A)	1	Uruar	Regular	Funitome	Neutro	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(B)	1	Uruar	Regular	Funitome	Neutro	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(A)	1	Uruar	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(B)	1	Uruar	Regular	Funitome	Acido	Sim	Opaco	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(C)	1	Uruar	Regular	Funitome	Levemente acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(D)	1	Uruar	Irregular	Funitome	Acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(E)	1	Uruar	Regular	Funitome	Alcalino	Sim	Translúcida	Branca	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(G)	1	Uruar	Irregular	Funitome	Levemente acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(H)	1	Uruar	Regular	Funitome	Levemente acido	Sim	Opaco	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(A)	1	Uruar	Regular	Funitome	Neutro	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(B)	1	Uruar	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(C)	1	Uruar	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translúcida	Branca	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(C)	1	Uruar	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(D)	1	Uruar	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(A)	1	Uruar	Regular	Funitome	Levemente acido	Sim	Opaco	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(A)	1	Uruar	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(B)	1	Uruar	Regular	Funitome	Levemente acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(C)	1	Uruar	Regular	Funitome	Levemente acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(A)	1	Uruar	Regular	Funitome	Levemente acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(B)	1	Uruar	Regular	Funitome	Neutro	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Muito	Não	Sim	Heterogênea
SI07(C)	1	Uruar	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(A)	1	Uruar	Regular	Funitome	Levemente acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(B)	1	Uruar	Regular	Funitome	Neutro	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(C)	1	Uruar	Irregular	Funitome	Levemente acido	Sim	Opaco	Crete	Sim	Medo	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(A)	1	Uruar	Regular	Funitome	Alcalino	Sim	Opaco	Crete	Sim	Fuoco	Não	Sim	Heterogênea
SI07(B)	1	Uruar	Regular	Funitome	Acido	Sim	Opaco	Crete	Sim	Fuoco	Sim	Sim	Heterogênea
SI07(C)	1	Uruar	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translúcida	Crete	Sim	Fuoco	Não	Não	Heterogênea

Continuação..

Código	Lia	Forma	Borda	Intorno	pH	Elevação	Transparencia	Cor	Muco	Quantidade	Limpa	Elasticoidade	Colonia
SUV1(D)	1	Urdular	Regular	Funitome	Levementeacido	Sim	Opaco	Creme	Sim	Pouco	Sim	Sim	Homogenea
SUV1(E)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Opaco	Creme	Sim	Medo	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(A)	1	Urdular	Regular	Funitome	Levementeacido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Medo	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(B)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Medo	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(C)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Medo	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(L)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Opaco	Creme	Sim	Medo	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(B)	1	Urdular	Regular	Funitome	Levementeacido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Medo	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(A)	1	Urdular	Regular	Funitome	Levementeacido	Sim	Opaco	Creme	Sim	Pouco	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(B)	1	Urdular	Regular	Funitome	Levementeacido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Medo	Nao	Sim	Homogenea
SUV4(C)	1	Urdular	Regular	Funitome	Levementeacido	Sim	Opaco	Creme	Sim	Pouco	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(L)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Pouco	Sim	Sim	Homogenea
SUV1(A)	1	Urdular	Regular	Funitome	Levementeacido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Medo	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(C)	1	Urdular	Regular	Funitome	Alcalino	Sim	Opaco	Creme	Sim	Pouco	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(A)	1	Urdular	Regular	Funitome	Levementeacido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Pouco	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(B)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Medo	Nao	Sim	Homogenea
SUV4(L)	1	Urdular	Irregular	Funitome	Levementeacido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Pouco	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(B)	1	Urdular	Regular	Funitome	Levementeacido	Sim	Opaco	Creme	Sim	Medo	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(A)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Pouco	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(B)	1	Urdular	Regular	Funitome	Neuro	Sim	Translucida	Creme	Sim	Medo	Nao	Sim	Homogenea
SUV4(C)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Translucida	Creme	Sim	Pouco	Sim	Sim	Homogenea
SUV4(F)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Opaco	Creme	Sim	Pouco	Nao	Sim	Heterogenea
SUV4(B)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Opaco	Creme	Sim	Pouco	Sim	Nao	Heterogenea
SUV1(B)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Opaco	Creme	Sim	Pouco	Sim	Sim	Heterogenea
SUV1(C)	1	Urdular	Regular	Funitome	Acido	Sim	Opaco	Creme	Sim	Pouco	Sim	Nao	Homogenea
SUV4(A)	1	Urdular	Regular	Funitome	Neuro	Sim	Opaco	Creme	Sim	Medo	Sim	Nao	Homogenea

## ANEXO 2

Grupos dos 52 isolados oriundos de quatro tipos de uso, em três municípios do Estado da Paraíba, de acordo com a caracterização fenotípica.

<i>Grupo</i>	<i>Isolados</i>
1	S1CV1 (A), S1CV1 (B), S1CV3(A)
2	S1CV2(A), S1CV2(B), S1CV2(C), S1CV2(E), S1CV3(B), S1CV3(C), S1CV4(C), S1CV4(D), S2CV1(A), S2CV1(B), S2CV1(C), S2CV2(A), S2CV2(C), S2CV4(A), S2CV4(B), S3CV2(A), S3CV2(B), S3CV2(C), S3CV3(B), S3CV4(D), S4CV1(A), S4CV2(A), S4CV3(A), S4CV4(C)
3	S1CV2(D), S1CV2(G), S1CV2(H), S1CV4(A), S3CV1(B), S3CV1(E), S3CV2(D), S3CV4(A), S3CV4(C), S4CV1(B), S4CV2(D), S4CV2(E), S3CV1(D)
4	S2CV4(C), S3CV4(B)
5	S1CV2(F), S4CV2(B)
6	S2CV2(B)
7	S3CV1(A), S4CV2(C), S4CV4(B)
8	S1CV4(B), S4CV4(A)
9	S3CV1(C), S4CV1(C)

### ANEXO 3

Características fenológicas observadas em diferentes grupos de isolados de rizóbios com 75% de similaridade, elaboradas pelo algoritmo UFGMA em matriz de similaridade de Jaccard

Característica fenológica	Grupos fenológicos								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tempo de crescimento	1da	1da	1da	1da	1da	1da	1da	1da	1da
Forma da colônia	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Textura da colônia	Regular	Regular	Regular/irregular	Regular/irregular	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular
Aparente da colônia	Homogênea	Homogênea	Homogênea/heterogênea	Homogênea	Homogênea/heterogênea	Homogênea	Homogênea	Homogênea/heterogênea	Homogênea
Cores da colônia	Ucre/amarela	Branca/creme	Ucre	Ucre	Ucre	Ucre	Ucre	Ucre	Ucre/amarela
Reação de pH	Neutro	Ácido/alcalino/neutro	Ácido	Ácido	Ácido	Neutro	Alcalino/neutro	Ácido/neutro	Ácido
Transparência	Irtransparente	Ucreo/transparente	Ucreo/transparente	Ucreo/transparente	Ucreo/transparente	Irtransparente	Ucreo/transparente	Ucreo/transparente	Ucreo/transparente
Hebra da colônia	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Presença de muc	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Unha apical	Muito pouco	Muito pouco	Muito pouco	Muito	Muito pouco	Muito	Muito pouco	Muito pouco	Pouco
Unha apical	Sim	Sim	Sim	Sim/neo	Neo	Neo	Sim/neo	Sim	Sim/neo
Haste do tubo muc	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim/neo	Neo

A N E X O 4



A



B



C



D



E

Desenvolvimento das plantas aos 7, 9 14 e 35 dias após germinação (respectivamente A, B, C e D) e os diferentes tratamentos de fontes de nitrogênio (E) em vasos de Leonard.

## ANEXO 5



A



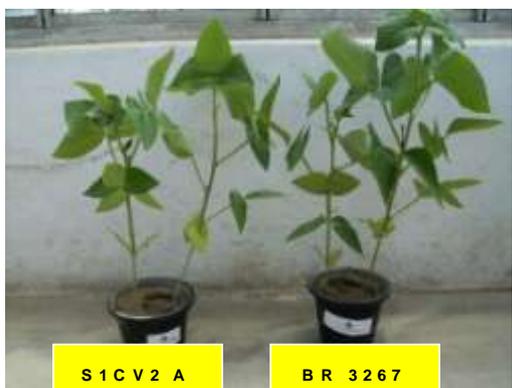
B



C



D



E



F

Desenvolvimento das plantas de feijão aos 12 dias após germinação (A); vista geral do experimento (B); plantas de feijão inoculadas com a estirpe recomendada NFB-700 e o isolado S1CV2 A (C); plantas de feijão inoculadas com o isolado S1CV2 A e sem nitrogênio mineral (D); plantas de feijão inoculadas com o isolado S1CV2 A e a estirpe recomendada BR 3267 (E); plantas de feijão inoculadas com os isolados S3CV2 A e S1CV2 A (F).