



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO
Área de Concentração Microbiologia do Solo**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ROSEMBERG DE VASCONCELOS BEZERRA

**BIODIVERSIDADE E EFETIVIDADE DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO
SEMI-ÁRIDO DE PERNAMBUCO EM CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp)**

**Recife - PE
2009**

Rosemberg de Vasconcelos Bezerra

**BIODIVERSIDADE E EFETIVIDADE DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO
SEMI-ÁRIDO DE PERNAMBUCO EM CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp)**

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

Orientador

Prof^o. Newton Pereira Stamford, Dr^o.

Co-orientadores

Prof^a. Carolina Etienne de R. S. Santos, Dr^a.

Prof^a. Lindete Miria Martins, Dr^a.

**RECIFE
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

B574b Bezerra, Rosemberg de Vasconcelos
Biodiversidade e efetividade de rizóbios nativos de solos
do semi-árido de Pernambuco em caupi (*Vigna unguiculata* L.
Walp) / Rosemberg de Vasconcelos Bezerra. -- 2009.
70 f. : il.

Orientador: Newton Pereira Stamford.
Dissertação (Mestrado em Agronomia / Ciência do Solo) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.

Referências.

1. *Vigna unguiculata* L. Walp
2. Feijão macassar
3. Fixação biológica de nitrogênio I. Stamford, Newton Pereira II. Título

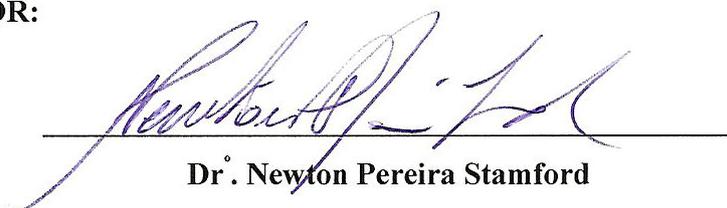
CDD 631.46

**BIODIVERSIDADE E EFETIVIDADE DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO
SEMI-ÁRIDO DE PERNAMBUCO EM CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp)**

ROSEMBERG DE VASCONCELOS BEZERRA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03 DE MARÇO DE 2009.

ORIENTADOR:



Dr. Newton Pereira Stamford

BANCA DE EXAMINADORES:



Dr. Everardo Valadares de Sá Barreto Sampaio
Departamento de Energia Nuclear (DEN/UFPE)



Dr.ª Ana Dolores Santiago de Freitas
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Dr.ª Maria de Fátima Vieira Santos
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”.

Louis Pasteur.

Aos meus pais, Pedro Alves Bezerra e Luzia de Vasconcelos Bezerra, meus exemplos de vida, e a razão por eu estar vivendo este momento, e meus irmãos Pedro Jr., Gutemberg e Daniel, “As pessoas mais iluminadas neste mundo”.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Jesus de Nazaré, que sempre me abriu janelas quando as portas se fechavam, por me mostrar a luz nos momentos difíceis da minha vida e por colocar no meu caminho pessoas especiais.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de realização do curso de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro.

Ao MCT/CNPq, DECIT/MS, Fundo Setorial de Biotecnologia (CT-BIOTECNOLOGIA) e Saúde (CT-SAÚDE) pelo financiamento do projeto no âmbito do Edital RENORBIO e pela concessão das bolsas de Iniciação Tecnológica e Industrial.

Aos meus estimados pais Pedro Alves Bezerra e Luzia de Vasconcelos Bezerra, pelos magníficos conselhos e apoio em meus projetos de vida.

Ao Amigo, Professor e Orientador, Prof^o. Newton Pereira Stanford, pela orientação decidida, pelos conselhos, nas horas certas, e pelo carinho. Em especial á Prof^a. Carolina Etienne Santos pela co-orientação, amizade, paciência e apoio incondicional em todos os momentos e por todo aprendizado de vida.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Microbiologia do Solo: Ana Dolores, Adriana, Elizabete, Fernando, Gleiciane e Iraci pelo enorme carinho e apoio prestado. Em especial ao meu grande e estimado amigo Antônio e amigas Fátima e Monaliza por estarem comigo em todos os momentos de minha vida.

A Camila, Márcia, Mariana e Tatiana, as pessoas que fizeram esse trabalho acontecer.

A todos dos laboratórios de Química do solo e Fertilidade do solo, pelo apoio e calorosa convivência.

Aos funcionários da PPGCS/UFRPE, Maria do Socorro, Eliane, Noca, Anacleto, Josué, pela atenção e ajuda indispensável.

A minha querida namorada e companheira Danielle, pela dedicação e compreensão nas minhas atividades do dia a dia.

Aos amigos do curso e companheiros, pela grande torcida e convívio que tornou esta etapa de minha vida muito mais alegre.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, tenham contribuído para realização deste trabalho.

“Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum, porque tu estás comigo (...).” (Salmo 23.4)

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO GERAL	5
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
O HOSPEDEIRO CAUPI	6
FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN).....	11
TAXONOMIA DE RIZÓBIO.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	15
CAPÍTULO I	20
DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE CAUPI (<i>VIGNA UNGUICULATA</i> (L) WALP), CULTIVADO EM SOLOS DO SEMI-ÁRIDO DE PERNAMBUCO	20
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAL E MÉTODOS	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPITULO II.....	37
TOLERÂNCIA DE RIZÓBIOS DE CAUPI A NÍVEIS CRESCENTES DE SÓDIO, PH E CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DO MEIO DE CULTURA.....	37
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO III	49
EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EM PLANTAS DE CAUPI (<i>VIGNA UNGUICULATA</i> (L) WALP), AVALIADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO	49
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS	51
<i>Seleção de Estirpes de Rizóbio de Alta Eficácia em Fixar N₂ em Plantas de Caupi em Condições Estéreis</i>	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

RESUMO

A região semi-árida, que se caracteriza por apresentar déficit hídrico, temperaturas elevadas e solos com problemas de salinidade, limitações estas, que afetam a produtividade da maioria das espécies cultivadas. O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) possui capacidade de se desenvolver satisfatoriamente nessas condições o que se deve a sua rusticidade, resistência a problemas de salinidade do solo, e também por ser capaz de se beneficiar da fixação biológica de nitrogênio, quando em associação com bactérias chamadas coletivamente de rizóbio. O presente trabalho tem como objetivo estimar a diversidade de grupos de rizóbios através de características morfofisiológicas de rizóbios de caupi, cultivado em solos do semi-árido nordestino; testar em faixas elevadas de pH e salinidade e selecionar os isolados que possam ser promissoras em fixar nitrogênio em caupi. De acordo com os resultados obtidos pode-se inferir que a retirada da vegetação nativa e monoculturas exercem importância fundamental na diminuição da diversidade de rizóbios capazes de nodular o feijão caupi, os fragmentos de área sem cobertura vegetal e com plantio de atriplex apresentaram os menores índices de diversidade para Margalef, menores graus de equitabilidade e baixa riqueza de espécies, com relação à área teste ocupada por vegetação hiperxerofila. As bactérias tiveram maior predisposição em suportar condições extremas de pH em relação à sodicidade e salinidade, e sodicidade foi mais prejudicial no desenvolvimento das bactérias. A estirpe NFB/REN-40 demonstrou um bom potencial para fixação biológica de N₂ na cultura do feijão-caupi.

Palavras chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, Feijão macassar, Fixação Biológica de Nitrogênio

ABSTRACT

The semiarid region is characterized to show hydric deficit, high temperature and soil with salinity problem that may affect productivity of many cultivated species. The cowpea legume (Vigna unguiculata L. Walp.), have capacity to develop satisfactorily in these conditions due to its rusticity, resistance to soil salinity and to be beneficiated by the process of biological nitrogen fixation, realized by bacteria in a general sense known as rhizobia. The present work aims to estimate the diversity of cowpea rhizobia isolated from semiarid soils, by morphological characteristics; test track at high pH and salinity and select the individual that may be promising to fix nitrogen in cowpea. Results showed that takeoff of native vegetation and the establishment of monoculture crop has fundamental importance on reduction of the diversity of the cowpea rhizobia bacteria. Areas without vegetation or cropped with atriplex present low diversity, evaluated by the Margalef index, and low grade of equitability and species richness. The bacteria were more predisposed to support extreme conditions of pH in relation to sodicity and salinity, and sodicity was more detrimental in the development of bacteria. The strain NFB/REN-40 has a good potential for biological fixation of N₂ in the culture of cowpea.

Index terms: Vigna unguiculata (L.) Walp, Feijão macassar, biological nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO GERAL

A salinização é um dos processos mais importantes entre os que atuam na redução da produtividade nas regiões semi-áridas, e a implantação de uma agricultura sustentável depende do controle da concentração de sais no perfil do solo. Mais de 4 milhões de hectares do semi-árido são afetados pela salinidade (Oliveira, 1997), e há potencialmente cerca de 9 milhões de hectares com riscos de salinização no nordeste do Brasil (Pereira *et al.*, 1985).

Estes solos também são afetados pela condição de faixas elevadas de pH, caracterizado por baixa precipitação pluviométrica, estiagens prolongadas, altas temperaturas, em consequência torna esses solos na maioria dos casos não agricultáveis. O feijão caupi ou feijão de corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), uma leguminosa com alto teor de proteínas no grão, representa um recurso importante por ser uma planta capaz de resistir às condições de déficit hídrico, e altas salinidades e temperaturas. Tradicionalmente, é uma cultura de subsistência, cultivada por pequenos e médios agricultores de base familiar, cujo excedente de produção é comercializado em feiras livres. No entanto, a cultura do feijão caupi tem avançado para áreas mais tecnificadas, utilizando práticas de correção, fertilização e irrigação, em rotação com outras culturas (Freire Filho *et al.*, 2005).

A seleção de estirpes de rizóbio adaptáveis ao estresse de salinidade, altas faixas de pH e temperatura elevada da região semi-árida amplia as chances de sucesso para a introdução e estabelecimento da associação com o feijão caupi, aumentando a produtividade de grãos. Para tanto, testes *in vitro* podem ser utilizados, pois, além de permitirem a comparação de um grande número de microrganismos, são rápidos e de custo relativamente baixo, possibilitando a identificação de estirpes tolerantes, antes da verificação de sua tolerância no campo (Nóbrega *et al.*, 2004).

Este trabalho teve como objetivos a obtenção de uma coleção de estirpes de rizóbio oriundos do semi-árido nordestino, a caracterização morfo-fisiológica dessas estirpes, a avaliação das suas tolerâncias a pH e salinidade elevadas e a avaliação de suas eficiências fixadoras de N₂.

REVISÃO DE LITERATURA

O Hospedeiro Caupi

Cultura do feijão caupi: O feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) foi introduzido no Brasil por volta do século XVI por colonizadores portugueses e espanhóis (Krutman *et al.*, 1968; Freire Filho *et al.*, 2000). Originário do continente africano (Steele & Mehra, 1980), é uma planta dicotiledonea, que pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolina, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Freire Filho *et al.*, 2005). O feijão caupi é conhecido também como: feijão-macáçar, feijão-macaça e feijão-de-corda no Nordeste; feijão-da-colônia, feijão-de-praia e feijão-de-estrada no Norte; feijão miúdo no Sul; feijão-catador e feijão-gurutuba em algumas regiões da Bahia e do Rio de Janeiro (Cavalcante & Atroch, 1995).

Importância sócio-econômica: A área ocupada com esta cultura, no mundo, está em torno de 12,5 milhões de ha, com 8 milhões (64% da área mundial) na parte oeste e central da África. A outra parte da área está localizada na América do Sul, América Central e Ásia, com pequenas áreas espalhadas pelo sudoeste da Europa, sudoeste dos Estados Unidos e na Oceania. Entre todos os países, os principais produtores mundiais são Nigéria, Niger e Brasil (Quin, 1997).

No Brasil, a área cultivada com feijão-caupi é de, aproximadamente, 1 milhão de hectares, dos quais cerca de 900 mil (90%) estão situados no Nordeste e Norte (Frota & Pereira, 2000). Estima-se que o Brasil contribua com 26% da produção mundial e 82% da produção do continente americano (Araújo e Watt, 1988).

A produtividade varia entre 280 kg/ha a 450 kg/ha, dependendo da região. Contudo, cultivares melhoradas vêm alcançando produtividades entre 1.000 e 1.200 kg há⁻¹ (Freire Filho *et al.*, 2005). É responsável pela geração de mais de 1 milhão empregos ano⁻¹ no Brasil, com o valor de produção estimado em aproximadamente US\$ 250 milhões ano⁻¹ (Embrapa, 2003).

Importância alimentar: O feijão caupi é um dos alimentos básicos do povo brasileiro, sendo uma importante fonte de proteína, e valor energético (Menezes, 2001). Desempenha importante papel na composição agrícola brasileira, sendo cultivado principalmente por pequenos produtores das Regiões Norte e Nordeste, onde se constitui num alimento básico de subsistência, principalmente, para a população de baixa renda (Araújo & Watt, 1988). Possui propriedades nutritivas superiores às do feijão comum. Contém alto teor protéico (23-25%, em média), além de todos os aminoácidos essenciais e apresenta excelente valor calórico (média de 62%). É rico em vitaminas e minerais, fibras dietéticas e possui baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2%, em média) (Cavalcante & Atroch, 1995; Freire Filho *et al.*, 2005).

Pelo seu valor nutritivo, o caupi é cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, para o consumo humano, in natura. Esta leguminosa também é utilizada como forragem verde, feno, ensilagem para alimentação animal e, ainda, como adubação verde e proteção do solo.

Ecofisiologia: Dentre os elementos do clima que exercem influência no crescimento e desenvolvimento do feijão destacam-se a precipitação, a temperatura, o fotoperíodo e a radiação solar. Quanto à precipitação, às lâminas para a obtenção da máxima produtividade de grãos, inúmeros trabalhos variam entre 370 a 570 mm (Azevedo & Miranda, 1996), entretanto, a limitação em termos hídricos está mais diretamente condicionada à distribuição do que à quantidade total de chuvas ocorridas no período. A ocorrência de ligeiros déficits hídricos no início do desenvolvimento da cultura pode estimular um maior desenvolvimento radicular das plantas, e antes do florescimento pode ocasionar severa retração do crescimento vegetativo, limitando a produção (Ellis *et al.* 1994; Dourado Neto & Fancelli, 2000).

A faixa ideal de temperatura para o bom desenvolvimento da cultura é de 18 a 34 °C. Temperaturas elevadas (> 34 °C) A ocorrência de temperaturas elevadas durante o florescimento pode restringir significativamente a produtividade do caupi (Bastos *et al.*, 2000). Temperaturas baixas (<18 °C) influenciam negativamente a produtividade, retardando o aparecimento de flores e aumentando o ciclo da cultura (Littleton *et al.* 1979; Leite *et al.* 1997).

Outro fator que exerce influência no crescimento e desenvolvimento do feijão caupi é o fotoperíodo. Segundo Steele & Mehra (1989), existem cultivares sensíveis e outras insensíveis ao fotoperíodo. As sensíveis são plantas de dias curtos, as quais têm o seu florescimento atrasado quando o fotoperíodo é maior que o fotoperíodo crítico (Hadley *et al.* 1983; Craufurd *et al.*, 1996a). Nas cultivares insensíveis ao fotoperíodo crítico, o crescimento e desenvolvimento da cultura são influenciados apenas pela temperatura (Craufurd *et al.*, 1996b).

A radiação solar é um fator de grande importância para o crescimento e desenvolvimento vegetal, pois influencia diretamente a fotossíntese. Loomis & Williams

(1963) comentaram que, sob condições favoráveis de solo e clima e quando pragas e doenças deixam de ser fatores limitantes, a máxima produtividade de uma cultura passa a depender principalmente da taxa de interceptação de luz e da assimilação de dióxido de carbono. De acordo com Phogat *et al.*, (1988), a interceptação da energia luminosa no caupi geralmente é alta, devido às folhas glabras e de coloração verde escura. Avaliando a taxa de fotossíntese líquida e a absorção da radiação fotossinteticamente ativa por esta cultura, observaram que apenas 4,3% da energia luminosa foi refletida pelas folhas de feijão, em condições ótimas de água no solo.

Fenologia: O desenvolvimento do feijoeiro compreende, basicamente, duas fases, diferenciadas pela manifestação de eventos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos. A fase vegetativa tem seu início caracterizado pelo completo desdobramento das folhas primárias, prosseguindo até o aparecimento dos primeiros botões florais (Dourado Neto & Francelli, 2000). Esta fase é favorecida por temperaturas moderadamente elevadas (> 21 e < 29 °C), adequada disponibilidade hídrica e abundante luminosidade. A fase reprodutiva transcorre desde a emissão dos primeiros botões florais até o ponto de maturidade fisiológica. Nesta fase, evidencia-se a sensibilidade à deficiência ou excesso de água no solo.

O desenvolvimento do feijoeiro é, inicialmente, muito lento, e só a partir do vigésimo dia é que a taxa de crescimento torna-se mais intensa, reduzindo-se depois até que o máximo desenvolvimento seja atingido, entre 55 e 70 dias. Após, começam a prevalecer os fenômenos de translocação, em substituição aos de crescimento (Oliveira & Thung, 1988).

Nutrição e adubação: De modo geral, no início do desenvolvimento do caupi a absorção diária de nutrientes é pequena, aumentando a partir do vigésimo dia e sendo mais intensa no intervalo de 20 a 30 dias, isto é, imediatamente antes do florescimento. Pode-se admitir que a disponibilidade dos nutrientes no solo, nos primeiros quinze dias de crescimento da cultura, tem pouca significância (Mafra *et al.* 1974; Moraes, 1988).

O nitrogênio é o nutriente absorvido em maior quantidade pelo caupi, extrai uma quantidade superior a 100 kg de N.ha⁻¹ (Haag *et al.* 1967), dos quais 1/3 são exportados da lavoura pelo grão e vagens (Malavolta & Lima Filho, 1997).

O componente de produção do feijoeiro mais afetado pela adubação nitrogenada é o número de vagens por planta (Calvache *et al.* 1995).

O caupi por ter boa capacidade nodulífera e eficiente sistema de fixação, dispensa, em muitos casos, a adubação nitrogenada.

O nível crítico teórico de fósforo no solo, para o bom desenvolvimento da planta, está em torno de 0,13 mg dm⁻³. Entre os macronutrientes, é o elemento extraído em menor quantidade e o que mais limita a produção do feijão caupi. Considerando as condições do solo e as propriedades do elemento no meio, as doses recomendadas encontram-se na faixa de 20 a 60 kg de P₂O₅ ha⁻¹.

O valor de potássio considerado crítico para o bom desenvolvimento do feijão caupi está abaixo de 50 mg kg⁻¹ de K₂O. Normalmente são recomendadas, no balanceamento de fórmulas de adubação, quantidades que variam de 20 a 40 kg de K₂O ha⁻¹ (Cardoso *et al.* 1998).

Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio é o nutriente que mais limita o desenvolvimento das plantas, principalmente nos solos poucos férteis das regiões tropicais. Paradoxalmente, o nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera e o quarto elemento mais abundante nas plantas, sendo superado apenas pelo carbono, oxigênio e hidrogênio. É o constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofila, entre outras moléculas.

A maior parte do N da natureza está na atmosfera sob a forma de gás, constituída por dois átomos de nitrogênio (N_2), que se encontram unidos de uma maneira muito estável, impossibilitando sua absorção e assimilação por organismos eucariontes (plantas e animais). Somente, algumas bactérias desenvolveram um complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformar o N_2 em amônia, subsequentemente assimilada em aminoácidos e proteínas (Neves & Rumjanek, 1998). Estes microrganismos são conhecidos como diazotróficos ou fixadores de nitrogênio.

A capacidade diazotrófica está restrita a Bacteria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (Moreira & Siqueira, 2006). A observação de uma árvore filogenética contendo espécies procarióticas mostra que os microrganismos diazotróficos ocorrem em um grande número de *taxa* e sua distribuição não obedece nenhum padrão lógico. Esta característica pode ser explicada por três hipóteses. A primeira é que a capacidade diazotrófica teve origens múltiplas. A segunda é que este caráter diazotrófico estava presente num ancestral comum a todas as espécies, mas foi perdido durante o processo evolutivo que deu origem a diferentes ramos filogenéticos. A terceira é que o potencial diazotrófico teve uma única origem, mas se estendeu à outros ramos filogenéticos por transferência lateral de plasmídeos (Moreira & Siqueira, 2006).

Descoberto há mais de 100 anos, a FBN inicia-se na comunicação entre os dois parceiros, mediada pela troca de sinais moleculares específicos. Antes do estabelecimento da simbiose, o rizóbio é quimiotaticamente atraído para a rizosfera por compostos (aminoácidos, AIA exudado ou açúcares) exsudados pela planta (Aguilar *et al.*, 1988; Kape *et al.*, 1991). A partir daí, ocorre uma interação química específica entre o rizóbio e a planta hospedeira, mediada pela produção de flavonóides (flavonas, flavanonas e isoflavonas) pelas raízes (Hungria, 1994). Muitas dessas associações sofreram especializações ao longo do processo evolutivo, resultando em relações muito estreitas entre a planta e a bactéria, inclusive promovendo a formação de estruturas especializadas (nódulos) que garantem proteção contra fatores adversos do solo também beneficiar-se de compostos ricos em carbono (Sprent & Faria, 1989).

Taxonomia de Rizóbio

Numerosos estudos, objetivando levantamento, isolamento e seleção de rizóbio com características de tolerância ao estresse, têm revelado um alto grau de diversidade nas populações de rizóbio do solo, principalmente nas regiões tropicais. A taxonomia das bactérias do grupo dos rizóbios engloba atualmente 12 gêneros, com 62 espécies. A lista de espécies de rizóbio cresce a cada dia e muitas espécies poderão vir a serem descritas, na medida em que aumenta o conhecimento sobre as leguminosas tropicais e de respectivos rizóbios (Weir, 2006).

A identificação de uma bactéria se inicia na caracterização fenotípica e genética dos isolados e posterior alocação deste isolado caracterizado a uma espécie conhecida, após a verificação de certo grau de similaridade.

A avaliação das características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas é o primeiro passo para a identificação de grupos taxonômicos de microrganismos, podendo prever uma boa aproximação em nível de gênero. Estes descritores podem indicar diferenças fisiológicas importantes entre microrganismos, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais refinados (Pelczar *et al.*, 1997).

Os gêneros de rizóbio descritos até o momento podem ser diferenciados com base em características culturais e morfológicas em meio YMA (Vincent, 1970). Segundo Martins *et al.* (1997), tempo de crescimento em meio de cultura YMA, reação ácida ou básica em meio de cultura, diâmetro de colônia, produção de exopolissacarídeos, são os principais parâmetros para diferenciar rizóbios. Com relação ao tempo de crescimento, os rizóbios de crescimento rápido formam colônias em até 3 dias de incubação e, lentas são visualizadas após 4 dias de incubação (Melloni *et al.*, 2006)

A alteração do pH do meio de cultura divide os isolados em três classes: estirpes que apresentam reação ácida, reação básica ou reação neutra em meio de cultura YMA com azul de bromotimol ajustados para pH 6,8. Rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar, modificando a cor para azul, enquanto os rizóbios de crescimento rápido tendem a acidificar o meio, alterando a cor para amarelo (Martins *et al.*, 1997). As mudanças de pH promovidas pelo rizóbio no meio de cultura são devido à utilização preferencial de açúcares pelas estirpes de crescimento rápido, seguida da excreção de ácidos orgânicos, e de compostos nitrogenados pelas estirpes de crescimento lento e conseqüente liberação de cátions. (Tan & Broughton, 1981).

O diâmetro da colônia é um parâmetro que apresenta correlação com outras características culturais. Colônias com diâmetro menor que 1 mm possuem superfície seca ou pouca produção de exopolissacarídeos, e colônias maiores tendem a produzir mais exopolissacarídeos (Martins *et al.*, 1997).

A produção de exopolissacarídeos, também denominada de muco, agrupam as bactérias em secas, quando não produzem muco, e butírica quando produzem muco. Estirpes de crescimento rápido tendem a produzir mais muco, ao contrário de rizóbios de crescimento lento que formam colônias secas com baixa produção de muco (Martins *et al.*, 1997).

Esses descritores fenotípicos têm como objetivo não somente a caracterização, mas verificar a provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais predominantes no ecossistema para o qual se procede a seleção do rizóbio. A capacidade de crescimento em diferentes pH, concentrações de sais, temperatura e antibiótico são utilizados na caracterização “*in vitro*” como também na correlação com condições ambientais (Swellim *et al.*, 1997; Sá *et al.*, 1993; Xavier *et al.*, 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilar, J. M. M.; Ashby, A. M.; Richards, A. J. M.; Loake, G. J.; Watson, M. D.; Shaw, C. H. (1988).** Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *Journal of General Microbiology*, Reading, v.134, p.2741-2746.
- Araújo, J. P. P.; Watt, E. E. (1988).** O Caupi no Brasil. Brasília: IITA, Embrapa. 722 p.
- Bastos, E. A.; Folegatti, M. V.; Andrade Júnior, A. S.; Cardoso, M. J.; Faria, R. T. (2000).** Manejo econômico da irrigação do feijão caupi via modelo de simulação. *Irriga*, v. 5, n.2, p.84-98.
- Calvache, M.; Reichardt, K.; Silva, J. C. A.; Portezan Filho, O. (1995).** Adubação nitrogenada do feijão sob estresse de água. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 25. Viçosa. Resumos expandidos... Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 2, p.649-651.
- Cardoso, M. J.; Melo, F. B.; Andrade Júnior, A. S.; Athayde Sobrinho, A.; Rodrigues, B. H. N. (1998).** Níveis de fósforo, densidades de plantas e eficiência de utilização da água em caupi de portes ramador e moita em areia quartzosa. In: Reunião Brasileira de Manejo e Conservação de Solo e Água, 12. Fortaleza. Resumos expandidos... Fortaleza: UFC, p.146.
- Cavalcante, E. S.; Atroch, A. L. (1995).** Cultivares de feijão Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) recomendadas para o Amapá. Amapa-MA. 3p. (Comunicado técnico, 10).
- Craufurd, P. Q.; Qi, A.; Ellis, R. H.; Summerfield, R. J.; Roberts, E. H. (1996b).** Development in cowpea (*Vigna unguiculata*). III. Effect of temperature and photoperiod on time to flowering in photoperiod-sensitive genotypes and screening for photothermal responses. *Experimental Agriculture*, v.32, p.29-40.
- Craufurd, P. Q.; Qi, A.; Ellis, R. H.; Summerfield, R. J.; Roberts, E. H. (1996a).** Development in cowpea (*Vigna unguiculata*). II. Effect of temperature and saturation deficit on time to flowering in photoperiod insensate genotypes. *Experimental Agriculture*, v.32, p.13-28.
- Dourado Neto, D., Fancelli, A. L. (2000).** Produção de feijão. Guaíba; Agropecuária, p.23-48.

- Ellis, R. H.; Lawer, R. J.; Summerfield, R. J.; Roberts, E. H.; Chay, P. M.; Brouwer, J. B.; Rose, J. L.; Yeates, S. J. (1994).** Towards the reliable prediction on time to flowering in six annual crops. III. Cowpea (*Vigna unguiculata*). *Experimental Agriculture*, v.30, p.17-29.
- Embrapa (2003).** Sistemas de Produção 2, ISSN 1678-8818 Versão Eletrônica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>.
- Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. A. & Ribeiro, V. Q. (Org.). (2005).** Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 519 p.
- Freire Filho, F. R.; Ribeiro, V. Q.; Santos, A. A. (2000).** Cultivares de caupi para a região Meio-Norte do Brasil. In: Cardoso, M. J. (Org.). A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil Teresina: Embrapa Meio-Norte. 264pp. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28).
- Haag, H. P.; Malavolta, E.; Gargantine, H.; Blanco, H. G. (1967).** Absorção de nutrientes pela cultura do feijoeiro. *Bragantia*, v. 26, n. 30, p.380-391.
- Hadley, P.; Roberts, E. H.; Summerfield, R. J. (1983).** A quantitative model of reproductive development (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in relation to photoperiod and temperature, and implications for screening germoplasm. *Annals of Botany*, v.51, p.531-543.
- Hungria, M. (1994).** Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.18, p.339-364.
- Kape, R.; Parniske, M.; Werner, D. (1991).** Chemotaxis and nod gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.58, p.1705-1710.
- Krutman, S.; Vital, A. F. & Bastos, E. G. (1968).** Variedades de feijão macassar *Vigna sinensis* L. Recife, IPEANE. 46p.
- Leite, M. L.; Rodrigues, J. D.; Virgens Filho, J. S. (1997).** Avaliação de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) quanto à produtividade e componentes de produtividade, sob condições de estufa plástica. *Revista de Agricultura*, v.72, n.3, p.375-385.

- Littleton, E. J.; Dennet, M. D.; Monteith, J. L.; Elston, J. (1979).** The growth and development of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) under tropical field conditions. 2. Accumulation and partition of dry weight. *Journal of Agricultural Science*, v.93, p.309-320.
- Loomis, R. S.; Williams, W. A. (1963).** Maximum crop productivity: an estimate. *Crop Science*, v.3, p.67-72.
- Mafra, R. C.; Vieira, C.; Braga, J. M.; Siqueira, C. Brandes, D. (1974).** Efeito da população de plantas e da época de semeadura no crescimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). IV. Absorção de nutrientes. *Experientiae*, v.17, n.9, p.217- 239.
- Malavolta, E.; Lima Filho, O. F. (1997).** Nutrição e adubação do feijoeiro. In: Fancelli, A. L.; Dourado Neto, D. (Eds.). *Tecnologia da produção do feijão irrigado*. Piracicaba: Esalq, p.22-51.
- Martins, L. M. V. (1997).** Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "Rizóbio". *Comunicado Técnico: Embrapa*, n.19, 14p.
- Melloni, R. (2006).** Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, n.30, p.235-246.
- Menezes, J. R. (2001).** Manejo da cultura de feijão: enfoque sistêmico. In: *Simpósio da Cultura do Feijão Irrigado*. Piracicaba. Anais... Piracicaba: Esalq, Departamento de Produção Vegetal, p.35-42.
- Mercante, F. M.; Cunha, C. O.; Ribeiro Júnior, W. Q.; Vanderleyden, J.; Franco, A. A. (1996).** Use of *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains indigenous from Brazilian "Cerrado" region. In: *International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics; - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts*. Seropédica, Embrapa-CNPAB, 1995. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, p.162-163.
- Miranda, P.; Costa, A. F.; Oliveira, L. R.; Tavares J. A.; Pimentel, M. L.; Lins, G. M. L. (1992).** Comportamento de cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. nos sistemas solteiro e consorciado. I-Tipo ramador. *Ciência Agrônômica*, Fortaleza, v.23, n.1/2. p.9-19.

- Moraes, J. F. V. (1988).** Calagem e adubação. In: Zimmermann, M. J. O.; Rocha, M.; Yamada, T. Cultura do feijoeiro: Fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, p.261-301.
- Moreira, F. M. M.; Siqueira, J. O. (2006).** Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Editora da UFLA, 726p.
- Neves, M. C. P.; Rumjanek, G. (1998).** Ecologia de bactérias diazotróficas de solos tropicais. In: Ecologia Microbiana. Eds. Melo, I. S.; Azevedo, J. L., Jaguariúna, Embrapa-CNPMA. p.15-60.
- Nóbrega, R. S. A.; Motta, J. S.; Lacerda, A. M.; Moreira, F. M. S. (2004).** Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade in vitro. Ciência Agrotec., Lavras, v.28, n.4, p.899-905.
- Oliveira, I. P.; Thung, M. D. T. (1988).** Nutrição mineral. In: Zimmermann, M. J. O.; Rocha, M.; Yamada, T. Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, p.175-212.
- Oliveira, O. (1997).** Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. In: Simpósio Manejo e Controle da Salinidade na Agricultura Irrigada. Campina Grande. UFPB.
- Pelczar Jr. M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. (1997).** Microbiologia: conceitos e aplicações. 2ed. Rio de Janeiro: Makron Books do Brasil.
- Pereira, J. R.; Valdivieso, C. R.; Cordeiro, G. C. (1985).** Recuperação de solos afetados por sódio através do uso do gesso. In: Seminário Sobre o Uso de Fosfogesso na Agricultura, Brasília, p.85-105.
- Phogat, B. S.; Singh, D. P.; Singh, P. (1988).** Responses of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) and Mung Bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) to irrigation. II. Effects on CO₂ exchange, radiation characteristics and growth. Irrigation Science, v.5, p.61-72, 1984.
- Quin, F. M. (1997).** Introduction. In: Sing, B. B.; Mohan Raj, D. R.; Dashiell, K. E.; Jackai, L. E. N. (Eds.). Advances in cowpea research. Ibadan: IITA-JIRCAS, p.9-15.
- Sá, N. M. H. (1993).** Selection and characterization of *Rhizobium* spp strains stable and capable in fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista de Microbiologia, v.24, n.1, p.28-48.

- Sprent, J.; Faria, S. M. (1989).** Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. In: Skinner, F. A.; Boddey, R. M.; Fendrick, K. L. ed. Nitrogen fixation with nonlegumes. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p.3-11.
- Steele, W. M.; Mehra, K. L. (1989).** Structure, evolution, and adaptation to farming systems and environments in *Vigna*. In: Summerfield, R. J.; Bunting, A. H. (Eds.). Advances in legume science. Plant and Soil, Dordrecht, v. 114, p. 235-241.
- Swelim, D. M. (1997).** Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. Biology and Fertility of Soils, v.25, n.3, p.224-232.
- Tan, I. K. P.; Broughton, W. J. (1981).** Rhizobia in tropical legumes. XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. Soil Biology and Biochemistry, v.13, p.389-393.
- Vincent, J. M. (1970).** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell. 164p.
- Weir, B. S. (2006).** The current taxonomy of rhizobia. Disponivel em: www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html.
- Xavier, G. R.; L. M. V.; Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. (1998).** Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. Biology and Fertility of Soils, v.27, n.4, p.386-392.

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS DE CAUPI (*Vigna unguiculata* L. WALP), CULTIVADO EM SOLOS DA REGIÃO SEMI-ÁRIDA

INTRODUÇÃO

A diversidade da comunidade microbiana do solo é um indicador determinante do estado de conservação do ecossistema. No entanto, suas avaliações são complexas, dificultando a obtenção de indicadores capazes de alertar para estágios de degradação do solo que comprometam a produção agrícola. Para Odum (1988) essa biodiversidade é responsável pela estabilidade e resiliência do ecossistema, haja vista estar ligada, direta ou indiretamente, a processos de formação do solo, ciclagem e armazenamento de nutrientes.

Apesar de sua grande importância ecológica, o número de espécies de microrganismos conhecidos (riqueza de espécies), representado pelos organismos cultivados descritos na literatura, representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (entre <0,1 e 1%, dependendo do habitat), estimada pela análise direta com métodos moleculares (MMA, 2003).

Estima-se, que a diversidade global de microrganismos exceda, em algumas ordens de magnitude, a diversidade de plantas e animais. Levantamentos da década de 90 avaliaram que apenas 5% da diversidade de fungos é atualmente conhecida, com aproximadamente 69.000 espécies descritas. Para procariotos, incluindo bactérias e arqueas, eram conhecidas aproximadamente 4.300 espécies, alocadas em 849 gêneros, correspondendo a 0,1 a 12% das espécies do grupo. Protozoários e vírus apresentam cerca

de 30.800 e 5.000 espécies descritas, correspondendo a 31% e 4% do número de espécies estimado, respectivamente (MMA, 2003).

Kennedy & Smith (1995) relataram que pouco se conhece sobre o efeito do estresse ambiental sobre os microrganismos do solo, que pode ser bem diferente, tanto espacial quanto temporalmente ao efeito produzido sobre plantas e animais. Essas diferenças devem ser bem definidas para que se possam formular hipóteses e fazer interpretações corretas sobre os fatores que determinam a diversidade dos microrganismos do solo (Coutinho *et al.*, 1999; Rosado *et al.*, 2000).

A avaliação das características culturais e morfológicas de rizóbio é o primeiro passo para a identificação de grupos taxonômicos de microrganismos, prevendo uma boa aproximação em nível de gênero. Estes descritores podem indicar diferenças fisiológicas importantes entre microrganismos, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais refinados (Pelczar *et al.*, 1997).

O conceito de diversidade de espécie refere-se à variedade de espécies de organismos vivos de uma determinada comunidade, habitat ou região, podendo ser avaliado por meio de componentes como: (1) riqueza das espécies, baseada na abundância numérica de uma determinada área geográfica, região ou comunidade; (2) equitabilidade ou uniformidade, baseada no padrão de distribuição de indivíduos entre as espécies, sendo proporcional a diversidade, exceto se houver co-dominância de espécie, e (3) grau de dominância, que se refere à dominância de uma ou mais espécies numa determinada comunidade, habitat ou região (Odum, 1988).

Essa diversidade pode ser medida por intermédio de índices matemáticos, que levam em consideração informações relacionadas à avaliação das características culturais do rizóbio. Alguns índices, como os de diversidade de Shannon-Weaver (1948) e de Simpson (1949), de riqueza, de Margalef (1958) e Menhinik (1964), e de equitabilidade, de

Hill (1973), fornecem informações importantes acerca do padrão da distribuição de espécies microbianas dentro do ecossistema (Kennedy, 1999).

É importante lembrar que o índice é um simples valor. É possível encontrar duas comunidades que possuam índice de diversidade semelhantes, entretanto uma ter valor de uniformidade alto e baixo valor de riqueza, enquanto a outra possui uniformidade baixa e riqueza alta. Ambas, uniformidade e riqueza precisam ser consideradas na avaliação da diversidade (Kennedy, 1999). O uso de índices que combinam riqueza de espécie e abundância relativa são os mais usados.

Esses índices são ferramentas poderosas para o estudo da diversidade microbiana, permitindo uma avaliação da dinâmica da comunidade frente a diferentes manejos. Neste sentido, a diversidade tem sido citada como um indicador adequado para avaliar a qualidade do solo e a conservação de um ecossistema (Ovreas e Torsvik, 1998).

Este estudo teve como objetivo estimar a diversidade de grupos de rizóbios através de características morfofisiológicas a partir do isolamento dos rizóbios de nódulos de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cultivado em solos do semi-árido nordestino, também obter-se uma coleção de rizóbios nativos capazes de nodular o feijão caupi.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Caracterização dos Solos: Foram coletadas 4 amostras compostas de solos em 2 regiões fisiográficas do Semi-árido de Pernambuco: três no assentamento Nossa Senhora do Rosário, distrito de Rosário, Pesqueira (08°21'42''S e 36°41'41''O) apresentando diferentes coberturas vegetal, sendo, sem cobertura vegetal - ocasionado pelo caráter sódico desse solo (Área 1); área experimental sob plantio de atriplex (Área 2); e sob cultivo de feijão caupi (Área 3), uma quarta amostra foi coletada no município de Serra Talhada (07°59'31''S e 38°17'54''O), na Unidade Acadêmica de Serra Talhada – UAST/UFRPE, nesta área, com base na interação entre a vegetação e o solo a região pôde ser classificada em domínio de vegetação hiperxerófila (Figura 1: A-E).



Figura 1. Coleta dos solos, nos municípios de Pesquiera e Serra Talhada, Pernambuco.

Os solos foram coletados da camada arável (0-20 cm), secos ao ar, destorroados e passados em peneira de 2 mm de malha e analisados quanto as suas caracterísitcas químicas e físicas (Tabela 1), seguindo a metodologia recomendada pela Embrapa (1997).

Foram preparadas pastas saturadas seguindo-se a metodologia descrita por Richards (1954), e nelas determinaram-se: a condutividade elétrica (CE); o pH; o cálcio e o magnésio, por espectrofotometria de absorção atômica e o sódio e o potássio por fotometria de chama (Embrapa 1997). Utilizando-se os valores obtidos para cálcio, magnésio, sódio e potássio solúveis, quantificaram-se os valores para a relação de adsorção de sódio (RAS) e o percentual de sódio trocável (PST) usando-se as expressões:

$$1) \text{ RAS} = (\text{Na}^+)/[(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})/2]^{1/2}$$

$$2) \text{ PST} = [(\text{Na}^+)/(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+ + \text{K}^+)]*100$$

A classificação dos solos quanto a CE, RAS e PST encontra-se na Tabela 2.

Tabela 1. Características químicas e físicas na camada de 0-20 cm, dos solos de Pesqueira sem cobertura vegetal (Área 1), sob plantio de atriplex (Área 2), sob plantio de feijão caupi (Área 3); e Serra Talhada sob vegetação hiperxerofila (Área 4).

Atributo	Áreas de Estudo			
	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4
pH em H ₂ O (1,0:2,5)	8,1	7,7	5,4	6,6
¹ Ca ⁺² (mmol _c L ⁻¹)	2,55	1,28	0,85	1,82
¹ Mg ⁺² (mmol _c L ⁻¹)	2,65	27	0,63	1,71
¹ K ⁺ (mmol _c L ⁻¹)	0,007	0,032	0,006	0,013
¹ Na ⁺ (mmol _c L ⁻¹)	0,313	3,065	0,016	0,003
² P (mg.dm ⁻³)	20	102	68	503
Mat. org. (g kg ⁻¹)	0,054	0,056	0,027	0,033
Dens. solo (kg dm ⁻³)	-	1,42	1,62	1,47
Dens. part. (kg dm ⁻³)	2,60	2,60	2,63	2,60
Porosidade total (%)	-	45	38	43
Areia (g kg ⁻¹)	450	540	770	760
Argila (g kg ⁻¹)	540	150	100	110
Silte (g kg ⁻¹)	10	310	130	130
Classe textural	Argilo-arenoso	Franco-arenoso	Arenoso	Arenoso

¹CS (cátion solúveis); ²Extração por Mehlich-1.

Tabela 2. Classificação dos solos da região Semi-árida de Pernambuco, utilizados no experimento, de acordo com os limites estabelecidos por Richards (1969).

	RAS¹	PST² (%)	CE³ (dS.m ⁻¹ 25° C)	CLASSIFICAÇÃO DO SOLO
Área 1	19	7,5	2,8	Sódico
Área 2	67	11	20,5	Salino-sódico
Área 3	1	<1	0,4	Normal
Área 4	<1	*	0,4	Normal

¹ CE = condutividade elétrica da pasta de saturação

² PST = Percentual de Sódio Trocável

³ RAS = Relação de Adsorção de Sódio

Cultivo das plantas iscas: Sementes de caupi foram desinfetadas com álcool etílico a 70% por 30 segundos e com hipoclorito de sódio a 1%, por 1 minuto. Em seguida foram lavadas com água destilada três vezes por 30 segundos, mais uma vez de 5 minutos e por fim uma lavagem de 10 minutos. Foram plantadas quatro sementes por vaso contendo porções de 2kg de solo. Aos 45 dias as plantas foram colhidas, a parte aérea foi separada das raízes. Todos os nódulos foram coletados, colocados em tubos de ensaio contendo sílica gel para desidratação e preservados até o momento do isolamento do rizóbio.

Isolamento do rizóbio formador de nódulo: O isolamento foi realizado no Núcleo de Fixação Biológica do N₂ nos Trópicos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (NFBNT/UFRPE). Os nódulos foram 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 1%, por 2 minutos, para desinfecção superficial, sendo em seguida, lavados, por 5 vezes, com água destilada e esterilizada (ADE), para retirar o excesso de hipoclorito. Em seguida, foram levemente pressionados com uma pinça sobre uma placa de Petri, contendo o meio YMA (extrato de levedura, manitol e ágar), com vermelho do Congo, conforme descrito por Fred e Waksman (1928). Após o isolamento, as placas foram incubadas a 28° C, por

uma a duas semanas, até o aparecimento e desenvolvimento das colônias. As colônias isoladas características de rizóbio foram purificadas e armazenadas em tubos contendo meio YMA sem corante, para posterior caracterização morfofisiológica. As mesmas estirpes foram repicadas em meio TY (Somasegaran & Hoben; 1994) contendo 15% de glicerol, para conservação em freezer, a -4 °C (Embrapa, 1994).

Caracterização morfofisiológica: A caracterização dos isolados foi realizada de acordo com Vincent (1970), sendo observado em cada um dos isolados características das colônias com relação a: 1) tempo necessário 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, os alcalinizantes tornam o meio verde azulado e os neutros não modificam a coloração do meio de cultura.); 3) Tamanho da colônia; 4) Forma da colônia (circular ou irregular), 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 ou rósea); 9) elevação da colônia; 10) quantidade de muco produzido pelas células (pouca ou média e muita), 11) faixa de alça (observada pela faixa formada pela alça de platina no muco); 12) elasticidade do muco (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).

Agrupamento dos dados: Após a caracterização morfofisiológica os dados foram codificados utilizando o programa NtsysPC versão 2.0 (Rohlf, 1997). Para o agrupamento que só aceita informações binárias, os resultados foram codificados de acordo com a (Tabela 3), utilizando distância taxonômica entre as espécies, analisadas pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average) e a matriz de similaridade

de Jaccard. Uma vez construída a matriz obteve-se a árvore filogenética com a finalidade de separar os grupos de isolados com maiores similaridades.

Tabela 3: Valores relativos às características culturais dos isolados utilizados na construção do dendrograma de similaridade.

CARACTERÍSTICAS	CÓDIGO CORRESPONDENTE	
Tempo de crescimento (dias)	1 a 3 0	Acima de 4 1
Borda da colônia	Regular 0	Irregular 1
Tamanho da colônia (mm)	Puntiforme 0	> 1 mm 1
pH do meio	Ácido 0	Neutro a alcalino 1
Elevação	Sim 1	Não 0
Transparência	Translúcida 0	Opaca 1
Quantidade do muco	Pouco 0	Muito 1
Aparência do muco (limpa)	Sim 1	Não 0
Elasticidade do muco	Sim 1	Não 0

Uma vez agrupados foram calculados os índices de diversidades dos isolados através do Software para estimativa da diversidade e riqueza de espécies, DivEs v2.0 (Rodrigues, 2007). Foram calculados os índices de:

Diversidade de Shanon-Wiener (1948)

$$H' = - \sum p_i \text{Log } p_i$$

Onde: p_i é a proporção da espécie em relação ao número total de espécimes (isolados) encontrados nos levantamentos realizados.

Diversidade de Margalef (1958)

$$\alpha = \frac{s - 1}{\text{Log } N}$$

Onde: s é o número de espécies amostradas; N é o número total de indivíduos em todas as espécies. O índice de Margalef é muito próximo dos índices de Gleason e Menhinick.

Diversidade e Dominância de Simpson (1949)

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

Já a diversidade é dada pela equação:

$$D_s = 1 - l_s$$

Onde: ni é o número de indivíduos de cada espécie; N é o número total de indivíduos.

Equitabilidade de Hill (1973)

$$E = \frac{(1/D_s - 1)}{e^{H'} - 1}$$

Riqueza de Espécies Jackknife 1ª Ordem (Heltsh & Forrester, 1983)

$$E_D = S_{\text{obs}} + s_1 \left(\frac{f-1}{f} \right)$$

Onde: Sobs= número de espécies observadas; s1 = o número de espécie que está presente em somente um agrupamento (espécie de um agrupamento) e f = o número de agrupamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos e caracterizados 290 isolados da região Semi-árida de Pernambuco. Analisando a árvore gerada pelos dados fenotípicos das colônias (Figura 4), observou-se que a distância entre isolados variou de 26% a 100%, obtendo-se 19 grupos avaliados a 75% de similaridade.

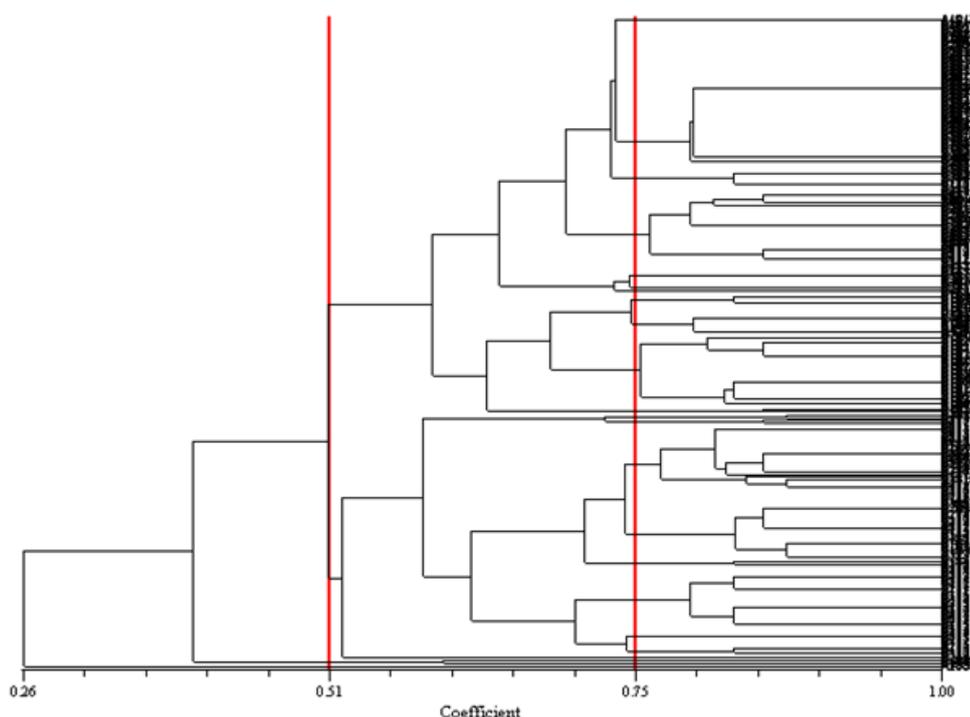


Figura 2: Ilustração do dendrograma de similaridade baseada nas características morfofisiológicas dos isolados de rizóbio provenientes das áreas de estudo.

A figura 3 mostra que a retirada da vegetação nativa (hiperxerófila) diminuiu a diversidade de rizóbios capazes de nodular o feijão caupi, verificado principalmente pelo índice Margalef. Essa redução foi observada até mesmo calculando a área plantada com esse feijão em relação à área com vegetação nativa, mostrando uma tendência de a planta selecionar o rizóbio e monoculturas sempre limitam e restringem a diversidade dessas bactérias.

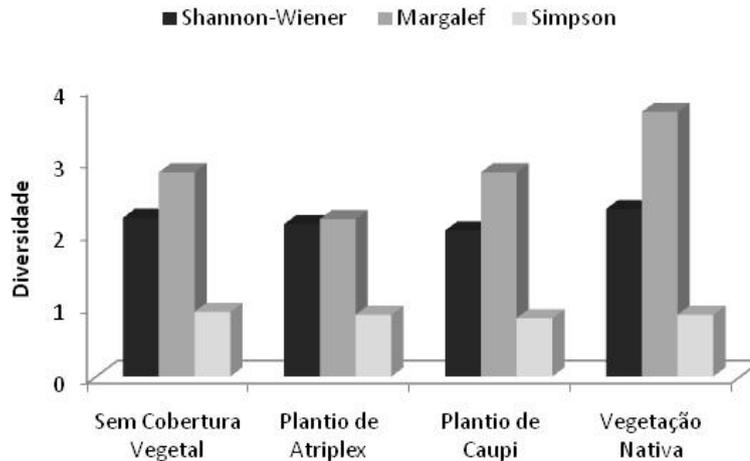


Figura 3: Índices de diversidade de Shannon-Wiener, Margalef e Simpson relacionados a solos com diferentes tipos de cobertura vegetal.

De forma geral, o índice de Simpson não se mostrou eficaz na medição da diversidade deste estudo. Staddon *et al.* (1997), em um trabalho sobre diversidade microbiana, verificaram que os índices de Shannon, Simpson e McIntosh embora possam apresentar uma tendência similar na medição da diversidade, diferem em sua habilidade de resolver, estatisticamente, diferenças significativas, sendo cada índice influenciado, por suas características, em diferentes caminhos. O de Simpson considera a abundância das espécies mais comuns, enquanto o de Shannon é influenciado mais pela riqueza de espécies (Magurran, 1988).

Resultados semelhantes ao presente trabalho foram encontrados por Bezerra *et al.* (2005), trabalhando com amendoim em solos da Zona da Mata de Pernambuco com diferentes manejos agrícolas. Verificaram que existia maior diversidade de espécies, medida pelo índice de Shannon-Wiener, e maior número de espécies por grupo em solos de área de mata nativa. Observaram ainda, que o índice de dominância de Simpson foi menor na mata nativa, que em áreas onde era cultivada cana-de-açúcar e que estava em pousio, que possuíam baixa riqueza de rizóbios capazes de nodular o amendoim.

A Figura 4 apresenta tendência similar para os índices de dominância calculados, os resultados foram mais expressivos na área cultivada com feijão. Esse resultado já era esperado, uma vez que o feijão caupí pode favorecer um grupo de rizóbios restrito e específico capaz de nodulá-lo.

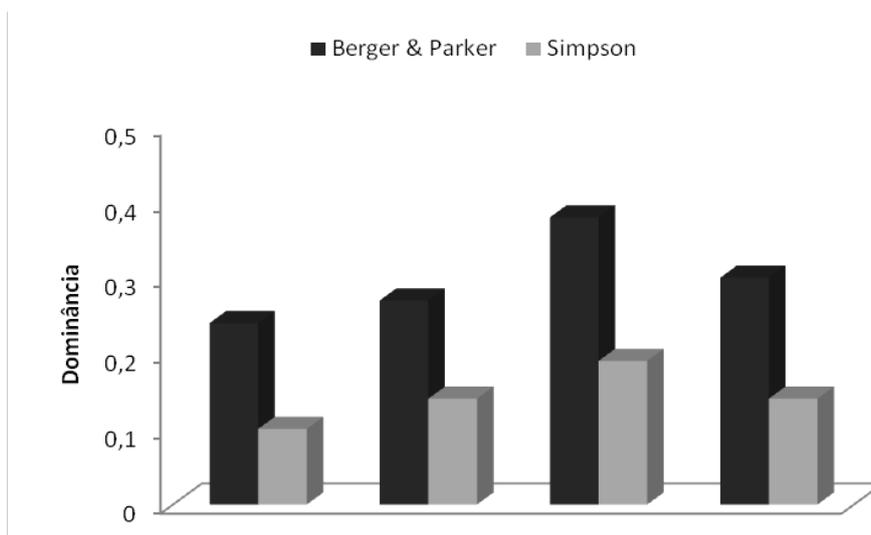


Figura 4: Dominância de Berger & Parker e Simpson relacionados a solos com diferentes tipos de cobertura vegetal.

Segundo Berger & Parker (1970) e Simpson (1949) a dominância reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie, para esses autores, quanto mais alto for o resultado, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade. Verificou-se ainda, que essa dominância foi inversamente proporcional a equitabilidade. Santos (2001), relata que quanto menor a dominância, maior a equitabilidade de espécies de uma comunidade, mais estável o mesmo e maior resistência aos impactos ambientais que possa vir a sofrer.

Observa-se que os fragmentos de área sem cobertura vegetal e com plantio de atriplex apresentaram as maiores equitabilidades, esses resultados mostram também que esses índices foram inversamente proporcionais a riqueza de espécies (Figuras 5 e 6). Para Magurran (1988), a equitabilidade representa a situação hipotética em que todas as

espécies encontram-se com a mesma proporção na comunidade estudada. Em ambientes com limitações, como a região semi-árida, é preferível o uso de leguminosas com capacidade de formar simbiose com uma quantidade maior de grupos de rizóbios e assim ampliar a possibilidade dos benefícios da fixação simbiótica do N₂.

De acordo com os dados, o maior índice de riqueza ocorreu no fragmento de área ocupado por vegetação nativa (hiperxerófila), onde também foi encontrado o maior índice de diversidade (Figuras 6), sugerindo que a retirada da vegetação exerce importância fundamental na diminuição da diversidade de rizóbios capazes de nodular o feijão caupi.

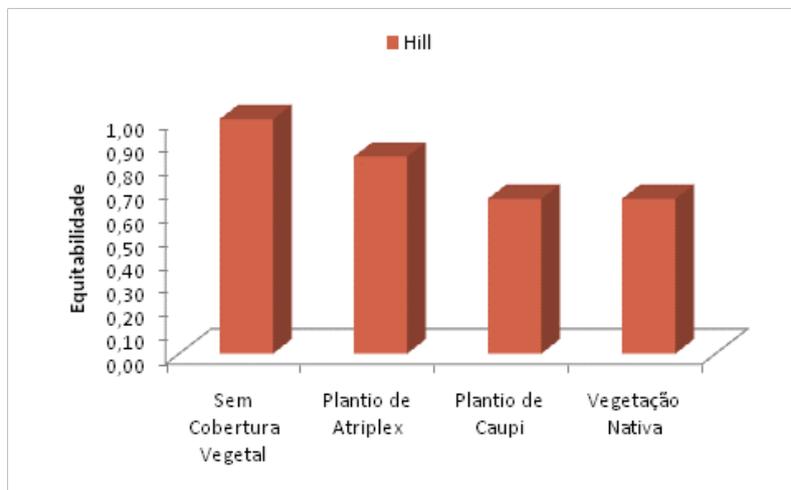


Figura 5: Equitabilidade de Hill relacionadas a solos com diferentes tipos de cobertura vegetal.

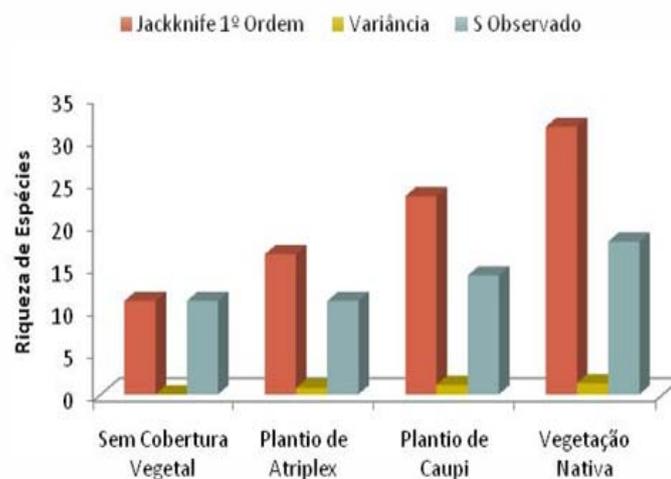


Figura 6: Riqueza de espécies de Jackknife 1º Ordem relacionadas a solos com diferentes tipos de cobertura vegetal.

CONCLUSÕES

- O índice de diversidade de Simpson não se mostrou eficaz na medição da diversidade deste estudo;
- A retirada da vegetação nativa e monoculturas exercem importância fundamental na diminuição da diversidade de rizóbios capazes de nodular o feijão caupi;
- Os fragmentos de área sem cobertura vegetal e com plantio de atriplex apresentaram os menores índices de diversidade para Margalef, menores graus de equitabilidade e baixa riqueza de espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berger, W.H. & Parker, F.L. (1970).** Diversity of planktonic foraminifera in deep-Sea sediments. *Science*, 168. 1345-1347.
- Bezerra, R. V.; Santos, C. E. R. S.; Stamford, N. P.; Freitas, A. D. S.; Vieira, I. M. M. B.; Lyra, M. C. C. P. (2005).** Diversidade morfofisiológica de rizóbios isolados de amendoim, cultivado em solos da Zona da Mata de Pernambuco. XXX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo – Solos Sustentabilidade e Qualidade Ambiental. CD-ROM. Recife - PE, 17 à 22 julho.
- Coutinho, H. L. C.; Oliveira, V. M.; Manfio, G. P. & Rosado, A. S. (1999).** Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. *Anais Academia Brasileira de Ciências* 71: 491-503.
- Embrapa. (1994).** Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Araujo, R. S.; Hungria, M. Eds. Brasília. Embrapa-SPI. 542p.
- Embrapa. (1997).** Manual de Métodos de análises de solo. 2 ed. Rio de Janeiro, 212p.
- Fred, E.B. & Waksman, S.A. (1928).** Laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw-Hill Book Company, 143p.
- Heltshe, J. F.; Forrester, N. E. (1983).** Estimating species richness using the Jackknife procedure. *Biometrics* 39:1-11.
- Hill, M. O. (1973).** Diversity and Evenness: a Unifying Notation and its Consequences. *Ecology* 54: 427-432.
- Kennedy, A. C. & Smith, K. L. (1996).** Soil microbial diversity and the sustainability of agricultura soils. *Plant and Soil*,170: 75-76.
- Kennedy, A. C. (1999).** Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76.
- Magurran, A. E. (1988).** Ecological diversity and its measurement. Magurran, A. E., eds. 177 p.
- Margalef, R. (1958).** Information theory in ecology. *Gen. Systems*. 3: 36-71.

- Menhinick, E. F. (1964).** A comparison of some species individuals diversity indices applied to samples of field insects. *Ecology*, 45: 859-861.
- MMA-COBIO-GTB/CNPq-NEPAM/UNICAMP. (2003).** Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil. 80p.
- Odum, E. P. (1988).** Populações em comunidades. In: Odum, E.P., eds, *Ecologia*. São Paulo: Guanabara Koogan, p.258-272.
- Ovreas, L.; Torsvik, V. (1998).** Microbial diversity and community in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*, v.36, p.303-315.
- Pelczar, Jr.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. (1997).** 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. p.306-336.
- Richards, L. A. (1954).** Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Washington: USDA. 160p. (USDA Agricultural Handbook, 60).
- Richards, L. A. (1969).** Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Washington: USDA. 160p (USDA. Agriculture handbook, 60).
- Rodrigues, W.C. (2007).** DivEs - Diversidade de Espécies - Guia do Usuário. Seropédica: Entomologistas do Brasil. 9p. Disponível em: <http://www.ebras.bio.br/dives/>.
- Rohlf, F. J. (1997).** NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analyses system. Version 2.0. New York: Exeter Publications.
- Rosado, A. S. (2000).** XXIV Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. VIII Reunião Brasileira Sobre Micorrizas. VI Simpósio Brasileiro de microbiologia do solo. III Reunião Brasileira de Biologia do solo. Biodinâmica do Solo. Fertbio CD-ROM Palestra... Santa Maria.
- Santos, C. E. R. S. (2001).** Diversidade de rizóbio nativo da região Nordeste do Brasil capaz de nodular amendoim (*Arachis hypogaea*), *Stylosanthes* e *Aeschynomene*. 2001. 178f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- Shanon, C. E. (1948).** A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Techn. J.* 27: 379-423, 623-656.

Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.

Somasegaran, P.; Hoben, H. J. (1994). Handbook for Rhizobia - methods in legume - Rhizobium technology. New York. Springer-Verlag, p.336-337.

Staddon, W. J.; Duchesne, L. C.; Trevors, J. T. (1997). Microbial diversity and community structure of postdisturbance forest soils as determined by olecarbon-source utilization patterns. *Microbial Ecology*, v.34, p.125-130.

Vincent, J. M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Scientific Publications Oxford: Blackwell Scientific, 164p.

CAPITULO II

TOLERÂNCIA DE RIZÓBIOS DE CAUPI A NÍVEIS DE SÓDIO, pH E CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DO MEIO DE CULTURA

INTRODUÇÃO

A salinização do solo constitui uma das mais sérias formas de degradação dos recursos edáficos e, em áreas secas, caracteriza-se como um fenômeno complexo causado pela interação entre fatores biofísicos e sócio-econômicos. No Brasil, esses efeitos são mais intensos na região semi-árida do Nordeste, em virtude das características de clima, relevo e geologia, serem favoráveis à ocorrência de solos afetados por excesso de sais (Mota & Oliveira, 1999).

A salinização é um dos processos mais importantes entre os que atuam na redução da produtividade nas regiões semi-áridas, e a implantação de uma agricultura sustentável depende do controle da concentração de sais no perfil do solo. Mais de 4 milhões de hectares do semi-árido são afetados pela salinidade e há potencialmente cerca de 9 milhões de hectares com riscos de salinização no Nordeste do Brasil (Pereira *et al.*, 1997). Os solos da região semi-árida afetados pela salinização ocupam vários estados do Nordeste, principalmente Pernambuco, e Rio Grande do Norte.

Estes solos são altamente afetados pelo excesso de sais solúveis o que provoca redução do potencial hídrico do solo, resultando em menor capacidade de absorção de água pelas plantas. Essa redução, associada com os efeitos tóxicos dos sais, interfere no processo de absorção de água pelas sementes, influenciando também no desenvolvimento normal das plantas (Rebouças *et al.*, 1989) e sobre alguns processos biológicos, como a

fixação biológica de nitrogênio, pois prejudica a eficiência da simbiose (Shereen *et al.*, 1998). Em consequência torna esses solos na maioria dos casos não agricultáveis.

O feijão caupi ou feijão de corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), que é uma leguminosa com alto teor de proteínas no grão, representa um recurso importante, por ser uma planta capaz de resistir às condições de déficit hídrico, salinidade e altas temperaturas. Tradicionalmente, é uma cultura de subsistência, cultivada por pequenos e médios agricultores de base familiar, cujo excedente de produção é comercializado em feiras livres. No entanto, a cultura do feijão caupi tem avançado para áreas mais tecnificadas, utilizando práticas de correção, fertilização e irrigação, em rotação com outras culturas (Freire Filho, 2005).

Assim como as plantas, as bactérias diazotróficas simbióticas apresentam grande variação na tolerância à salinidade. Essa tolerância ao estresse salino pode ser atribuída a variações de pH, temperatura, fonte de carbono solúvel e à presença de solutos osmoprotetores (Graham, 1992).

A seleção de estirpes de rizóbio adaptáveis ao estresse de salinidade, altos pHs e temperaturas elevadas da região Semi-árida amplia as chances de sucesso para a introdução e estabelecimento da bactéria na associação com o feijão caupi, podendo aumentar a produtividade de grãos. Para tanto, testes *in vitro* podem ser utilizados, pois, além de permitirem a comparação de um grande número de microrganismos, são rápidos e de custo relativamente baixo, possibilitando a identificação de estirpes tolerantes, antes da verificação de sua tolerância no campo (Nóbrega *et. al.* 2004)

Este trabalho teve como objetivo testar a coleção de rizóbios obtida no trabalho anterior, em faixas elevadas de pH e salinidade e selecionar os isolados que possam ser promissoras em fixar nitrogênio em caupi.

MATERIAL E MÉTODOS

Os 19 grupos de bactérias estudados, quanto à diversidade de bactérias em solos do semi-árido de Pernambuco, descrita no capítulo 1, foram testados em níveis crescentes de sódio solúvel em meio de cultura, pH e condutividade elétrica.

Foram selecionados representantes aleatoriamente dentre cada grupo formado pelas características morfológicas. O número de isolados selecionados a partir de cada grupo de origem foi proporcional à sua frequência.

Teste de tolerância a níveis crescentes de pH, CE e sódio solúvel: Os isolados foram testados quanto à tolerância à NaCl em níveis de 1, 2 e 3% (10; 20 e 30 g L⁻¹), solúvel em meio de cultura. As bactérias foram crescidas em meio YMA sólido, contendo: 10g manitol; 0,1g K₂HPO₄; 0,4g KH₂PO₄; 0,2g MgSO₄.7H₂O; 0,1g NaCl; 0,4g extrato de levedura; 5 mL sol. 0,5% em 0,2 N KOH de azul de Bromothimol; 15g Agar; num volume de 1L; pH 6,8 (Fred & Waksman, 1928), e incubadas a uma temperatura de 28 °C.

Para tolerância a pHs elevados, foram testada as faixas de 7,0, 8,0 e 9,0 no meio de cultura YMA modificado, utilizando soluções de NaOH 1mol L⁻¹.

As diferentes concentrações de condutividade elétrica em meio de cultura YMA (4, 6 e 8 dS m⁻¹) foram produzidas partindo de uma solução estoque à 1 mol L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O, esta solução foi facilmente preparada dissolvendo 73,505g de CaCl₂.2H₂O em 1 L de água destilada.

A avaliação da tolerância foi medida quando os isolados obtiveram crescimento em condições normais do meio YMA (0,01% de NaCl, pH 6.8). No mesmo instante foi feita a observação de crescimento dos mesmos isolados com relação aos demais tratamentos

(NaCl, CE e pH) nos diferentes níveis. Os isolados que foram tolerantes receberam sinal (+) e os que não cresceram receberam sinal (-).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as estirpes cresceram no meio YMA na concentração de 0,01% de NaCl. No entanto, à medida que a concentração de NaCl aumentou ocorreu uma redução na porcentagem de isolados tolerantes (Figura 2).

Cerca de 69% dos isolados (90) avaliados foram capazes de crescer na concentração de 1% (10g L^{-1}) de NaCl. Esses mesmos isolados apresentaram tolerância na concentração de 20g L^{-1} . Para Graham & Parker (1964) muitas espécies de rizóbio podem tolerar níveis acima de 20g L^{-1} de NaCl no meio de cultura. No presente estudo, 56% foram tolerantes quando submetidos à concentração máxima (30g L^{-1}). Estirpes tolerantes à níveis elevados NaCl podem ter uma importância ecológica sob condições inadequadas para sua sobrevivência (Xavier *et. al.*, 2007). Sugerindo que microorganismos tendem a processo de evolução, adquirindo estratégias para sobrevivência em condições inóspitas, como as do semi-árido nordestino.

De forma geral, observou-se que os padrões de crescimento de todas as estirpes foram reduzidos com o aumento da concentração de NaCl no meio de cultura. Resultados similares a este foram obtidos por Nóbrega *et. al.* (2004) e Xavier *et. al.* (2007), avaliando a tolerância de rizóbio à salinidade *in vitro*.

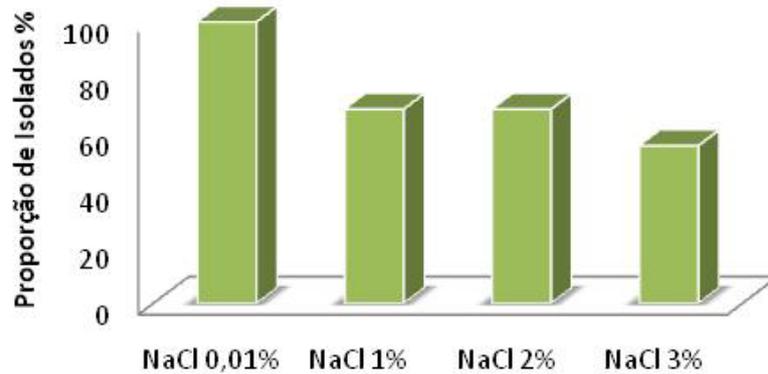


Figura 2. Tolerância de isolados a diferentes concentrações de sódio solúvel em meio de cultura YMA.

Os isolados apresentaram-se mais resistentes aos testes de pH que aos de NaCl. Dos 125 isolados, 100% cresceram com pH 7, o que já era esperado, visto que a faixa ideal para o crescimento do rizóbio varia entre 6.8 e 7. Quando submetidos ao pH 8, houve redução de aproximadamente 25% deste total, seguido de queda no pH 9, com 70% do total de isolados testados mostrando-se tolerantes (Figura 3).

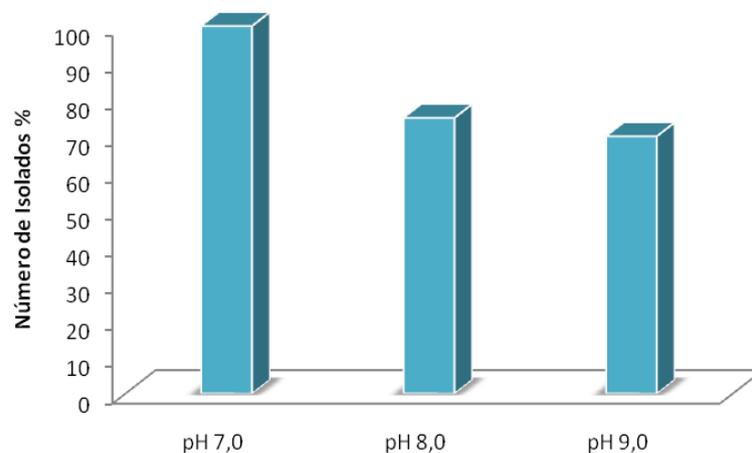


Figura 3. Tolerância de isolados a diferentes faixas de pH em meio de cultura YMA.

Todos os isolados procedentes dos solos salino e sódico formaram colônias em menos de 24 horas, o que caracteriza estirpes de crescimento rápido conforme Vincent (1970), acompanhado de reação acida do meio de cultura e elevada produção de exopolissacarídeos (Figura 4).

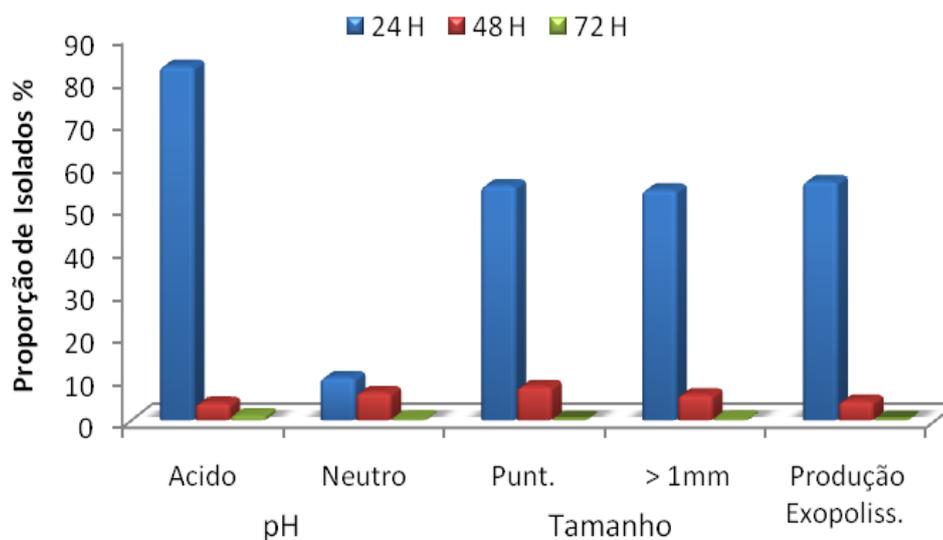


Figura 4: Número de rizóbios isolados de caupi em função da reação de pH em meio de cultura, do tamanho das colônias e da produção de exopolissacarídeos.

Norris (1965) sugere que leguminosas adaptadas à pHs neutro e alcalino estejam associadas com rizóbio de crescimento rápido, os quais geralmente produzem ácido. Para Tan e Broughton (1981), as estirpes de rizóbio de crescimento rápido normalmente nodulam leguminosas de origem temperadas e habitam solos de neutros e alcalinos.

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.

Silva *et al.* (1997), caracterizando populações nativas de rizóbios também de solos da região Semi-árida de Pernambuco, observaram crescimento rápido em todos os isolados estudados. Freitas *et al.* (2007) confirmaram esses resultados observando características fenotípicas de colônias bacterianas de vinte e quatro isolados, que obtiveram todas as colônias circulares, com diâmetro de 1-4 mm, bordas inteiras, homogêneas, com elevação, coloração branca e produção variável de exopolissacarídeos.

Para Stamford *et al.* (1988, 1996), que isolaram rizóbios de caupi (*Vigna unguiculata*), soja (*Glicine max*) e jacatupé (*Pachirrizus erosus*) em amostras de solos da Zona da Mata e da região semi-árida de Pernambuco, e para Bezerra *et al.* (2005), que

trabalharam com amendoim em solos com diferentes manejos agrícolas da Zona da Mata de Pernambuco, a ocorrência de rizóbio de crescimento lento ou rápido parece estar relacionada com aspectos ambientais, pois observaram que a grande maioria dos isolados da região semi-árida tiveram crescimento rápido enquanto os da Zona da Mata crescimento lento ou neutro.

Hungria & Vargas (2000), trabalhando com rizóbio em condições de baixo pH, referem que a exposição de isolados de rizóbio diminui seu crescimento, sugerindo que alguns processos citoplasmáticos da bactéria são sensíveis à esse fator. Aarons & Graham (1991) observaram que em meio ácido há uma diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias, o que também pode afetar o crescimento bacteriano.

A característica de alta produção de exopolissacarídeos vem sendo descrita por vários autores como um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios em distintas condições edafoclimáticas, como solos salinos (Xavier *et al.*, 1998), temperaturas elevadas (Osa-afiana & Alexander, 1982) e presença de actinomicetos produtores de antibióticos (Coutinho *et al.*, 1999). Neste estudo, houve uma tendência que indicou maior tolerância à salinidade de isolados com crescimento rápido que acidificam o meio e que são produtores de exopolissacarídeos.

A grande capacidade de produção de exopolissacarídeos observada nos isolados testados pode estar relacionada à tolerância a estresse ambiental, o que possivelmente possibilita sua sobrevivência nesses solos. Barnet (1991), Sprent (1994) e Martins (1997), observaram que isolados de rizóbios de crescimento rápido são mais comuns em regiões semi-áridas, constituindo essa característica como estratégia de sobrevivência, já que são mais tolerantes à seca que os de crescimento lento.

Outro fato importante foi que as bactérias isoladas do semi-árido tiveram mais predisposição em suportar condições extremas de pH em relação à sodicidade e até salinidade (Figura 5).

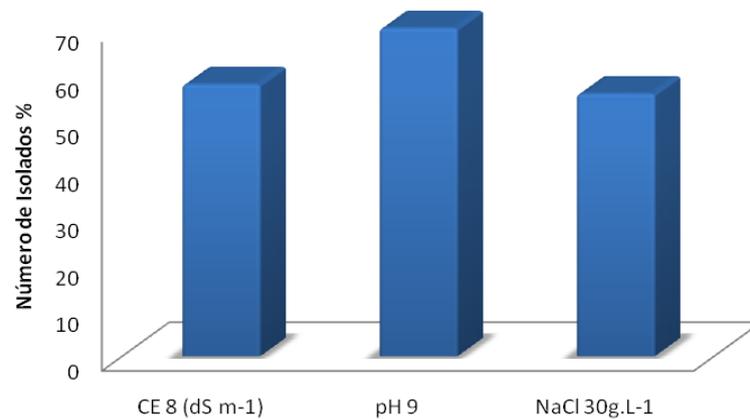


Figura 5. Tolerância de isolados a condutividade elétrica, pH e sódio solúvel em meio de cultura YMA.

De acordo com os dados pode-se inferir que os níveis de sódio solúvel em meio de cultura foram mais prejudiciais no desenvolvimento das bactérias. Para bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, os efeitos prejudiciais dos sais são mais evidentes, particularmente em relação aos efeitos da concentração do íon específico do que ao efeito osmótico (Elsheikh, 1998).

CONCLUSÕES

- As bactérias isoladas do semi-árido tiveram maior predisposição em suportar condições extremas de pH em relação à sodicidade e até salinidade;
- A sodicidade foi mais prejudicial no desenvolvimento das bactérias, particularmente em relação à concentração do íon específico, que ao efeito osmótico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarons, S.R.; Graham, P.H. (1991).** Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. *Pl. Soil*, 13(4/1):145-151.
- Barnet, Y. M.; Catt, P. C. (1991).** Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.135, p.109-120.
- Bezerra, R. V.; Santos, C. E. R. S.; Stamford, N. P.; Freitas, A. D. S.; Vieira, I. M. M. B.; Lyra, M. C. C. P. (2005).** Diversidade morfofisiológica de rizóbios isolados de amendoim, cultivado em solos da Zona da Mata de Pernambuco. XXX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo – Solos Sustentabilidade e Qualidade Ambiental. CD-ROM. Recife - PE, 17 à 22 julho.
- Coutinho, H. L. C; Kay, H. E.; Manfio, G. P.; Neves, M. C. P.; Ribeiro, J. R. A.; Rumjanek, N. G.; Beringer, J. (1999).** Molecular evidence for shifts in polysaccharide composition associated with adaptation of soybean *Bradyrhizobium* strains to the Brazilian Cerrado soil. *Environmental Microbiology*, London, v.1, n.5, p 401-408.
- Elsheikh, E. A. E. (1998).** Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. *Annals of Applied Biology*, Lannham, v. 132, n. 3, p. 507-524.
- Fred, E.B. & Waksman, S.A. (1928).** Laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw-Hill Book Company, 143p.
- Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. de A. & Ribeiro, V.Q. (Org.). (2005).** Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 519 p.
- Freitas, A. D. S.; Vieira, C. L.; Santos, C. E. R. S.; Stamford, N. P.; Lyra, M. C. C. P. (2007).** Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia*, Campinas, v.66, n.3, p.497-504.
- Graham, P. H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, v. 38, p. 474-484.
- Graham, P. H.; Parker, C. A. (1964).** Diagnostic features in the root nodule bacteria of legumes. *Plant and Soil*, The Hague, v.20, p.383-396.

- Hungria, M.; Vargas, M. A. T. (2000).** Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in tropics, with an emphasis on Brazil, *Field Crop Res* v. 65, p. 151–164.
- Martins, L. M. V. Neves, M. C. P., Rumjanek, N. G. (1997).** Growth characteristics and symbiotic efficiency of rizobia isolated from cowpea nodules of the northeast of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5-6; p.1005-1010.
- Mota, F. O. B.; Oliveira, J. B. (1999).** Mineralogia de solos com excesso de sódio no estado do Ceará. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 23, n. 4, p.799-806.
- Nóbrega, R. S. A.; Motta, J. S.; Lacerda, A. M.; Moreira, F. M. S. (2004).** Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. *Ciência agrotec.*, Lavras, v. 28, n. 4, p. 899-905.
- Norris, D.O. (1965).** Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. *Plant and Soil*, The Hague, v.22, n.2, p.143-166.
- Osa-afiana, L. O.; Alexander, M. (1982).** Clays and the survival of *Rhizobium* during desiccation. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.46, p.285-288.
- Pereira, J. R.; Valdivieso, C. R.; Cordeiro, G. C. (1985).** Recuperação de solos afetados por sódio através do uso do gesso. In: *Seminário Sobre o Uso de Fosfogesso na Agricultura*, Brasília, p.85-105.
- Rebouças, M. A. A.; Façanha, J. G. V.; Ferreira, L. G. R.; Prisco, J. T. (1989).** Crescimento e conteúdos de N, P, K e Na em 3 cultivares de algodão sob condições de estresse salino. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 1, n. 1, p. 79-85.
- Shereen, A.; Ansari, R.; Naqvi, S. S. M.; Soomro, A. Q. (1998).** Effect of salinity on *Rhizobium* sp., nodulation and growth of soybean (*Glycine max.* L.). *Pakistan Journal of Botany*, Pakistan, v. 30, n. 1, p. 75- 81.
- Silva, V. N.; Silva, L. E. S. F.; Figueiredo, M. V. B.; Carvalho, F. G.; Silva, M. L. R. B.; Silva, A. J. N. (1997).** Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região Semi-árida de Pernambuco. *Pesq. Agropec. Trop. Goiânia - GO*, 37 (1): 16-21.
- Sprent, J. I. (1994).** Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? *Plant and Soil*, Dordrecht, v.161, p.1-10.

- Stamford, N. P.; Santos, C. E. R. S.; Medeiros, R.; Figueiredo, M. V. B. (1996).** Efeito de diferentes relações potássio magnésio no Jacatupé com inoculação com rizóbio. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.20, 49-54.
- Stamford, N. P.; Vasconcelos, I.; Almeida, R. T. (1988).** Fixação Biológica de nitrogênio em caupi na região Nordeste brasileira En: Araújo, J.P. O Caupi do Brasil. Brasília: IITA/Embrapa, p.477-504.
- Tan, I. K. P.; Broughton, W. J. (1981).** Rhizobia in tropical legumes. XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. Soil Biology and Biochemistry, v. 13, p. 389-393.
- Xavier, G. R.; Martin, L. M.; Rumjanek, N. G.; Neves, M. C. P. (2007).** Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição *in vitro*. Revista Caatinga. Mossoró, v.20, n.4, p.01-09.
- Xavier, G. R.; Martins, L. M. V.; Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. (1998).** Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v.27, p.386-392.

CAPÍTULO III

EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EM PLANTAS DE CAUPI (*Vigna unguiculata* (L) WALP), AVALIADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) WALP) é bastante cultivado nas regiões tropicais da África, Ásia e América. Seu cultivo predomina como agricultura de subsistência. Para as populações de menor poder aquisitivo, representa uma das fontes básicas de proteína vegetal, uma vez que o seu valor comercial normalmente é inferior ao do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Merece destaque o consumo de caupi em estágio de grãos verde, tradicional em todo o Nordeste, comercializado em feiras livres e supermercados. Do ponto de vista alimentar, não há praticamente diferença em comparação com o feijão *Phaseolus*, apresentando até melhor balanceamento dos aminoácidos gerais e em especial a cistina (Paiva, 1977).

Essa cultura é caracterizada ainda pelo baixo uso de tecnologia e por predominar em solos marginais deficientes em nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, fatores que contribuem para baixa produtividade de grãos, que no Brasil situa-se em torno de 400 a 500 Kg.ha⁻¹ (Freire Filho *et al.*, 1998).

Ele possui capacidade de se desenvolver satisfatoriamente em solos de baixa fertilidade e tem rusticidade, tolerância a déficit hídrico, a alta temperatura e a salinidade e capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), quando em associação com bactérias conhecidas como rizóbio (Martins *et al.*, 1996). Para tanto, em condições de experimento e

lavouras melhor tecnificadas, o feijão caupi tem apresentado alto potencial produtivo, que em geral não tem sido explorado. A produtividade desta cultura poderia ser aumentada pelo uso de inoculantes de rizóbios eficientes, que poderiam suprir as necessidades de nitrogênio da planta (Zilli, 2001).

A estimativa da contribuição da FBN em feijão-caupi está na ordem de US\$ 13 milhões, somente para a região Nordeste brasileira (Rumjanek *et al.*, 2005).

Nem sempre a população nativa do solo é capaz de estabelecer uma simbiose mutualista com o hospedeiro cultivado. A seleção de estirpes eficientes para maximizar a fixação de nitrogênio em espécies vegetais de importância econômica tem sido um dos principais alvos da pesquisa.

A importância econômica para o Brasil da FBN pode ser exemplificada pelos resultados obtidos com a soja, que devido ao melhoramento vegetal e seleção de rizóbios adaptados, chegou 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 simbiose caupi/rizóbio é de baixa especificidade, o que se torna uma barreira à introdução de novos inoculantes, pois estirpes nativas ou naturalizadas estão adaptadas às condições edafoclimáticas do local e acabam competindo com as estirpes selecionadas, restringindo a contribuição das mesmas para a FBN. Frente a esta situação, sobressaem-se estratégias que avaliem a composição e a contribuição para a FBN de estirpes de rizóbio do local onde se pretende introduzir o inoculante (Zilli, 2001).

Estudos da simbiose feijão de corda/rizóbio, principalmente envolvendo aspectos ecológicos, tais como, competitividade e sobrevivência da estirpe inoculante, precisam ser considerados, paralelamente aos esforços no sentido de otimizar o processo de fixação biológica de nitrogênio (Martins *et al.* 1996)

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 pode-se melhorar a adaptabilidade e capacidade competitiva do rizóbio, fatores determinantes do sucesso da prática da inoculação (Straliotto & Rumjanek, 1999).

Uma estratégia chave para aumentar o desempenho destes inoculantes baseia-se na seleção de estirpes com capacidade para competir com as estirpes autóctones para a nodulação, ou para sobreviver saprofiticamente nas condições edafoclimáticas locais. Esta seleção torna-se particularmente importante em solos afetados por condições ambientais adversas (O'Hara *et al.*, 2002). Nestas situações, é essencial utilizar estirpes capazes de sobreviver no solo em condições de estresse e em número suficiente para garantir uma população capaz de nodular e fixar nitrogênio, competindo com as estirpes nativas.

Esse trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o comportamento de rizóbios nativos e avaliar novas estirpes de rizóbio e sua eficiência na absorção de nitrogênio com perspectivas de aumento da produtividade do caupi sem custos de adubo nitrogenado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um experimento em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), para selecionar, em vasos de “Leonard” adaptados (Vincent, 1970), em condições estéreis, estirpes de rizóbio oriundas de solos do semi-árido pernambucano eficazes no processo de fixação biológica de N₂ em caupi e tolerantes a condições extremas de pH e salinidade.

Seleção de Estirpes de Rizóbio de Alta Eficácia em Fixar N₂ em Plantas de Caupi em Condições Estéreis

Todos os isolados obtidos dos solos, salino e salino-sódico (áreas 1 e 2, descritos no capítulo 1), foram testados quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio em caupi. Para isso, vasos de “Leonard” foram produzidos a partir de garrafas pet de 2L de capacidade. Foram cortadas de modo que um vaso fosse produzido a partir de uma garrafa, a parte inferior da garrafa servindo de suporte e parte superior com o substrato e a planta. As tampas foram perfuradas e serviram de impedimento para a perda do substrato (Figuras 1 e 2A, B e C). A esterilização foi feita com imersão em solução de hipoclorito de sódio, na concentração de 5%, por 1 hora, retirando-se o excesso com água corrente (Figura 3).

A areia usada foi lavada em água corrente até que ficasse límpida, seca ao ar e colocada em sacos plásticos com capacidade para 2L e esterilizadas em autoclave a 120 °C e 1 ATM. Cada vasos foi preenchido com 1,3 Kg vaso⁻¹ de areia (Figuras 4 e 5).

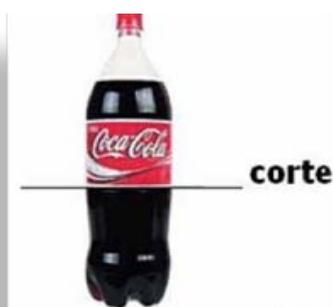


Figura 1. Área de Corte da Garrafa Pet.



Figura 2 (A, B e C). Vasos de Leonard adaptado.



Figura 3. Esterilização dos vasos com solução de hipoclorito de sódio na concentração de 5%.



Figura 4. Enchimento dos vasos de Leonard com substrato estéril.



Figura 5. Vista dos vasos de Leonard adaptados



Figura 6. Disposição dos vasos em casa de vegetação.

As sementes de caupi utilizadas (Cv. IPA 206), resultado do cruzamento entre os genótipos 371 e CNCx 11-2E, foram cedidas pelo Laboratório de sementes do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA. As sementes foram desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio (1:100), seguidas por seis lavagens com água destilada esterilizada, com a finalidade de retirar o excesso de hipoclorito. Cada vaso recebeu quatro sementes. Após 72 horas foi procedido o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso e feita a inoculação das bactérias, colocando-se 2 ml por vaso da suspensão das estirpes em teste.

Os inoculantes foram produzidos no Núcleo de Fixação Biológica do N₂ nos Trópicos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – NFBNT/UFRPE. As estirpes foram incubadas isoladamente em 50 mL de meio YMA líquido (Vincent, 1970), com pH

ajustado para 6,8, à temperatura ambiente sob agitação orbital a 105 RPM, por seis dias para que a cultura atingisse a fase logarítmica de crescimento (Matsuda *et al.*, 2002).

O desenho experimental consistiu em blocos ao acaso, com 3 repetições. Além do tratamento com as estirpes em teste foram usados dois tratamentos controles sem inoculação, sendo um sem nitrogênio e um com 700 mg vaso⁻¹ de NH₄N₃, em doses parceladas semanalmente (50, 150 e 450 mg vaso⁻¹) a partir de quinze dias após o plantio (DAP) (Relare, 2007). A solução nutritiva isenta de nitrogênio (Tabela 1), foi preparada de acordo com Norris & Date (1976), e colocada diariamente num volume de 50 ml até sete DAP. Posteriormente, 100 ml da solução foram colocados até o dia da colheita das plantas, aos 40 DAP. Na colheita, As plantas foram foram separadas em raiz e parte aérea.

Tabela 1: Solução nutritiva para crescimento de plantas (Norris & Date, 1976).

Solução Estoque	Produto Químico	Concentração (g.L ⁻¹)	mL da Sol. Estoque L ⁻¹ da Sol. Final
1.	KCL	29,8	2,5
2.	KH ₂ PO ₄	4,35	2,5
3.	MgSO ₄ .7H ₂ O	98,6	2,5
4.	Micronutrientes		0,5
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,078	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	
	MnSO ₄ .4H ₂ O	2,03	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,01	
	H ₃ BO ₃	1,43	
5.	Citrato Férrico	1,795	1,0
6.	CaSO ₄ .2H ₂ O	68,0	1,0

Ajustada para pH 6,5 com solução de KOH, 1 N.

Os nódulos foram retirados, lavados, contados e secos em estufa numa temperatura entre 60 e 65 °C até atingirem peso constante. A parte aérea das plantas também foi seca até peso constante e moída para a determinação do N-total pelo método semi-micro Kjeldahl, segundo Tedesco *et al.* (1995).

A média das três repetições da biomassa seca da parte aérea (BSPA) foi utilizada para calcular a eficácia das estirpes em teste, em relação à testemunha nitrogenada segundo Gibson (1980).

$$E_J = \frac{\text{BSPA inocularada}}{\text{BSPA N-mineral}} \times 100$$

Eq. 1

Os dados foram organizados em ordem crescente e agrupados em classes de eficiência, utilizando o método de Brockwell *et al.* (1966) modificado, onde, $E_J \geq 0,60$ (altamente eficaz), $0,55 \leq E_J < 0,60$ (eficaz), $E_J < 0,50$ (pouco eficaz) e sem nodulação (ineficaz).

Os resultados quanto a biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), número de nódulos (NN), biomassa seca dos nódulos (BSN), teor de nitrogênio (TN) e nitrogênio total (NT) das estirpes classificadas como altamente eficazes e eficazes foram submetidos à análise de variância, utilizando o procedimento GLM do SAS Learning Edition 2.0 for Windows (SAS Institute, 2004). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No entanto, sete isolados apresentaram eficácia acima de 55%. Desses, três foram classificados como altamente eficazes: NFB/REN-40, NFB/REN-36 e NFB/REN-49 com 70, 63 e 63% de eficácia respectivamente. Estas três não apresentaram diferenças estatísticas entre si, para o parâmetro de eficácia relativa (Tabela 2).

De modo geral, a eficácia dos 44 isolados avaliados ficou entre 32 e 70%, com relação ao controle com N-mineral, e a grande maioria deles foi pouco eficaz e até ineficaz no processo de fixação de N_2 .

As baixas eficácias podem ser explicadas pela grande variação de temperatura no interior da casa de vegetação, durante o período de condução do experimento, variando de 23 a 59 °C (Figura 7). De acordo com a Relare (2007), o processo de nodulação é prejudicado por temperaturas muito elevadas nos vasos (acima de 28-30 °C).

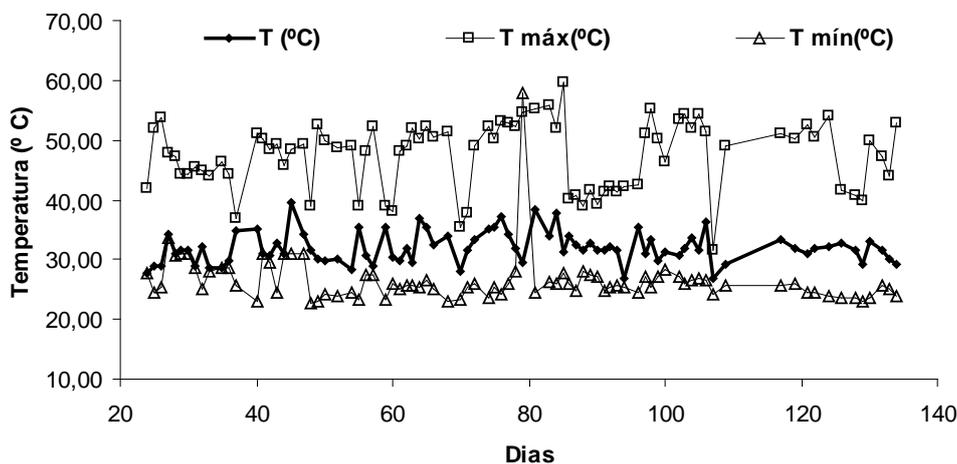


Figura 7. Dados diários de temperatura durante a condução dos experimentos.

Resultados experimentais têm sugerido que propriedades simbióticas poderiam ser perdidas após exposição prolongada a temperaturas elevadas. Isto poderia ocorrer em

virtude da perda do megaplasmídeo ou de deleções internas (Morrison *et al.*, 1983; Sharma & Laxminarayana, 1989).

Jones & Tisdale (1921) encontraram que a nodulação em soja foi marcadamente reduzida quando temperaturas do solo excederam 35 °C. Em caupi, Dart & Mercer (1965) encontraram que nódulos foram reduzidos em número e tamanho quando submetidas a altas temperaturas embora outros fatores, além da temperatura, estivessem também envolvidos.

A Tabela 3 mostra que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) para biomassa seca da raiz (BSR), número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (BSN), teor de nitrogênio (TN) e nitrogênio total (NT). Diferenças foram verificadas apenas para eficácia (E_j) e biomassa seca da parte aérea (BSPA).

A estirpe NFB/REN-40 mostrou-se superior às demais quanto a biomassa seca da parte aérea das plantas nas quais foi inoculada. Observou-se também que não houve diferenças significativas quanto ao tratamento com N-mineral (700 mg vaso⁻¹ de NH₄NO₃) (Tabela 2), demonstrando um bom potencial para otimização da contribuição da FBN nesta cultura. Por outro lado, essa mesma estirpe não diferiu das demais quanto aos resultados do número de nódulos, biomassa seca da raiz, teor de nitrogênio e nitrogênio total das plantas.

Parâmetros como BSPA são levados em consideração principalmente por estar diretamente relacionado com produção de carboidratos no processo de fotossíntese e conseqüentemente com a otimização da FBN. Correlações entre BSPA e componentes de produtividade foram encontradas por Thies *et al.* (1991), Pimratch *et al.* (2004a e 2004b) e Silva (2007), sugerindo que o acúmulo de BSPA é uma característica confiável na seleção de estirpes com maior potencial simbiótico.

Tabela 2. Eficácia (E_J) e biomassa seca da parte aérea (BSPA) de plantas de feijão caupi, Cv. IPA 206 cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 7 estirpes de rizóbios isoladas de solos do Semi-árido Pernambucano, após 40 dias de cultivo.

Fonte de N	E_J	BSPA (g)
Test (N-min)	100a	3,11a
NFB/REN-40	70,46b	2,88a
NFB/REN-36	63,55b	2,59b
NFB/REN-49	63,33b	2,21b
NFB/REN-15	58,84b	1,86c
NFB/REN-27	58,64b	1,82c
NFB/REN-20	58,47b	1,64c
NFB/REN-16	55,67b	1,45c

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 3: Valores de probabilidade para eficácia (E_J), biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), número de nódulos (NN), biomassa seca de nódulos (BSN), teor de nitrogênio (TN) e nitrogênio total (NT) de plantas de feijão caupi, Cv. IPA 206 cultivadas em vasos de Leonard, inoculadas com 7 estirpes de rizóbios isoladas de solos do semi-árido pernambucano, após 40 dias de cultivo.

FV	E_J	BSPA	BSR	NN	BSN	TN	NT
Tratamentos	0,04*	0,04*	0,91	0,25	0,05	0,20	0,30
CV%	24	24	34	126	18	48	45

Considerando os resultados obtidos, pode-se inferir que os solos da região Semi-árida de Pernambuco apresentaram ocorrência generalizada de estirpes de rizóbio nativos eficientes para inocular o caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp), em condições estéreis de casa de vegetação. É importante a continuidade desse trabalho para estudos de eficiência, sobrevivência e estabelecimento dessas estirpes nos solos de origem.

CONCLUSÕES

- As estirpes NFB/REN-40, NFB/REN-36 e NFB/REN-49 demonstraram um bom potencial para fixação biológica de N₂ na cultura do feijão-caupi;
- Temperaturas elevadas foram prejudiciais no processo de nodulação, ocasionando baixas eficácias na grande maioria dos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brockwell, J.; Hely, F. W.; Neal-Smith, C. A. (1966).** Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. Australian Journal of Experimental Agricultural and Animal Husbandry, v.6, p.365-370.
- Dart, P. J.; Mercer, F. V. (1965).** The effect of growth temperature, level of ammonium nitrate and light intensity on the growth and nodulation of cowpea. Australian Journal of Agricultural Research, Victoria, v.16, p.321-328.
- Date, R. A.; Norris, D. O. (1976).** Legume bacteriology. In: Hungria, M. & Araújo, R. S., Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Embrapa, Brasília, DF.
- Freire Filho, F. R.; Ribeiro, V. Q.; Barreto, P. D.; Santos, C. A. F. (1998).** 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 Genéticos e Biotecnologia, nov. 1999. Disponível em <http://www.cpatia.embrapa.br>.
- Gibson, A. H., (1980).** Methods for legumes in glasshouse and controlled environment cabinets. In: Bergersen, F.T. (Ed.), Methods for Evaluation Biological Nitrogen Fixation. Wiley. Brisbane, p.139-184.
- Hungria, M.; Campos, R. J. (2005).** Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 30., 2005, Recife. Anais... Recife. 1 Cd-Rom.
- Jones, F. R.; Tisdale, W. B. (1921).** The effect of soil temperature upon the development of nodules on the roots of certain legumes. Journal of Agricultural Research, Pakistan, v.22, p.17-23.
- Martins, L. M. V. (1996).** 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. Tese de Mestrado.

- Matsuda, A.; Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. (2002).** Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v.37, n.3, p.343-355.
- Morrison, N. A.; Hau, C. Y.; Trinick, M. J.; Shine, J.; Rolfe, B. G. (1983).** Heat curing of a sym plasmid in a fast-growing *Rhizobium* sp. that is able to nodulate legumes and the nonlegume *Parasponia* sp. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.153, p.527-531.
- O'Hara, G., Yates, R. & Howieson, J. (2002).** Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculant performance and increase legume productivity in stressful environments. *In: D. Herridge (ed) Inoculants and Nitrogen Fixation in Vietnam*, p.75-80.
- Paiva, J. B.; Carmo, C. M.; Tavora, F. J. A.; Almeida, F. G.; Sampaio, S.; Moura, W. P. D.; Sales, J. C.; Palhano, J. G.; Oliveira, F. I.; Sampaio, A.; Santos, J. A. R. (1970).** Melhoramento, experimentação e fitossanidade com feijão (*Vigna simensis*), realizadas no estado do Ceará (1967/68). *Pesquisa Agropecuária do Nordeste*, v.2, n.2, p.99-113.
- Pimratch, S.; Jogloy, S.; Toomsan, B.; Jaisil, P.; Kesmla, T.; Patanothai, A. (2004a).** Heritability and correlation for nitrogen fixation and agronomic traits of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Songklanakarin Journal Science Technology*, v.26, n.3, p.305-315.
- Pimratch, S.; Jogloy, S.; Toomsan, B.; Jaisil, P.; Kesmla, T.; Patanothai, A. (2004b).** Evolution of seven peanut genotypes for nitrogen fixation and agronomic traits. *Songklanakarin Journal Science Technology*, v.26, n.3, p.295-304.
- Relare. (2007).** 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. *In: Fertibio 2006*, Londrina-PR: Embrapa Soja, 212p.
- Rumjanek, N. G.; Martins, L. M. V.; Xavier, G. R.; Neves, M. C. P. (2005).** Fixação Biológica de Nitrogênio. *In: Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. de A.; Silva, P. H. S. da; Viana, F. M. P. (Org.). Feijão caupi: avanços tecnológicos*, p. 279-335.
- SAS Institute. (2004).** Statical analysis system. Procedure guide for personal computer. Cary.

- Sharma, P. K.; Lakshminarayana, K. (1989).** Effect of high temperature on plasmid curing of *Rhizobium* spp. in relation to nodulation of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Biology and Fertility of Soil* 8, 75–89.
- Silva, M. F. (2007).** Efetividade da inoculação com *Bradyrhizobium* spp. em amendoim cultivado em solo da Zona da Mata de Pernambuco. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, 56p.
- Straliotto, R.; Rumjanek, N. G. (1999).** Aplicação e evolução dos métodos moleculares para estudo da biodiversidade do rizóbio. Embrapa. Doc. 93.
- Tedesco, M. J.; Gianello, C.; Bissani, C. A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S. J. (1995).** Análises de solo, plantas e outros materiais. 2. ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 174p. (Boletim técnico, 5).
- Thies, J. E.; Singleton, P. W.; Bohlool, B. B. (1991).** Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, US, v.57, n.1, p.19-28.
- Vincent, J. M. (1970).** A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Scientific Publications Oxford: Blackwell Scientific, 164p.
- Zilli, J. L. E. (2001).** Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para inoculação de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em áreas do cerrado. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, 137p.