

THIAGO PONTES LIRA

DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS
RIZOBIANOS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Recife

2014

THIAGO PONTES LIRA

DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS
RIZOBIANOS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte do requisito para a obtenção
do título de mestre em Ciência do Solo.

Orientador

Prof. Mario de Andrade Lira Junior, PhD

Co-Orientadores (a)

Dr. Emídio Cantídio Almeida de Oliveira

Dr^a. Gláucia Alves e Silva

Recife

2014

Ficha catalográfica

L768d Lira, Thiago Pontes
Diversidade e eficiência simbiótica de isolados rizobianos
de solos do semiárido brasileiro / Thiago Pontes Lira. –
Recife, 2014.
45 f.

Orientador: Mario de Andrade Lira Junior.
Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Agronomia, Recife, 2014.
Referências.

1. Fixação biológica de nitrogênio 2. Feijão-caupi
3. Edafoclimáticos 4. Rizóbios I. Lira Junior, Mario de
Andrade, orientador II. Título

CDD 631.4

THIAGO PONTES LIRA

DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS RIZOBIANOS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte do requisito para a obtenção do título de mestre em Ciência do Solo.

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em agosto de 2014

Orientador:

Mario de Andrade Lira Junior – Ph.D (DEPA/UFRPE)

Banca examinadora:

Giselle Gomes Monteiro Fracetto – Dra. (DEPA/UFRPE)

Newton Pereira Stamford – Dr. (DEPA/UFRPE)

Aos meus pais, Maria da Conceição Pontes Lira e Antônio Machado Lira (In memoriam);

Aos meus irmãos Diego Pontes Lira, Priscila Pontes Lira, Thaissa Pontes Lira e ao meu sobrinho Enzo;

E a todos os meus familiares e amigos que me apoiaram.

DEDICO

A todos os meus familiares, em especial a minha mãe a quem eu devo todo o ensinamento da vida que ajudou a construir o meu caráter e as minhas irmãs Priscila e Thaissa, por tudo que elas representam para mim.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre comigo;

A minha família em nome de minha mãe que com todas as dificuldades da vida conseguiu passar os bons ensinamentos que ajudaram a construir o meu caráter;

As minhas irmãs que sempre estiveram do meu lado me apoiando;

Ao meu orientador Prof. Ph.D Mario de Andrade Lira Junior, por todo o apoio, conselhos, ensinamentos e incentivos, meu muito obrigado.

A todos os meus amigos de curso de Pós-graduação, em especial a Adiel e sua esposa Juliana, Jadson e Renisson pessoas que sempre me ajudaram e incentivaram durante toda essa batalha árdua, o meu muito obrigado.

Ao meu grande amigo e amigo de minha família Geziel Sousa Silva que sempre me incentivou e apoiou a seguir na pós-graduação. E a amiga de minha família Rose meu muito obrigado por todo o apoio.

Agradeço a professora e minha orientadora de graduação Francirose Shigaki, por todo o incentivo e aprendizado adquirido durante a graduação e a todos os alunos do grupo de pesquisa PROAGROS-UFMA/CCAA;

Agradeço a todos do laboratório de microbiologia de solos da UFRPE pelo acolhimento no início e durante a execução do meu projeto de dissertação em nome dos professores (as) Caroline, Ana Dolores e Newton Pereira Stanford e da (PNPD/UFRPE) Fátima e dos alunos Arthur e Jessica.

Quero agradecer a todos do laboratório de Diversidade microbiana em nome de Tamiris Kempner, Amanda, Clayton, Luciana, Glauca por todo o apoio e amizade compartilhado com todos durante esse tempo;

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por ter concedido a oportunidade;

Ao coordenador da Pós-Graduação prof. Dr. Valdomiro Severino de Sousa Junior e a todos os professores da Pós-Graduação em Ciência do Solo pelos ensinamentos transmitidos durante o mestrado;

A Maria Socorro Santana e ao Josué Camilo, pelo bom tratamento na secretária do programa;

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto;

E a todos aqueles que contribuíram para o meu sucesso e que não foram citados, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERÊNCIAS.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Diversidade rizobiana e influências de fatores edafoclimáticas.....	21
3.2 Eficiência simbiótica da fixação de nitrogênio no feijão-caupi e Influência de fatores edafoclimáticos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÕES.....	37
7. REFERÊNCIAS.....	37

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição de isolados obtidos dos grupos de solos de alta e baixa fertilidade baseado nas características morfológicas.....29

Figura 2 – Distribuição de isolados obtidos dos grupos de solos de alta fertilidade baseado nas características morfológicas.....30

Figura 3 – Distribuição de isolados obtidos dos grupos de solos de baixa fertilidade baseado nas características morfológicas.....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características químicas e físicas dos grupos de solos utilizados para a obtenção de nódulos com médias e intervalos de confiança a 95%.....25

Tabela 2 – Características climáticas, classes de solos e cobertura vegetal das áreas amostradas.....25

Tabela 3 – Índices de diversidades (Shannon-Weaver), dominância (Simpson), equitabilidade (Pielou) e riquezas de espécies (Margalef) dos isolados obtidos dos grupos de solos de alta e baixa fertilidade.....31

Tabela 4 – Valores de correlações lineares entre os parâmetros dos solos e os índices de diversidade que apresentaram significância.....32

Tabela 5. Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN) e número de nódulos (NN), dos 25 isolados com melhores desempenhos no experimento de autenticação, quando comparados ao controle pelo teste de Dunnett.....33

Tabela 6 – Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), biomassa específica de nódulos (BEN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER) dos isolados obtidos de feijão-caupi.....35

LIRA, THIAGO PONTES Msc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Agosto de 2014. Diversidade e eficiência simbiótica de isolados rizobianos de solos do semiárido brasileiro. Orientador: Mario de Andrade Lira Júnior.

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio é a principal via de entrada de N nos ecossistemas terrestres, especialmente pela simbiose leguminosa-rizóbio. Os solos em geral apresentam uma grande diversidade de rizóbios para o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], que é influenciada por fatores edafoclimáticos, e esta espécie pode ter sua demanda de N completamente satisfeita pela simbiose. Assim, foram avaliadas a influência de fatores edafoclimáticos sobre a diversidade rizobiana e a eficiência simbiótica de isolados rizobianos de feijão-caupi provenientes de solos da região semiárida de Pernambuco. Amostras de solos foram coletadas na camada 0-0,1m de profundidade em Floresta, Santa Cruz do Capibaribe, Parnamirim, Caetés, Petrolina, Sertânia, Santa Cruz e Tupanatinga, e formaram dois grupos de solos, um com alta e outro com baixa fertilidade. Um experimento foi conduzido para a obtenção de nódulos para isolamento e os isolados foram caracterizados morfológicamente em meio YMA. Os índices de diversidade de Shannon-Weaver, dominância de Simpson, riqueza de Margalef e uniformidade de Pielou, foram calculados para cada grupo de solos. Também foi realizada análise de correlação linear entre as características físicas e químicas do solo, climáticas e os índices de diversidade. Um experimento de eficiência simbiótica em substrato estéril foi conduzido em casa de vegetação, incluindo tratamentos sem inoculação e com e sem N e inoculação com a estirpe referência BR 3267 (SEMIA 6462). Aos 45 dias após a inoculação as plantas foram colhidas e massa seca da parte aérea, raiz e nódulos, número de nódulos, biomassa específica de nódulos, acúmulo de nitrogênio na parte aérea e eficiência relativa foram determinadas. Foram obtidos 109 isolados rizobianos, e a maioria apresentou crescimento rápido, reação ácida e pouca ou moderada produção de muco. Diversidade e riqueza foram maiores para o grupo de solo de baixa fertilidade. O conteúdo de argila apresentou correlação

significativa e positiva com os índices de Shannon-Weaver, Pielou e Margalef, enquanto o teor de fósforo teve correlação significativa e negativa com os mesmos índices. A maioria dos isolados apresentou desempenho semelhante aos tratamentos com 60 e 90 kg ha⁻¹ de N e a estirpe referência. Praticamente todos os isolados mais eficientes foram oriundos do grupo de solo de baixa fertilidade, com destaque para os isolados BF.25, BF.77 e BF.18. A menor diversidade rizobiana no grupo de solo de alta fertilidade pode ter sido devida a uma redução da dependência da leguminosa na simbiose, levando a diminuição da diversidade, enquanto a maior dependência encontrada nos solos menos férteis pode ter exercido uma pressão seletiva, favorecendo os isolados mais eficientes quanto a fixação de nitrogênio, ao mesmo tempo em que também favoreceu maior diversidade.

Palavras-Chaves: Fixação biológica de nitrogênio; feijão-caupi; edafoclimáticos; rizóbios.

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation is the main N source for terrestrial ecosystems, especially through the legume-rhizobia symbiosis. Soils generally have high rhizobial diversity for cowpea [*V. unguiculata* (L.) Walp], which is affected by soil and climate factors, and this species may have its full N demand satisfied by the symbiosis. So we evaluated the influence of soil and climate factors on rhizobial diversity and symbiotic efficiency of cowpea rhizobial isolates from soils of the semiarid region of Pernambuco. Soil samples were collected at the 0-0.1 m layer in Floresta, Santa Cruz do Capibaribe, Parnamirim, Caetés, Petrolina, Sertânia, Santa Cruz e Tupanatinga, forming two soil groups, one with high and another with low fertility. An experiment was done to obtain nodules for isolation, and the isolates were morphologically characterized in YMA medium. Shannon-Weaver diversity, Simpson dominance, Margalef richness and Pielou uniformity indexes were calculated for each soil group.

Linear correlation between soil physical and chemical characteristics, climate and diversity indexes was conducted. A symbiotic efficiency experiment was conducted in a greenhouse, including uninoculated treatments with or with N, and inoculation with the reference strain BR 3267 (SEMIA 6462). 45 days after inoculation plants were harvested and shoot, root and nodule dry masses, nodule number, specific nodule biomass, shoot nitrogen accumulation and relative efficiency were determined. 109 rhizobial isolates were obtained, and most had fast growth, acid reaction, and low to moderate mucus production. Diversity and richness were higher for the low fertility soil group. Clay content had significant and positive relation to Shannon-Weaver, Pielou and Margalef indexes, while phosphorus content had significant and negative correlation with these indexes. Most of the isolates had similar performance to the 60 and 90 kg N.ha⁻¹ treatments and to the reference strain. Almost all of the most efficient isolates were from the low fertility soil group, especially BF.25, BF.77 and BF.18 isolates. The lower rhizobial diversity for the high fertility soil group may have been due to a reduction on the plant dependency on the symbiosis between rhizobia and plants, leading to decreased diversity, while the higher dependency on low fertility soils may have favored the more efficient strains, while at the same time favoring higher diversity.

Palavras-Chaves: Biological nitrogen fixation; cowpea; edafoclimactic; rhizobial.

1. INTRODUÇÃO

O semiárido brasileiro ocupa cerca de 970 mil km², e é considerado o semiárido mais populoso do mundo com cerca de 21 milhões de habitantes (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2009). Esta região é caracterizada por baixas precipitações pluviométricas concentradas em períodos curtos com médias anuais entre 280 a 800 mm, associadas a temperaturas predominantemente altas, com solos que apresentam variações em suas propriedades químicas e físicas (Araújo, 2011; Águila, 2013). Devido a essas condições climáticas a atividade agrícola nesta região tem suas limitações, proporcionando produtividade reduzida em algumas culturas, incluindo a cultura do feijão-caupi (Brito et al., 2012).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma cultura típica da região semiárida brasileira, destacando-se como uma das principais fontes alimentares e de renda (Agbicodo et al., 2009). De acordo com FAO (2013), a produção mundial de feijão-caupi atingiu 5 milhões de toneladas, estando o Brasil entre os maiores produtores com uma área de 1,6 milhões de hectares, produção de 783 mil toneladas e produtividade média de 464 kg ha⁻¹. No Brasil o feijão-caupi é cultivado principalmente nas regiões Norte e Nordeste, sendo verificada uma expansão para a região Centro-Oeste (Embrapa Arroz e Feijão, 2012).

O feijão-caupi é uma leguminosa que estabelece associação simbiótica com bactérias diazotróficas nativas do solo, comumente denominadas de rizóbios, e que realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN), pela redução do nitrogênio atmosférico (N₂), indisponível, à amônia (NH₃), disponível para a planta. Esta simbiose fornece nitrogênio ao caupi, proporcionando aumento no rendimento da cultura (Brito et al., 2011; Gualter et al., 2011).

A eficiência da FBN pode ser afetada por diversos fatores bióticos e abióticos como acidez do solo, altas temperaturas, salinidade, baixa precipitação pluviométrica, deficiência de nutrientes e a baixa especificidade simbiótica da cultura (Chalk et al., 2010; Divito & Sadras, 2014; Hungira & Vargas, 2000).

Por outro lado, a grande diversidade de rizóbios nativos capaz de nodular o feijão-caupi pode ser útil para a seleção de isolados eficientes e adaptados às condições edafoclimáticas locais (Chagas Junior et al., 2010).

Isolados rizobianos de caupi cultivados em solos do cerrado apresentaram bom desempenho simbiótico e ocupação nodular (Zilli et al., 2006). Já outros rizóbios isolados de amostras de solos de diferentes locais da região Nordeste do Brasil apresentaram maior eficiência na fixação de nitrogênio para o feijão-caupi que a estirpe BR 2001, usada como inoculante para a cultura no Brasil (Martins et al., 1997), o mesmo acontecendo com isolados selecionados da região Amazônica (Lacerda et al., 2004).

Portanto, explorar a diversidade de rizóbios nativos é uma forma eficiente de se obter estirpes com alto potencial de fixação de N para o caupi. Para isto, é necessário estudar a diversidade dessas populações rizobianas nativas do solo em que se pretende cultivar a cultura, pois a diversidade de rizóbios pode variar em função do solo, condições climáticas, sistema de cultivo e/ou cobertura vegetal (Lima et al., 2005; Kaschuk et al., 2006; Han et al., 2008; Zilli et al.; 2009; Eboutahiri et al., 2010; Martins et al., 2011). Por exemplo, características ambientais como tipo do solo e pH, clima, temperatura e umidade afetaram a diversidade de espécies de *Bradyrhizobium* que nodulam caupi no Japão (Sarr et al., 2011), enquanto a presença de leguminosas em diferentes sistemas de produção também afetaram a diversidade rizobiana (Leite et al., 2009; Zilli et al., 2004).

Alguns estudos têm relatado uma alta diversidade rizobiana no semiárido brasileiro (Medeiros et al., 2009; Freitas et al., 2007; Fernandes et al., 2003). Provavelmente essa elevada diversidade rizobiana em regiões semiáridas pode está associada as suas condições edafoclimáticas. Por exemplo, em estudo de diversidade rizobiana com solos da região semiárida e da Zona da Mata de Pernambuco, observou-se que a região semiárida apresentou maiores índices de diversidade de Shannon-Weaver, variando de 3,3 a 3,78, enquanto nos da Zona da Mata a diversidade variou de 2,12 a 2,18 (Santos et al., 2007).

Diante do exposto o presente trabalho objetivou avaliar a influência de fatores edafoclimáticos sobre a diversidade rizobiana e selecionar estirpes eficientes na FBN para o feijão-caupi, provenientes de solos da região semiárida de Pernambuco.

2. REFERÊNCIAS

AGBICODO, E. M.; FATOKUM, C. A.; MURANAKA, S.; VISSER, R. G. F.; LINDER VAN DER, C. G. Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishments, and future prospects. **Euphytica**, v.167, p. 353-370, 2009.

ÁGUILA, P. C. M.; Agricultura em zonas áridas y semiáridas. **Idesia**, V. 31, p. 3-4, 2013.

ARAÚJO, S. M. S. A região semiárida do nordeste do Brasil: Questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. **Revista Científica da FASETE**, n. 5, 2011.

BRITO, M. M.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C.; Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, v. 70, p. 206-215, 2011.

BRITO, L. T. L.; CAVALCANTI, N. B.; SILVA, A. S.; PEREIRA, L. A. Produtividade da água de chuva em culturas de subsistência no semiárido Pernambucano. **Engenharia Agrícola**, v. 32, p. 102-109, 2012.

CHALK, P. M; ALVES, B. J. R; BODDEY, R. M; URQUIAGA, S. Integrated effects of abiotic stresses on inoculant performance legume growth and symbiotic dependence estimated by ¹⁵N dilution. **Plant and Soil**, v. 328, p. 1-16, 2010.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbios nativos de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 161-169, 2010.

DIVITO, G. A & SADRAS, V. O. How phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. **Field Crops Research**, v. 156, p. 161-171, 2014.

ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I.; UDUPA, S. M. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium melilot* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 1-13, 2010.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Home Page. 2012. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 22 março, 2013.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi⁽¹⁾. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 911-920, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Base de dados Faostat. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 22 de março, 2013.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantina**, v. 66, p. 497-504, 2007.

GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbios em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 303-308, 2011.

HAN, T. X.; WANG, E. T.; HAN, L. L.; CHEN, W. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with wild legumes native to Xinjiang, China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, p. 287-301, 2008.

HUNGRIA, M & VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p. 151-164, 2000.

KASCHUK, G; HUNGRIA, M; SANTOS, J. C. P; BERTON-JUNIOR, J. F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v. 87, p. 205-217, 2006.

LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; MAGALHÃES, F.M.M.; ANDRADE, M.J.B. de; SOARES, A.L. de E.L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**, v.51, p.67-82, 2004.

LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, R. S.; XAVIER, J. G.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M.V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco river valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1215-1226, 2009.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S.; Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 11, p. 1095-1104, 2005.

MARTINS, A. F.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SAMPAIO, J. A. T.; ARAÚJO, J. H. B.; TURCATEL, A. T.; DIEMER, G. D.; SÁ, E. L. S. Diversidade genética, tolerância aos fatores de acidez e eficiência simbiótica de rizóbios para cornichão de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1855-1864, 2011.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, p. 1005-1010, 1997.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios de caupi cultivados em solos do estado do Rio Grande do Norte. **Maringá**, v. 31, p. 529-535, 2009.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. Nova delimitação do semiárido brasileiro. Disponível em: <http://www.integração.gov.br>. Acessado em 14 de setembro, 2009.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SARR, P. S.; YAMAKAWA, T.; SAEKI, Y.; GUISSSE, A. Phylogenetic diversity of indigenous cowpea bradyrhizobia from soils in Japan based on sequence analysis of the 16-23s rRNA internal transcribed spacer (ITS) region. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 285-292, 2011.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbios para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 749-758, 2009.

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

ZILLI, J.É.; VALICHESKI, R.R.; RUMJANEK, N.G.; SIMÕESARAÚJO, J.L.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 811-818, 2006.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIVERSIDADE RIZOBIANA E INFLUÊNCIA DE FATORES EDAFOCLIMÁTICOS

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) que acontece graças à associação simbiótica entre rizóbios e leguminosas é um dos processos mais importantes para incorporação de N nos ecossistemas terrestres. A região semiárida tem a FBN como a principal via de entrada de N nos solos e apresenta uma elevada diversidade de rizóbios nativos adaptados as suas condições edafoclimáticas o que é primordial para a seleção de isolados mais eficientes na FBN (Zahran, 2001; Teixeira et al., 2010; Zahran, 1999).

Já se sabe que a diversidade da comunidade microbiana do solo é muito elevada podendo ser influenciada por fatores bióticos e abióticos. Por exemplo, Fierer & Jackson (2006), estudando a diversidade bacteriana em solos de diferentes ecossistemas observaram a influência de variáveis como o pH sobre a diversidade bacteriana.

Outros estudos também relacionam a influência das condições edafoclimáticas sobre a diversidade microbiana em solos de regiões semiáridas. Lançoni et al. (2013) e Pasternak et al. (2013), verificaram que fatores como disponibilidade de água, textura, teor de matéria orgânica e disponibilidade de nutrientes exerceram influência sobre a diversidade. Já a diversidade genética de isolados rizobianos em solos de regiões de clima semiárido da África, Ásia e América Latina, foi altamente correlacionada com o pH e acidez trocável, respectivamente ($r^2=0,666$ e $r^2=0,676$). O estresse da acidez proporcionou uma pressão seletiva com o domínio das estirpes mais tolerantes nestes solos (Bala et al., 2003a).

Em solos de diferentes regiões da província de Hebei da China foi observado que o pH exerceu influência sobre a diversidade rizobiana. Espécies de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, foram isoladas a partir de solos com $\text{pH} \leq 7,96$, e estirpes de *B. yuanmingense* foram isoladas de solos com pH superior a 8,19. Estes resultados indicam que a nodulação das espécies de *B. japonicum* e *B. elkanii* foi inibida em condições de solos alcalinos e que a espécie de *B. yuanmingense* foi mais tolerante a alcalinidade (Li et al., 2011).

Atualmente sabe-se que a diversidade bacteriana de uma determinada região pode ser estudada por meio da avaliação de dois componentes: (1) riqueza das espécies e (2) uniformidade (Bezerra, 2009). A riqueza das espécies é relacionada ao número total de espécies presentes no solo de uma determinada região, enquanto a uniformidade é baseada na abundância relativa de espécies e no grau de dominância. Alguns índices de diversidade como os de Shannon-Weaver, dominância de Simpson, riqueza de Margalef e uniformidade de Pielou (Hammer et al., 2001), são utilizados para compreender como uma determinada comunidade microbiana se comporta frente a alguma alteração natural ou por ação antrópica.

O estudo da diversidade de rizóbios pode ser realizado baseando-se em técnicas que fazem a caracterização morfofisiológica ou genética das bactérias. A caracterização morfofisiológica é geralmente o primeiro passo para identificação de novos grupos, podendo indicar diferenças morfológicas e fisiológicas importantes entre os microrganismos, permitindo assim, uma análise prévia da diversidade quando se trabalha com um número muito grande de isolados, além de ser uma técnica rápida e com o custo relativamente baixo (Jesus et al., 2005; Chagas Junior et al., 2009).

3.2 EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA NO FEIJÃO-CAUPI E INFLUÊNCIA DE FATORES EDAFOCLIMÁTICOS

O feijão-caupi é uma leguminosa de grãos com alto potencial produtivo e grande importância social e econômica, principalmente para as regiões norte e nordeste do Brasil (Freire et al., 2005; Santos et al., 2000). Apesar de seu alto potencial produtivo e de sua importância o rendimento médio da cultura é baixo nessas regiões, cerca de 300 a 400 kg ha⁻¹. Um dos fatores responsáveis pela baixa produtividade do caupi em solos de regiões tropicais é a deficiência de nutrientes, principalmente de nitrogênio (Pereira Junior, 2012).

O nitrogênio é um dos elementos mais abundantes na natureza apresentando a atmosfera como seu principal reservatório na forma de N₂. Porém, o N₂ não é disponível à maioria dos organismos vivos, já que a ligação tripla covalente entre os dois átomos de N torna este gás extremamente estável. Dentre as principais vias de entrada de N assimilável

nos ecossistemas terrestres destaca-se a fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada por micro-organismos simbióticos e de vida livre (Reed et al., 2011).

O feijão-caupi pode se beneficiar da associação simbiótica com rizóbios, sendo a FBN uma alternativa viável para o aumento de produtividade da cultura, proporcionando ganhos econômicos e ambientais (Almeida et al., 2010). Contudo, existe a necessidade de se obter rizóbios eficientes e adaptados às condições edafoclimáticas do ambiente de cultivo. A eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio depende de fatores genéticos inerentes aos simbiontes, como também de sua interação com os fatores edafoclimáticos (Xavier et al., 2006). Hungria & Vargas (2000b), relataram que fatores ambientais como a alta temperatura, estresse hídrico e acidez em solos tropicais podem afetar a nodulação e a FBN, prejudicando principalmente o crescimento e a sobrevivência dos rizóbios no solo. Chemining'wa et al. (2011), avaliando a população de rizóbios nativos em solos do Quênia, observaram que o solo com menores pH e conteúdo de fósforo apresentou menor população de rizóbios e nodulação em caupi, relatando que esses fatores podem ter afetado a sobrevivência dos rizóbios e a nodulação das leguminosas.

Uma forma de se obter estirpes eficientes na FBN é explorar a diversidade da população nativa de rizóbios de regiões com diferentes condições edafoclimáticas (Guimarães et al., 2012; Mathu et al., 2012). Para o caupi, algumas pesquisas têm mostrado a presença de estirpes nativas com elevado potencial de FBN e adaptadas às condições edafoclimáticas. Fening & Danso (2002), verificaram a presença de isolados nativos em solos de diferentes regiões de Gana com eficiência simbiótica superior a estirpe referência TAL 169 recomendada para feijão-caupi. Já Martins et al. (2003), observaram que as estirpes isoladas de solos do nordeste brasileiro com capacidade de estabelecer uma simbiose eficiente com o feijão-caupi, apresentaram rendimentos de grãos semelhantes ao de plantas que receberam adubação de 50 kg. ha⁻¹ de N, enquanto Rufini et al. (2014), observaram a presença de rizóbios nativos eficientes na FBN para o feijão-caupi em solos de Minas Gerais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do solo foi realizada em 2010 em onze municípios representativos do semiárido pernambucano: Santa Cruz, Parnamirim, Serra Talhada, Sertânia, Petrolina, Floresta, Tupanatinga, Jataúba, Santa Cruz do Capibaribe, Bom Jardim e Caetés, com amostras obtidas em cada classe de solo do município, com base no Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco – ZAPE (SILVA et al., 2001).

As amostras foram coletadas na camada de 0-0,1m de profundidade, nas diferentes classes de solos, sendo amostrados de três a cinco sites, em cada classe de solo, variando o número de sites de amostragem de acordo com a área ocupada pela classe de solo, totalizando 299 sites de coleta para os onze municípios amostrados. Em cada site foi identificada a presença de plantas de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes* e *Macroptilium* e a ausência de plantas em alguns sites, sendo coletadas amostras de solo próximas a estas, ou em sua ausência, amostras aleatoriamente escolhidas. Estas amostras foram divididas, sendo uma parte conservada em refrigerador a aproximadamente 4°C até a inoculação das plantas para a obtenção de nódulos. O restante das amostras foi utilizado para a formação de amostras compostas para cada site de coleta. As amostras compostas foram peneiradas para a realização das análises químicas e físicas segundo metodologia da Embrapa, (1999). Os dados climáticos foram obtidos junto à Agência Pernambucana de Águas e Clima/APAC.

Foi realizada uma análise de agrupamento com base nas características químicas e físicas do solo para a seleção de amostras representativas para a fase de isolamento, utilizando o SAS 9.2. Ao nível de 50% de similaridade foram obtidos oito grupos de solos, sendo selecionados os dois mais diferentes para suas características químicas e físicas. Um grupo de solos com alta fertilidade foi formado por solos dos municípios de Floresta, Santa Cruz do Capibaribe e Parnamirim, enquanto outro grupo de solos com baixa fertilidade foi formado por solos dos municípios de Caetés, Petrolina, Sertânia, Santa Cruz e Tupanatinga (Tabela 1). As características climáticas, classe de solos e cobertura vegetal dos grupos de alta e baixa fertilidade estão na Tabela 2.

Tabela 1- Características químicas e físicas dos grupos de solos utilizados para a obtenção de nódulos com médias e intervalos de confiança a 95%.

GRUPOS DE SOLOS	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS											
	PH Água	K	Ca	Mg	Na	Ca+Mg	H+Al	SB	T	P	M.O	V
	----- Cmol _c dm ⁻³ -----					-----			mg dm ⁻³ g kg ⁻¹		%	
Alta Fertilidade	7,7± 0,2	0,3± 0,2	14,4± 4,8	1,5± 2,9	0,4± 0,2	13,7± 7,6	2,3± 0,3	16,9± 5,9	19,2± 5,7	33,3± 41,3	12,4± 5,6	86,9± 5,9
Baixa Fertilidade	5,04± 0,6	0,15± 0,12	1,9± 1,3	0,8± 0,7	0,08± 0,1	2,4± 1,7	3,2± 0,9	2,9± 1,8	6,2± 1,4	7,6± 5,3	8,2± 3,9	45,3± 22,3
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS												
	AREIA	SILTE		ARGILA		CLASSE TEXTURAL						
	----- dg/kg -----											
Alta Fertilidade	684± 167	206± 69		109± 89		Franco arenoso						
Baixa Fertilidade	817± 83	103± 52		79± 61		Areia franca						

Médias e intervalo de confiança de todos os solos.

Tabela 2 - Características climáticas, classes de solos e cobertura vegetal das áreas amostradas.

Grupos de Solos	Classe de solos	Cobertura vegetal	Precipitação (mm)	Temperatura °C (Max)	Temperatura °C (Min)
Alta Fertilidade			(mm)	(Max)	(Min)
Floresta	T	Stylosanthes	566	36,3	19,1
Santa Cruz do Capibaribe	T	Solo	715	34	18,3
Floresta	PVA	Solo	566	36,3	19,1
Floresta	S	Solo	566	36,3	19,1
Parnamirim	RL	Macroptilium	488	34,8	17,6
Parnamirim	T	Macroptilium	488	34,8	17,6
X±Y			564,8± 88,67	35,41± 1,07	18,46± 0,7
Baixa Fertilidade			(mm)	(Max)	(Min)
Petrolina	S	Macroptilium	322	36,3	18,8
Sertânia	PVA	Stylosanthes	647	34,7	15,4
Tupanatinga	RR	Macroptilium	1116	32,3	11,7
Caetés	RQ	Stylosanthes	1116	32,3	11,7
Santa Cruz	LA	Stylosanthes	684	34,9	18,8
Tupanatinga	RQ	Stylosanthes	1116	32,3	11,7
X±Y			833,5± 35,7	33,8± 1,8	14,6± 3,7

Legenda: X±Y, onde X = médias e Y= Intervalo de confiança; T: Luvissole; PVA: Argissolo Vermelho-Amarelo; S: Planossolo; RL: Neossolo Litólico; RR: Neossolo Regolítico; RQ: Neossolo Quartzarênicos; LA: Latossolo Amarelo.

Um experimento foi conduzido em fevereiro de 2013 para a obtenção de nódulos com três repetições e seis amostras para cada grupo de solo e dois controles não inoculados, um sem N e outro com N, totalizando 42 unidades experimentais. Sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) variedade IPA 206, foram imersas em álcool 95% por 30 segundos e posteriormente em hipoclorito de sódio a 5% por 3 minutos, e lavadas com água destilada esterilizada por 10 vezes.

Quatro sementes foram colocadas para germinar em vasos de Leonard (Santos et al., 2009), contendo areia e vermiculita autoclavada (proporção 2:1) e recebendo solução nutritiva de Hoagland, sem nitrogênio (Hoagland & Arnon, 1950). Cada semente foi inoculada com dois gramas de solo das amostras selecionadas anteriormente. Após sete dias da germinação das sementes realizou-se o desbaste deixando-se apenas duas plantas por vaso. As plantas foram colhidas aos 45 dias e os nódulos foram separados e acondicionados em tubos com sílica gel para a conservação e posterior isolamento.

Foram isolados de quatro a cinco nódulos por vaso, escolhidos aleatoriamente, seguindo o procedimento sintetizado em Hungria (1994). Os nódulos amostrados foram reidratados, imersos em álcool 95% por 30 segundos, seguidos por imersão em hipoclorito de sódio a 5% por três minutos, e lavados com água destilada esterilizada por dez vezes sucessivas. O isolamento foi conduzido em placas de Petri em meio YMA, com azul de bromotimol (Vicent, 1970).

A caracterização morfológica dos isolados foi baseada na velocidade de aparecimento das colônias isoladas (rápida, intermediária, lenta), diâmetro (> 2mm; <2mm), cor (incolor; creme; branca; rosa; amarela), forma (circular; irregular; puntiforme), elevação (plana; lenticulada; convexa; umbonada; côncava; drop-like), borda (inteira; ondulada; lobada; denteada; filamentosa), superfície (lisa; rugosa; papilada), produção de muco (escasso; pouco; moderado; abundante), transparência do muco (opaco; transparente; translucido), consistência do muco (aquosa; seca; viscosa; gomosa; butirica), elasticidade do muco (sem; com) e modificação do pH do meio de cultura (ácido; neutro; alcalino) (Vicent, 1974; Silva et al., 2007).

Foi constituída uma matriz binária com presença (1) e ausência (0) das características, seguida por agrupamento para cada grupo de solo. Este

agrupamento foi realizado com base no índice de Jaccard, utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Analysis), através do software PAST (Hammer et al., 2001). Os agrupamentos foram usados para determinar os índices de diversidade de Shannon-Weaver, dominância de Simpson, riqueza de Margalef e uniformidade de Pielou, também calculados pelo software PAST. Para a comparação entre as características morfológicas dos isolados dos grupos de solos de alta e baixa fertilidade foi utilizado o teste de qui-quadrado. Também foi realizada uma análise de correlação linear entre as características físicas, químicas, climáticas e os índices de Shannon-Weaver, Pielou, Simpson e Margalef, com o software Statística 7.0.

Para a autenticação dos isolados um experimento foi conduzido em casa de vegetação. Duas sementes de feijão-caupi, variedade IPA 206, foram desinfestadas e colocadas para germinar em vasos de Leonard, contendo areia e vermiculita autoclavada (proporção 2:1) e recebendo solução nutritiva de Hoagland, sem nitrogênio (Hoagland & Arnon, 1950). Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados com três repetições e 136 tratamentos. Os tratamentos foram à inoculação individual de 134 isolados e dois controles não inoculados, um sem N e outro com N. Os 134 isolados (68 do grupo de alta fertilidade e 66 do de baixa fertilidade) foram selecionados aleatoriamente dentro de agrupamento morfofisiológico previamente formado a 80% de similaridade, para cada grupo de solo.

As plantas foram colhidas aos 45 após o plantio, a massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSSR), número (NN) e massa seca de nódulos (MSN), foram avaliadas. Os dados foram submetidos à análise de variância com as médias comparadas pelo teste de Dunnett comparando com o controle não inoculado.

Para a avaliação da eficiência simbiótica, apenas 25 isolados foram selecionados, por apresentarem diferenças significativas na matéria seca da parte aérea, sendo 21 provenientes do grupo de solo de baixa fertilidade (BF) e apenas 4 do grupo de solo de alta fertilidade (AF).

Um experimento foi conduzido em casa de vegetação em sacos de polietilenos contendo 1,5 kg da mistura de areia e vermiculita autoclavada, recebendo solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio (HOAGLAND e ARNON, 1950). A variedade de feijão-caupi utilizada foi a IPA 206 e as sementes foram desinfestadas como descrito anteriormente. Após a

desinfestação foram semeadas duas sementes por vaso e, posteriormente, foi realizada a inoculação com 1,0 ml do meio de cultura líquido contendo a bactéria em cada semente.

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro repetições e 29 tratamentos. Os tratamentos foram a inoculação individual dos 25 isolados citados anteriormente, um controle absoluto sem N e sem inoculação e dois tratamentos não inoculados, mas fertilizados com 60 e 90 kg ha⁻¹ de N, além de um tratamento com a estirpe referência de *Bradyrhizobium*, BR 3267 (SEMIA 6462).

As plantas foram colhidas 45 dias após o plantio, a massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSSR), número (NN), massa de nódulos secos (MSN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), foram avaliadas e a eficiência relativa (ER) e biomassa específica de nódulos (BEN), calculadas pelas expressões:

$$ER = \left(\frac{\text{MSPA dos tratamentos inoculados}}{\text{MSPA do tratamento de } 90 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}} \right) \times 100$$

$$BEN = \left(\frac{\text{MSN}}{\text{NN}} \right)$$

Os dados foram submetidos à análise de variância com as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.3 (Ferreira, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 109 isolados foi obtido a partir de nódulos de feijão-caupi, dos quais 51 isolados foram provenientes do grupo de solo de alta fertilidade e os demais do grupo de solo de baixa fertilidade.

De uma maneira geral, os isolados rizobianos apresentaram crescimento rápido (70%), reação ácida (56,8%) e produção de muco moderada (44,9%) ou pouca (34,8%) (Figura 1).

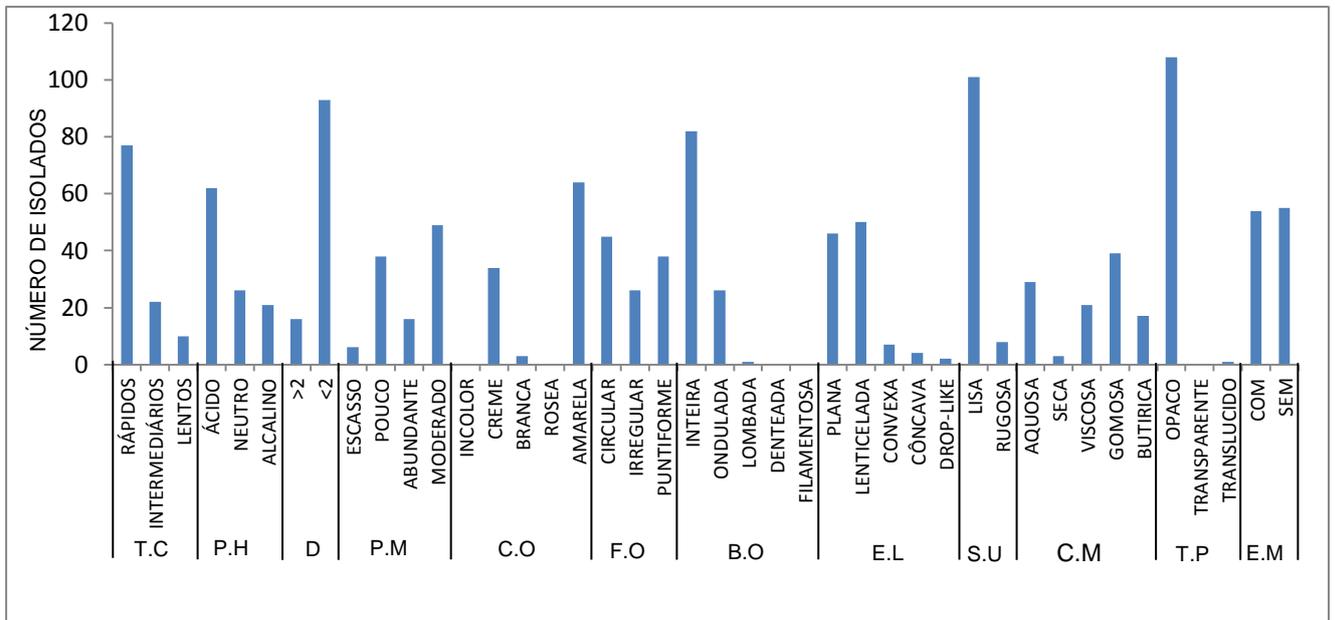


Figura 1 - Distribuição de isolados obtidos dos grupos de solos de alta e baixa fertilidade baseado nas características morfológicas. Taxa de crescimento (T.C); PH do meio (PH); diâmetro (D); produção (P.M); consistência (C.M); elasticidade (E.M); transparência do muco (T.P); cor (C.O); forma (F.O); borda (B.O); elevação (E.L) e superfície da colônia (S.U).

A presença de isolados rizobianos com crescimento rápido e acidificação do meio é comum em solos de regiões semiáridas e pode ser uma estratégia de sobrevivência e adaptação dos isolados as condições edafoclimáticas desta região (Santos et al., 2007; Medeiros et al., 2009; Leite et al., 2009; Teixeira et al., 2010).

Ainda que nos dois grupos de solo a maioria dos isolados tenha apresentado crescimento rápido e acidificação do meio de cultura, no grupo de baixa fertilidade, foi observado um maior número de isolados de crescimento lento, com reação de pH neutro e alcalino, comparado ao de alta fertilidade (Figura 2 e 3), com diferenças significativas entre os grupos pelo teste de qui-quadrado ($P < 0,01$). A presença de alguns isolados com crescimento lento e reação de pH neutro e alcalino no grupo de solos da baixa fertilidade, indica que estes isolados tiveram a capacidade de adaptação e sobrevivência a estas condições de solo e clima. Norris (1965) constatou que rizóbios de crescimento lento que alcalinizam o meio podem habitar solos de áreas tropicais, ácidos e de baixa fertilidade e que rizóbios de crescimento rápido que acidificam o meio podem colonizar solos de áreas temperadas, neutros a alcalinos.

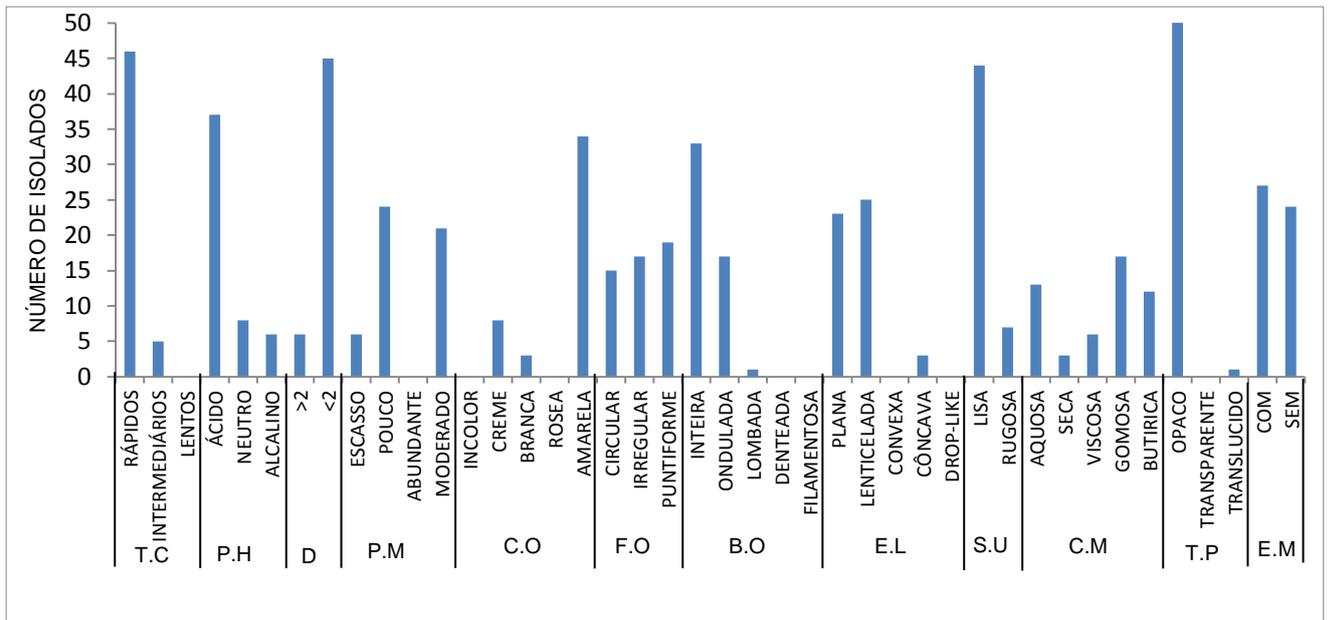


Figura 2 - Distribuição de isolados obtidos do grupo de solo de alta fertilidade baseado nas características morfológicas. Taxa de crescimento (T.C); PH do meio (PH); diâmetro (D); produção (P.M); consistência (C.M); elasticidade (E.M); transparência do muco (T.P); cor (C.O); forma (F.O); borda (B.O); elevação (E.L) e superfície da colônia (S.U).

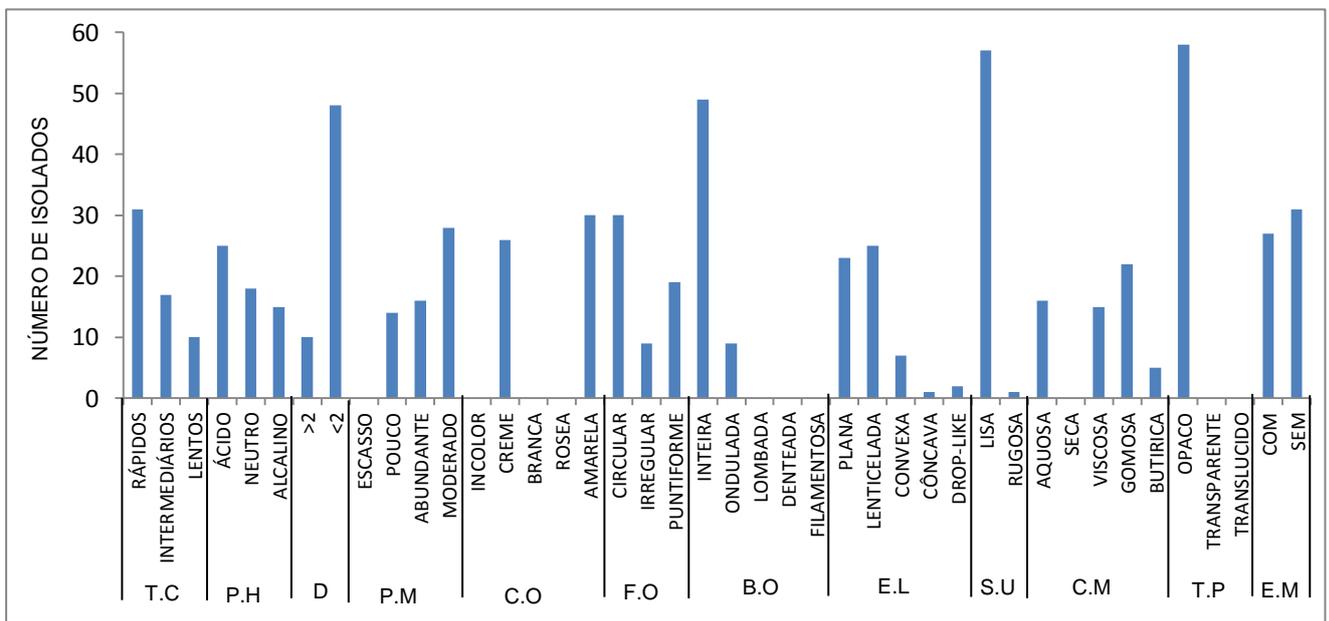


Figura 3 - Distribuição de isolados obtidos do grupo de solo de baixa fertilidade baseado nas características morfológicas. Taxa de crescimento (T.C); PH do meio (PH); diâmetro (D); produção (P.M); consistência (C.M); elasticidade (E.M); transparência do muco (T.P); cor (C.O); forma (F.O); borda (B.O); elevação (E.L) e superfície da colônia (S.U).

O grupo de solo de baixa fertilidade apresentou maiores valores para os índices Shannon-Weaver (4,03) e riqueza de Margalef (13,97), comparado ao grupo de alta fertilidade com Shannon-Weaver no valor de (3,93) e riqueza de Margalef (12,72) (Tabela 3). Para o índice de Simpson não foi observada diferença entre os dois grupos de solos, já o índice de Pielou foi maior para o grupo de solo de alta fertilidade.

Tabela 3 - Índices de diversidades (Shannon-Weaver), dominância (Simpson), equitabilidade (Pielou) e riquezas de espécies (Margalef) dos isolados de solos de alta e baixa fertilidade.

ÍNDICES DE DIVERSIDADE				
Grupos de Solos	Shannon-Weaver	Pielou	Simpson	Margalef
Alta fertilidade	3,93	1	0,98	12,72
Baixa fertilidade	4,03	0,9	0,98	13,97

Leite et al. (2009) estudando a diversidade rizobiana em solos coletados no Vale do São Francisco, estado de Pernambuco, verificaram índices de diversidade de Shannon variando entre 2,47 e 3,88 e de riqueza de Margalef entre 3,44 e 5,03, valores inferiores aos do presente estudo. É provável que as diferenças entre as propriedades químicas e físicas dos dois grupos de solos tenham exercido influência na diversidade rizobiana. Alguns estudos relatam a influência de fatores edafoclimáticos sobre a diversidade de bactérias no solo, incluindo bactérias fixadoras de nitrogênio, Zhang et al. (2006), avaliando a diversidade molecular de bactérias fixadoras de nitrogênio em diferentes locais da província de Qinghai, China, observaram maior diversidade para o local que apresentou maior concentração de carbono orgânico e de nitrogênio. Este resultado contrasta com o presente estudo já que o grupo de alta fertilidade, com maior conteúdo de matéria orgânica, apresentou menor diversidade. Isto pode ser explicado pela mineralização desta matéria orgânica resultando na liberação de nutrientes, entre estes, o nitrogênio que pode limitar a FBN, proporcionando uma redução na simbiose entre rizóbios e plantas com uma diminuição da diversidade rizobiana (Caballero-Mellado & Martinez-Romero,

1999). Já Andrade et al. (2002) e Bala et al. (2003b), observaram relação entre a diversidade rizobiana o pH e acidez trocável do solo.

Os principais fatores edafoclimáticos que apresentaram correlações significativas com os índices de diversidade de Shannon-Weaver, Pielou e riqueza de Margalef, foram os conteúdos de argila, que se correlacionou positivamente, e de fósforo que se correlacionou negativamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de correlações lineares entre os parâmetros dos solos e os índices de diversidade que apresentaram significância.

ÍNDICES DE DIVERSIDADE			
Fatores do Solo	Shannon-Weaver	Pielou	Margalef
Argila	0,60	0,67	0,59
Fósforo	-0,75	-0,74	-0,65

Giongo et al. (2008), avaliando a diversidade genética de estirpes de *Bradyrhizobium* em solos de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, verificaram que a argila esteve entre os principais parâmetros do solo que exerceram influência sobre a diversidade rizobiana. Sessitsch et al. (2002), observaram que solos com maior conteúdo de argila, apresentavam maior diversidade de bactérias. De acordo com Bashan et al. (1995), o teor de argila esta entre os parâmetros do solo que exerce influência positiva na sobrevivência e proliferação de bactérias do solo. Palmer & Young (2000), avaliando a diversidade genética de rizóbios em solos de quatro fazendas com diferentes características químicas do condado de Yorkshire, verificaram relações negativas entre a diversidade e o conteúdo de fósforo e nitrogênio, com o solo com maior teor de fosfato apresentando índice de Shannon de 1,54 e Simpson de 0,62, enquanto o solo com maior conteúdo de nitrogênio, apresentou Shannon de 0,28 e Simpson de 0,08. Provavelmente, os elevados níveis de nutrientes destes solos podem ter exercido efeito na diminuição da nodulação, afetando assim a diversidade rizobiana. Zhang et al. (2011), também constataram a influência do conteúdo de nitrogênio com maior efeito e do conteúdo de fósforo e potássio com menor efeito sobre a diversidade rizobiana.

De modo geral no experimento de autenticação, entre os 134 isolados avaliados, apenas 25 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$), em relação ao controle sem inoculação e sem N, para a matéria seca da parte aérea (MSPA), sendo a maioria destes isolados oriundos do grupo de solo de baixa fertilidade, com exceção dos isolados AF.2, AF.1, AF.62 e AF.99, que pertencem ao grupo de solo de alta fertilidade. Com relação à matéria seca do sistema radicular (MSSR), apenas os isolados BF.79 e BF.102, tiveram diferenças significativas ($p < 0,01$), em relação ao controle sem inoculação e sem N (0N.SI), sem diferenças significativas ($p > 0,01$), para o controle com N e sem inoculação (CN.SI). Para matéria seca de nódulos (MSN) e número de nódulos (NN), os 25 isolados se diferenciaram significativamente ($p < 0,01$), dos dois controles sem inoculação, com e sem N (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN) e número de nódulos (NN), dos 25 isolados com melhores desempenhos no experimento de autenticação, quando comparados ao controle pelo teste de Dunnett.

Tratamentos	MSPA ------(g/vaso)-----	MSSR	MSN (mg/vaso)	NN
BF.79	3,47a	0,52a	259a	75,33a
BF.25	2,64a	0,34b	551a	113,6a
BF.77	3,12a	0,39b	405a	92,33a
BF.85	2,46a	0,41b	517a	145,6a
BF.99	2,28a	0,28b	673a	118a
BF.68	3,30a	0,40b	866a	120,3a
BF.118	3,51a	0,49b	545a	114,6a
BF.102	2,94a	0,52a	668a	86a
BF.12	3,46a	0,49b	799a	133,6a
BF.7	2,65a	0,43b	531a	91a
BF.32	1,91a	0,25b	848a	100,3a
BF.109	2,73a	0,36b	490a	82,3a
BF.18	3,52a	0,39b	602a	111a
BF.69	2,41a	0,43b	393a	102,3a
AF.2	2,65a	0,34b	1281a	154a
BF.45	3,31a	0,45b	1053a	184,6a
BF.14	2,39a	0,33b	286a	78,6a
BF.23	2,64a	0,39b	898a	117,6a
BF.103	3,16a	0,28b	140a	27,33a
BF.13	2,49a	0,38b	401a	107,3a
BF.64	2,79a	0,44b	509a	101,3a
AF.1	2,83a	0,41b	490a	114,3a
AF.62	1,04a	0,46b	660a	87,6a
BF.3	2,57a	0,36b	420a	45,3a
AF.99	2,36a	0,43b	323a	93,3a
0N.SI	0,34b	0,18b	0b	0b
CN.SI	3,33a	0,78a	0b	0b

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente ($P < 0,01$) pelo teste de Dunnett, Dados de MSPA, MSSR, MSN, NN transformados em Log10.

Na eficiência simbiótica 20 isolados do grupo de solo de baixa fertilidade (BF), e apenas 1 isolado do grupo de alta fertilidade, o (AF.2), não se diferenciaram estatisticamente ($p > 0,05$) das testemunhas com N (60 e 90 N) e da estirpe referência BR 3267, com maiores valores para os isolados BF.79, BF.25 e BF.77 para MSPA, enquanto os demais não se diferenciaram entre si ou do controle não inoculado e sem nitrogênio. Com exceção aos isolados BF.14, BF.23, BF.64, BF.13 que não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) em relação ao controle não inoculado e não fertilizado, o mesmo ocorreu para MSSR, sugerindo que estes isolados não exerceram influência sobre o crescimento radicular no feijão-caupi. Para NN e MSN os isolados AF.1, AF.99 e BF.3 tiveram os menores valores sem diferenças significativas ($p > 0,05$). Todos os isolados que apresentaram maior MSPA, mais o isolado AF.62, tiveram maior NN e MSN. Praticamente todos os isolados com maior MSPA, NN e MSN, foram oriundos do grupo de solo de baixa fertilidade, com exceção de AF.2 e AF.62. Já os isolados com os menores valores de MSPA, NN e MSN são pertencentes ao grupo de solo de alta fertilidade, com exceção do isolado BF.3 (Tabela 6).

Outros resultados também indicam que isolados obtidos de solos menos férteis tendem a ser mais eficientes. Por exemplo, isolados de solos ácidos, foram mais eficientes para FBN no feijão, sendo que o isolado PRF 81 proporcionou os melhores valores para número e matéria seca de nódulos e conteúdo de nitrogênio, respectivamente ($141 \text{ n.planta}^{-1}$, $224 \text{ mg. planta}^{-1}$, $99,7 \text{ mg. planta}^{-1}$) que a estirpe de *Rhizobium tropici* CIAT 899 ($128 \text{ n.planta}^{-1}$, $191 \text{ mg.planta}^{-1}$, $85 \text{ mg.planta}^{-1}$) (Hungria et al., 2000a). Isolados rizobianos, oriundo de um Latossolo Vermelho-Amarelo de baixa fertilidade, também foram mais eficientes proporcionando maior número e matéria seca de nódulos e eficiência relativa em feijão-caupi, respectivamente ($84,87 \text{ n. planta}^{-1}$, $394 \text{ mg. planta}^{-1}$, $72,86 \text{ dag/kg}$) do que isolados oriundos de um Argissolo Vermelho-Amarelo com boa fertilidade ($33,75 \text{ n. planta}^{-1}$, $385 \text{ mg. planta}^{-1}$, $64,84\%$) (Lacerda et al., 2004).

Tabela 6. Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), biomassa específica de nódulos (BEN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER) de diferentes isolados de feijão-caupi, obtidos de solos de municípios do semiárido Pernambucano.

Tratamentos	MSPA ------(g/vaso)-----	MSSR (mg/vaso)	MSN (mg/vaso)	NN	BEN (mg)	ANPA (g/kg)	ER %
BF.79	4,78a	0,48a	416,25a	189,25a	2,22a	30,23a	92,97a
BF.25	4,78a	0,44a	387,75a	227,25a	1,77a	35,88a	114,16a
BF.77	4,73a	0,42a	377a	225,25a	1,89a	34,72a	108,09a
BF.85	4,31a	0,48a	434,5a	258,75a	1,82a	28,33a	95,09a
BF.99	4,3a	0,49a	354,54a	280,25a	1,81a	28,02a	100,07a
BF.68	4,22a	0,46a	304,5a	203,75a	1,83a	29,71a	101,68a
BF.118	4,13a	0,5a	307,75a	217,25a	1,75a	27,53a	100,04a
BF.102	4,1a	0,45a	457,25a	242,75a	1,89a	27,6a	100,72a
BF.12	4,17a	0,48a	316,75a	187,75a	1,63a	30,44a	111,11a
BF.7	4,09a	0,39a	246,52a	257,25a	1,65a	28,08a	102,76a
BF.32	3,98a	0,42a	362a	169,75a	2,39a	28,57a	110,57a
BF.109	3,98a	0,37a	334a	158a	2,10a	24,37a	91,18a
BF.18	3,94a	0,41a	305,75a	199,5a	2,26a	30,72a	118,6a
BF.69	3,75a	0,41a	302,5a	210,75a	1,84a	25,21a	102,34a
AF.2	3,85a	0,43a	340,5a	237a	1,46a	24,49a	97,04a
BF.45	3,62a	0,4a	251,49a	211a	1,66a	26,4a	109,23a
BF.14	3,47a	0,3b	226,33a	163,33a	1,83a	24,16a	108,95a
BF.23	3,25a	0,31b	266a	204,5a	1,65a	22,98a	100,09a
BF.103	3,28a	0,37a	325,5a	200,25a	2,24a	22,54a	100,56a
BF.13	2,5a	0,34b	251,75a	129,25a	2,06a	17,79a	99,68a
BF.64	2,5a	0,29b	233a	139,5a	1,72a	16,07a	93,75a
AF.1	2,02b	0,35b	160,95b	70,5b	1,83a	13,31b	71,15a
AF.62	1,51b	0,27b	213a	64a	3,17a	9,92a	95,98a
BF.3	1,3b	0,27b	132,5b	55b	2,00a	7,43c	68,87a
AF.99	0,53b	0,25b	45,75b	9,5b	3,10a	1,75c	49,98b
90N	4,49a	0,61a	0,00c	0,00c	0,00b	30,57a	100a
60N	2,4a	0,52a	0,00c	0,00c	0,00b	14,33a	85,97a
BR3267	3,83a	0,43a	380,75a	209a	1,91a	24,24a	100,04a
0N.SI	0,78b	0,24b	0,00c	0,00c	0,00b	1,4c	29,82c
CV (%)	15,79	4,55	15,74	19,91	20,54	23,27	4,69

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Skott Knott. Dados de MSPA, MSSR, BEN transformados em raiz quadrada e MSN, NN, ANPA e ER transformados em Log10.

Quanto à biomassa específica de nódulos (BEN), não houve diferença significativa entre qualquer dos 25 isolados e a estirpe referência BR 3267 ($p > 0,05$). Os maiores valores foram observados para os isolados AF.62 e AF.99, mas apesar do isolado AF.99 apresentar bom desempenho para BEN, não demonstrou bom desempenho para MSPA, ANPA e ER. Freitas et al. (2011), observaram que a quantidade de nitrogênio fixado não foi explicada pela biomassa específica dos nódulos, já que a maior quantidade de nitrogênio

fixado (375 mg) foi obtida por isolados, de um Planossolo Háplico do semiárido Paraibano, com menor biomassa específica de nódulos (3,10 mg nódulos⁻¹). O fato de isolados rizobianos com melhores desempenhos simbióticos serem oriundos de solo de baixa fertilidade pode ser explicado pela condição de estresse da baixa fertilidade dos solos, favorecendo assim uma interação simbiótica entre plantas e rizóbios adaptados e mais eficientes quanto a FBN.

Com relação ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), 22 isolados se destacaram por proporcionarem os maiores acúmulos deste nutriente com valores semelhantes aos tratamentos com N mineral e a estirpe referência BR 3267, com a grande maioria pertencente ao grupo de solo de baixa fertilidade. Pode-se verificar que os isolados BF.25, BF.77 e BF.18, proporcionaram acúmulo de N na parte aérea maior que o tratamento nitrogenado com a dose de 90 kg N ha⁻¹, e a estirpe referência BR 3267 (tabela 6), sem diferenças significativas ($p > 0,05$), estes também estavam no grupo de isolados com melhores valores para NN, MSN e MSPA. Os isolados BF.3 e AF.99, apresentaram o pior desempenho para o ANPA, sem diferenças significativas ($p > 0,05$), em relação a testemunha absoluta (0N.SI). Outros estudos também indicam a presença e adaptação de isolados com bom desempenho em ANPA em condições de baixa fertilidade de solo. Isolados nativos S-370 e S-372 de solo do cerrado com baixa fertilidade, proporcionaram maior teor de N por planta, respectivamente (108 e 97 mg de N planta⁻¹), que a estirpe de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 566 (68 mg de N planta⁻¹), em soja (Hungria et al., 1998). Em experimento de eficiência simbiótica em campo em solo ácido de baixa fertilidade com feijão-caupi a estirpe INPA 03-11b, apresentou melhor desempenho em ANPA (436,42 mg. planta⁻¹), que outras estirpes avaliadas (Soares et al., 2006).

Para a ER (%) dos 25 isolados avaliados, 24 apresentaram desempenhos similares ($p > 0,05$), aos tratamentos com N mineral (60 e 90 kg ha⁻¹) e a estirpe referência BR 3267. O pior desempenho foi apresentado pelo isolado AF.99, sendo superior apenas ao tratamento testemunha absoluta (0N.SI). Este mesmo isolado também apresentou pior desempenho para NN, MSN, MSPA e ANPA. Os isolados BF.18 e BF.25 apresentaram os maiores valores para ER(%), respectivamente (118,6 e 114,16%). Estes também, se destacaram entre os isolados com melhores desempenhos para NN, MSN, MSPA e ANPA. Em experimento de eficiência simbiótica com caupi em ensaio de campo em

solo com limitações na fertilidade, as estirpes testadas BR 3302 e BR 3262, apresentaram ER (%) superior a 100% e ao tratamento nitrogenado de 50 kg ha⁻¹ (Chagas Junior et al., 2010). Entretanto, estirpes oriundas de solos ácidos e de baixa fertilidade da região Amazônica, tiveram eficiência relativa entre 83 a 118%, similar a testemunha nitrogenada e as estirpes de referência recomendada para caupi INPA 03-11B, UFLA 03-84 (Lima et al., 2005).

Os isolados do grupo de solos de baixa fertilidade com destaque para BF.25, BF.77 e BF.18, que se mostraram constantes com relação ao melhor desempenho nos parâmetros de MSPA, NN, MSN, BEN, ANPA e ER, mostram-se promissores quanto a FBN para a cultura do feijão-caupi, porém estudos de eficiência agrônômica devem ser conduzidos com estes isolados, a fim de comprovar os seus potenciais.

6. CONCLUSÕES

As diferenças de diversidade encontradas entre os grupos de solos de alta e baixa fertilidade são explicadas principalmente com relação ao conteúdo de argila e fósforo.

A menor diversidade rizobiana observada para o grupo de solo de alta fertilidade pode ter sido afetada justamente pela alta fertilidade, proporcionando uma redução da simbiose entre rizóbios e plantas com uma diminuição da diversidade rizobiana neste grupo de solo.

As condições de baixa fertilidade dos solos podem ter exercido uma pressão seletiva, mantendo apenas as estirpes mais eficientes quanta a fixação de N nestes solos.

7. REFERÊNCIAS

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. v. 68, p. 4025-4034, 2002.

ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; LEITE, F. L. C.; SILVA, J. A. L. Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurgéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revistas Brasileiras de Ciências Agrárias**, v. 5, p. 364-369, 2010.

BALA, A.; MURPHY, P. J.; OSUNDE, A. O.; GILLER, K. E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, v. 22, p. 211-223, 2003a.

BEZERRA, R. V. **Biodiversidade e efetividade de rizóbios nativos de solos do semi-árido de Pernambuco em caupi (*vigna unguiculata L. Walp*)**. P. 70. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K. E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. v.12, p. 917-930, 2003b.

BASHAN, Y.; PUENTE, M. E.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M.; TOLEDO, G.; HOLGUIN, G.; FERREIRA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1938-1945, 1995.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 489-494, 2009.

CABALLERO-MELLADO, J & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. **Symbiosis**, v.26, p. 111-121, 1999.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, G. R.; CHAGAS, L. F. B. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbios inoculadas em feijão-caupi no cerrado, Gurupi-TO. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, p. 709-714, 2010.

CHEMINING'WA. G. N.; THEURI, S. W. M.; MUTHOMI, J. W. Abundance of indigenous rhizobia nodulating cowpea and common bean in central Kenyan soils. **African Journal of Horticultural Science**, v. 5, p. 92-97, 2011.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos**. Brasília EMBRAPA, 1999.

FIERER, N & JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 626-631, 2006.

FENING, J. O & DANSO, S. K. A. Variation in symbiotic effectiveness of cowpea bradyrhizobia indigenous to Ghanaian soils. **Applied Soil Ecology**, v. 21, p. 23-29, 2002.

FERREIRA, D. F. SISVAR: Um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. Feijão-caupi: Avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.281-320, 2005.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. O.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, E. R.; FRAGA, V. S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1856-1861, 2011.

GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; VARGAS, L. K.; FREIRE, J. R. J.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. **Applied Soil Ecology**, v. 38, p.261-269, 2008.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, R. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 6726-6733, 2012.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 1-9, 2001.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950.

HUNGRIA, M. **Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios**. In: HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília, Embrapa, p. 45-62, 1994.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1515-1528, 2000a.

HUNGRIA, M & VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000b.

HUNGRIA, M.; BODDEY, L. H.; SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, p. 393-399, 1998.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 769-776, 2005.

LANÇONI, M. D.; TAKETANI, R. G.; KAVAMURA, V. N.; MELO, I. S. Microbial community biogeographic patterns in the rhizosphere of two brazilian semi-arid leguminous trees. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1233-1241, 2013.

LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, R. S.; XAVIER, J. G.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M.V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco river valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1215-1226, 2009.

LI, Q. Q.; WANG, E. T.; ZHANG, Y. Z.; ZHANG, Y. M.; TIAN, C. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei province, China. **Microbiology Ecology**, v. 61, p. 917-931, 2011.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S.; Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1095-1104, 2005.

LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; MAGALHÃES, F.M.M.; ANDRADE, M.J.B. de; SOARES, A.L. de E.L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**, v.51, p.67-82, 2004.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios de caupi cultivados em solos do estado do Rio Grande do Norte. **Maringá**, v. 31, p. 529-535, 2009.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, n. 6, p. 333-339, 2003.

MATHU, S.; HERRMANN, L.; PYPERS, P.; MATIRU, V.; MWIRICHIA, R.; LESUEUR, D. Potential of indigenous bradyrhizobia versus commercial inoculants to improve cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.) and green gram (*Vigna radiata* L. wilczek.) yields in Kenya. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 58, p. 750-763, 2012.

NORRIS, D. O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, v. 22, p. 143-166, 1965.

PASTERNAK, Z.; AL-ASSHHAB, A.; GATICA, J.; GAFNY, R.; AVRAHAM, S.; MINZ, D.; GILLOR, O.; JURKEVITCH, E. Spatial and temporal biogeography of soil microbial communities in arid and semiarid regions. **Public Library of Science**, v. 8, 2013.

PALMER, K. M & YOUNG, J. P. W. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 2445-2450, 2000.

PEREIRA JUNIOR, E. B. **Adubação nitrogenada e fosfatada na cultura do feijão caupi no município de Sousa-PB**. Mossoró 2012. 69 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró.

RUFINI, M.; SILVA, M. A. P.; FERREIRA, P. A. A.; CASSETARI, A. S.; SOARES, B. L.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutradox. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, p. 115-122, 2014.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, p. 489-513, 2011.

SANTOS, C. E. de R. e S.; Bezerra, R. de V.; Freitas, A. D. S.; Seido, S. L.; Martins, L. M. V.; Rumjanek, N. G. Xavier, G. R. **Modificação de vasos de Leonard com garrafas descartáveis tipo Pet**. Comunicado Técnico. Seropédica, RJ, 2009.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SILVA, F. B. R.; SANTOS, J. C. P.; SILVA, A. B.; CAVALCANTI, A. C.; SILVA, F. H. B. B.; BURGOS, N.; PARAHYBA, R. B. V.; OLIVEIRA NETO, M. B.; SOUZA NETO, N. C.; ARAÚJO FILHO, J. C.; LOPES, O. F.; LUZ, L. R. Q. P.; LEITE, A. P.; SOUZA, L. G. M. C.; SILVA, C. P.; VAREJÃO-SILVA, M. A.; BARROS, A. H. C. **Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco. Recife: Embrapa Solos** - Unidade de Execução de Pesquisa e Desenvolvimento/Governo do Estado de Pernambuco (Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária), 2001.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, p. 16-21, 2007.

SESSETSCH, A.; HOWIESON, J. G.; PIRRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in Rhizobium research. **Critical Reviews in Plant Sciens**, v. 21, p. 323-378, 2002.

SANTOS, C. A. F.; ARAÚJO, F. P.; MENEZES, E. A. Comportamento produtivo de caupi em regimes irrigado e de sequeiro em Petrolina e Juazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2229-2234, 2000.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões. (MG) I – Caupi ⁽¹⁾. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 795-802, 2006.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 201-208, 2010.

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

VINCENT, J. M. Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. In QUISPÉL, A. **The biology of nitrogen fixation**. Amsterdam, North-Holland Publishing Company, p. 265-341, 1974.

XAVIER, J. G.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. A.; RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Revista Caatinga**, v. 19, p. 25-33, 2006.

ZAHRAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 143-153, 2001.

ZAHRAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 968-989, 1999.

ZHANG, Y. M.; LI, Y.; CHEN, W. F.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; LI, Q. Q.; ZHANG, Y. Z.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the north China plain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 6331-6342, 2011.

ZHANG, Y.; LI, D.; WANG, H.; XIAO, Q.; LIU, X. Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan Plateau, China. *FEMS Microbiol*, v. 260, p. 134-142, 2006.