



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE SOLOS E ENGENHARIA  
RURAL



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS ASSOCIADOS À  
*Vigna unguiculata* (L.) Walp.**

**JARDEL DA SILVA SOUZA**

AREIA-PB

JANEIRO DE 2018

**JARDEL DA SILVA SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS ASSOCIADOS À**  
***Vigna unguiculata* (L.) Walp.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Agronomia da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

**Orientadora**

**Dra. Adriana Ferreira Martins**

2018

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processo Técnicos da Biblioteca Setorial do CCA, UFPB,  
Campus II, Areia – PB.

**S729c Souza, Jardel da Silva.**

**Caracterização e seleção de rizóbios nativos associados à (*Vigna unguiculata*) (L.)  
Walp. / Jardel da Silva Souza. - Areia: UFPB/CCA, 2018.  
xii, 26 f. : il.**

**Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Centro de Ciências  
Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.**

**Bibliografia.**

**Orientadora: Adriana Ferreira Martins.**

**1. Feijão-caupi – Microbiologia do solo 2. Feijão macassar – Rizóbios nativos 3.  
*Vigna unguiculata* – Fixação de nitrogênio I. Martins, Adriana Ferreira (Orientadora) II.  
Título.**

**UFPB/CCA**

**CDU: 633.33**

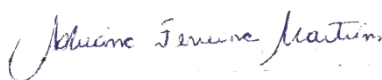
# CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS ASSOCIADOS À

*Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Agronomia da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

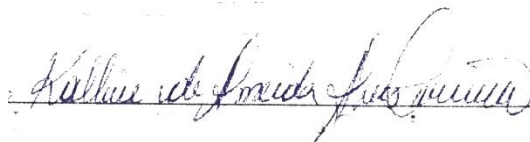
Aprovada em 24 de janeiro de 2018.

## BANCA EXAMINADORA



---

**Dra. Adriana Ferreira Martins**  
Orientadora  
PPGCS/DSER/CCA/UFPB



---

**Msc. Kalline de Almeida Alves Carneiro**  
Examinador  
PPGCS/DSER/CCA/UFPB



---

**Dr. Tancredo Augusto Feitosa de Souza**  
Examinador  
PPGCS/DSER/CCA/UFPB

Areia, PB

Janeiro de 2018

*“A maior recompensa para o trabalho de um homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.”*

(John Ruskin)

*Aos meus pais, **Maurício e Maria Marlene**, avós, **Antonio e Creuza**, tia **Rizomar**, pela educação, incentivo e apoio incondicional. Dedico esta conquista.*

A Universidade Federal da Paraíba e ao Centro de Ciências Agrárias pela oportunidade de conhecimento e formação.

Aos meus pais **Mauricio Pereira** e **Maria Marlene** e irmãos **Antonio Neto** e **Jordana**, aos meus avós **Antonio** e **Creuza**, tia **Rizomar**, tios **Amauri**, **Joaquim**, **José** e **Renildo**, e a toda família **Pereira**, pelo carinho, por compreender minha ausência e pelo apoio incondicional.

A minha orientadora professora **Dra. Adriana Ferreira Martins**, pela oportunidade dada desde a iniciação científica, orientação, confiança e credibilidade, paciência, pelo exemplo de ser humano e profissionalismo, por ser uma mãe como orientadora.

Aos professores **Flávio Pereira**, **Bruno Dias**, **Raphael Beirigo**, **Luciana Cordeiro**, **Vania Fraga**, **Lourival Cavalcante** e **Walter Esfrain**, aos funcionários do Departamento de Solos e Engenharia Rural, **Dona Marielsa**, **Helton** e **André**, a **Kalline**, **Thiago** e demais colegas do Laboratório de Matéria Orgânica Solo, pelo apoio e ajuda dada sempre que necessário para a realização deste trabalho, e aos colegas do PIVIC **João Pedro** e **Matheus**.

Aos professores **Mailson do Rêgo**, **Elizanilda do Rêgo**, **Naysa Flávia**, **Jacinto Luna**, **Lucina Rocha**, **Leonardo Felix**, **Edna Ursulino**, **Luciana Gomes**, **Paulo Vanderley** (UFAL).

Aos colegas da turma de Agronomia 2013.1, **Tayron**, **Flaviano**, **Ingrid**, **Matheus**, **Ulisses** (in memoriam), **Eduardo**, **Gemerson**, **David**, **Lais**, **Matheus Borba**, **Marianne**, **Aelson** e **Beatriz** pela convivência, amizade, momentos divertidos e companhia durante o curso.

Aos amigos que fiz no CCA, **Raylson**, **Maciel**, **Expedito**, **Lívia**, **João Paulo**, **Hiago**, **Nardiele**, **Beatriz Torres**, **Annie**, **Alex Sandro**, **Renato**, **Angelita**, **Izabela**, **Luciene**, **Lemerson**, **Otília**, **Joelson**, **Bruna**, **Sammara**, **Maiara**, **Angeline**, **Edjane**, **Isadora**, **Amanda Louise**, **Geyziane**, **Ícaro**, **Tatiana Leite**, **Laysa**, **Diniz**, **Ramon**, **Luís Eugênio**, **Denis**, **João Ítalo**, **Cláudio Jr.**, **Rinaldo**, **Mileny**, **Joel**, **Haron**, **Gilmar**, **Mariana**, **Leandra**, **Victor**, **Franciany**, **Francisco de Assys**, **Rafael Ramos**, **Igor**, **Francisco Jeanes**, **Ewerton Barbosa**, **Arliston**, **Raniere**, **Paulo Granja**, **Fernanda Fernandes**, **Laura Pedrosa**, **Denizard**, **Amanda Firmino**, **Caíque Palacio**, **Oswaldo**, **Flaviana**, **Roberta Ferreira**, **Renata Souto**, **Gabriela Costa**, **Rafael Bruno**, **Evilásio** pela amizade e pela contribuição direta ou indireta neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia vegetal, **Priscila**, **Ayron**, **Marcelo**, **Karmita Thainá**, **Lucas**, **Kaline**, **Flávia Laís**, **João Neto**, **Michelle**, **Cristine**, **Júlio**, **Ana Paula**, **Aline**, **Wellington**, **Glaucia**, **Angela**.

Aos amigos de Colonia Leopoldina-AL, **José de Melo**, **Sérgio**, **Jackson Balthazar**, **Edvan**, **Luiz Carlos**, **Carlos Eduardo**, **Danilo**, **Ana**, **Domarcos**, **Silvanio**, **Antônio Timóteo**, **Márcio**, pela amizade e incentivo.

Aos amigos do setor de melhoramento genético de plantas da Universidade Federal de Alagoas **Islan Diego**, **Jadson**, **Lucas Alceu**, **Felipe**.

A aos funcionários, dona **Denise**, **Naú** e **Solon**, pela ajuda na realização de atividades de pesquisa, amizade e pelos cafezinhos nas copas.

*A todos aqueles que torceram e acreditaram em mim, e de forma direta ou indireta contribuíram com este trabalho.*

*Meu muito obrigado!*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELA .....	ix
TABELA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
<b>2.1. FEIJÃO-CAUPI (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) E SUAS     CARACTERÍSTICAS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. SIMBIOSE ENTRE BACTÉRIAS E LEGUMINOSAS .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3. SELEÇÃO DE ESTIRPES NATIVAS DE BACTÉRIAS     NITRIFICANTES PARA LEGUMINOSAS.....</b>	<b>17</b>
3. MATERIAL E METODOS.....	19
<b>3.1. LOCAIS DE AMOSTRAGEM .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. OBTENÇÃO DOS NÓDULOS .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. ISOLAMENTO DOS RIZÓBIOS AUTÓCTONES .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE     RIZÓBIOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.5. BIOENSAIO DE EFICIÊNCIA DOS ISOLADOS NA FIXAÇÃO     SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO .....</b>	<b>22</b>
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÃO .....	31
6. REFERÊNCIAS.....	32
7. APÊNDICES .....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> ÁREA, PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE FEIJÃO-CAUPI POR ESTADO BRASILEIRO. FONTE DE DADOS: EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2015. ....	15
<b>TABELA 2.</b> DIÂMETRO, CONCENTRAÇÃO DE NaCl, DIFERENTES pH E TEMPERATURAS NO DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS DE RIZÓBIOS UTILIZADOS COMO INOCULANTES EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI CULTIVADO EM LATOSSOLO VERMELHO DO CERRADO (FRIGO, 2013). ....	19
<b>TABELA 3.</b> CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SOLOS UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DE NÓDULOS ML: MATA LIMPA; CJ: CHÃ DE JARDIM.....	20
<b>TABELA 4.</b> PLANILHA DE CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS .....	26
<b>TABELA 5 .</b> ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA: NÚMERO DE NÓDULOS (NN); MASSA SECA DE NÓDULOS (MSN); MASSA SECA DE PARTE ÁREA (MSPA); ÍNDICE DE EFICIÊNCIA DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO (ERF). ....	29
<b>TABELA 6.</b> ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA: NÚMERO DE NÓDULOS (NN); MASSA SECA DE NÓDULOS (MSN); MASSA SECA DE PARTE AÉREA (MSPA); ÍNDICE DE EFICIÊNCIA RELATIVA DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO (ERF).....	30
<b>TABELA 7.</b> CORRELAÇÃO PEARSON ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	31
<b>TABELA 8.</b> ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS TESTES FISIOLÓGICOS IRGA E CLOROFILOG, (Ci): CARBONO INTERNO; E: TRANSPIRAÇÃO; (GS): CONDUÇÃO ESTOMÁTICA; (A): ASSIMILAÇÃO LÍQUIDA DE GÁS CARBÔNICO; E CLOROFILA TOTAL. ....	38
<b>TABELA 9 .</b> MÉDIAS DOS TESTES FISIOLÓGICOS IRGA E CLOROFILOG: (Ci) CARBONO INTERNO; (E) TRANSPIRAÇÃO; (GS) CONDUÇÃO ESTOMÁTICA; (A) ASSIMILAÇÃO LÍQUIDA DE GÁS CARBÔNICO; E CLOROFILA TOTAL. ....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO (A,B,C,D).....	22
<b>FIGURA 2.</b> DENDOGRAMA DE JACCARD COM O AGRUPAMENTO DOS GRUPOS.....	25

SOUZA, J. S. CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS ASSOCIADOS À *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 2018, 26p. Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba. Orientadora: Adriana Ferreira Martins.

## CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS ASSOCIADOS À *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

### RESUMO

O feijão-caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp. muito conhecido como feijão-macassar e feijão-de-corda, é incluída entre as principais culturas de subsistência dessas regiões, com mais importância no sertão nordestino. Contudo, os cultivos praticados no estado são de baixo nível tecnológico. Necessitando assim aplicações de insumos minerais industrializados, o que contribui para o encarecimento na produção. Com isso a utilização de insumos biológicos que possa substituir os químicos industrializados tem sido cada vez mais frequente na agricultura. O feijão caupi é capaz de estabelecer simbiose e nodular com diversas espécies de bactérias do grupo rizóbio, incluídos gêneros como *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*. Com essa baixa especificidade da cultura em relação ao microsimbionte apresenta-se como um fator limitante à exploração desta tecnologia, tendo em vista que as bactérias nodulantes presentes no solo, além de ser competitivas e estar em maior número, apresentam uma eficiência variável na FBN. Por esta razão, é importante estudar estratégias que possa avaliar a composição e a contribuição de estirpes de rizóbios nativos do solo onde se pretende introduzir o inoculante. Diante do exposto, objetivou-se selecionar isolados de rizóbios nativos de solos agrícolas do município de Areia (PB), para plantas de feijão-caupi, como também caracterizar e avaliar os isolados de rizóbios obtidos, tendo como comparação a estirpe recomendada 03-84-6/2010 UFLA. Os experimentos com plantas foram conduzidos em ambiente semi protegido do DSER. De acordo com os resultados obtidos após os 40 dias, pode-se constatar que todos os tratamentos estavam com nódulos, com exceção da segunda repetição do tratamento sem nitrogênio. E foram obtidos 8 grupos distintos de rizóbios nativos. Conclui-se que os solos da zona úmida da Caatinga em Areia-PB possuem bactérias nitrificantes nativas capazes de nodular e fixar nitrogênio. Entretanto, há poucos estudos destes microrganismos, ressaltando assim a importância de mais pesquisas como estas na Paraíba.

**Palavras-Chave:** Bactérias nitrificantes nativas; caracterização morfológica de bactérias nitrificantes; Bioma Caatinga; simbiose planta-bactéria; microbiologia do solo.

SOUZA, J. S. CHARACTERIZATION AND SELECTION OF NATIVE RHIZOBIA ASSOCIATED WITH *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 2018, 26p. Work of graduation in Agronomy, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba. Advisor: Adriana Ferreira Martins.

## **CHARACTERIZATION AND SELECTION OF NATIVE RHIZOBIA ASSOCIATED WITH *Vigna unguiculata* (L.) Walp.**

The cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp., commonly known as macassar and feijão de corda, this bean is the main subsistence crop of these regions, with more importance in the northeastern Sertão. However, the practiced cultivations in the state use low technological level. In this way, we need applications of industrialized mineral inputs, which contributes to the yield increase. With that, the use of biological inputs that can replace industrialized chemicals has been increasingly frequent in agriculture. The cowpea is able to establish symbiosis and nodulate with several species of bacteria of the rhizobia group, including genera such as *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*. With this low specificity of the crop in relation to the microsymbionte, it is a limiting factor to the exploitation of this technology, considering that the nodulating bacteria present in the soil, besides being competitive and being in greater numbers, present a variable efficiency in the FBN. For this reason it is important to study strategies that can evaluate the composition and distribution of rhizobia strains native to the soil where it is intended to apply the inoculant. Based on that, the objective of this study was to select isolates of native rhizobia from agricultural soils of the city of Areia (PB), for cowpea plants, and to characterize and evaluate the rhizobia isolates obtained, comparing to the recommended strain 03-84 -6/2010 UFLA. The tests were carried out in a protected environment of the DSER. After 40 days, according to the obtained results, it could be found that all treatments presented nodules, except the second replication of the treatment without nitrogen. Eight different groups of native rhizobia were obtained. It can be concluded that the humid zone of Caatinga in Areia-PB, has native nitrifying bacteria able to nodulate and fix nitrogen. However, there is lack of study of these microorganisms, highlighting the importance of more researches such as these, in Paraíba.

**Keywords:** Native nitrifying bacteria; morphological characterization of nitrifying bacteria; Caatinga Biome; plant-bacterial symbiosis; microbiology of soil.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de feijão-caupi nas regiões Nordeste e Norte são feitas por empresários e agricultores familiares que ainda utilizam práticas tradicionais (FREIRE FILHO et al., 2011). Contudo, os cultivos praticados no estado são de baixo nível tecnológico (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2002). Necessitando assim aplicações de insumos minerais industrializados, o que contribui para o encarecimento na produção como também os impactos advindos de práticas realizadas sem respeitar a necessidade da cultura e a fertilidade do solo. Deste modo a utilização de insumos biológicos como forma de substituição dos industrializados tem sido cada vez mais utilizado na agricultura (MELO & ZILLI, 2009)

Entretanto não se tem muitos estudos sobre a comunidade de bactérias nitrificantes para a cultura na zona úmida do bioma Caatinga. Além do feijão-caupi ser capaz de estabelecer simbiose e nodular com diversas espécies de bactérias do grupo rizóbio, incluídos gêneros como *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, entre outros (NEVES; RUMJANEK, 1997; WILLEMS, 2006; ZILLI et al., 2006; ZHANG et al., 2007; MOREIRA, 2008). Com essa baixa especificidade da cultura em relação ao microssimbionte apresenta-se como um fator limitante à exploração desta tecnologia, tendo em vista que as bactérias nodulantes presentes no solo, além de ser competitivas e estar em maior número, apresentam uma eficiência variável na FBN (THIES et al., 1991; HARA; OLIVEIRA, 2007). O que dificulta a introdução de inoculantes contendo rizóbios eficientes, uma vez que as bactérias indígenas ou nativas são mais adaptadas e competitivas, deslocando rapidamente as estirpes dos inoculantes dos sítios de infecção (SANTOS et al., 2007).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (L.) Walp.) é uma espécie pertencente à família Fabaceae. É uma cultura originária da África, trazida pelos colonizadores portugueses e implantada no estado da Bahia. (FREIRE FILHO, 1988), posteriormente disseminado por todo país. É muito conhecido nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, como feijão-macassar e feijão-de-corda, é incluída entre as principais culturas de subsistência dessas regiões, com mais importância no sertão nordestino (LIMA et al., 2007). Isso se deve a suas características adaptativas edafoclimáticas. Se tratando de uma cultura que é extremamente rústica, tolerante as condições de altas temperaturas e seca (CHAGAS JUNIOR et al., 2010)

Com este estudo espera-se encontrar uma alta diversidade de bactérias nitrificantes tendo em vista que a cultura é de baixa especificidade, entretanto espera-se que poucos destes isolados possuam elevada eficiência de fixação de nitrogênio quando inoculados com o feijão-caupi, devido a baixa produtividade do feijão-caupi na Paraíba (EMBRAPA ARROZ & FEIJÃO, 2015). Mesmo considerada uma cultura de subsistência, possui uma expressão socioeconômica na agricultura do norte e nordeste, considerada uma das principais fontes de proteína obtida com baixo custo para alimentação humana, apresentando uma grande variabilidade entre as cultivares (BERTINE et al., 2009). Desta forma, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) vem se mostrando indispensável na sustentabilidade da agricultura brasileira, tendo em vista o a disponibilização de nitrogênio para as culturas com um baixo custo econômico e também com baixo impacto ambiental (HUNGRIA et al., 2007).

Objetivou-se a obtenção, caracterizar e seleção de isolados de bactérias nitrificantes nativas associadas à *Vigna unguiculata* da zona úmida do Bioma Caatinga. Assim como, avaliar a eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio destes microrganismos oriundos de solos de diferentes classificações do município de Areia-PB.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) E SUAS CARACTERÍSTICAS

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), popularmente conhecido como de corda ou feijão-macassar, é uma planta leguminosa que possui uma ampla distribuição mundial, cultivado principalmente nas regiões tropicais. De acordo com a classificação botânica o feijão-caupi é uma planta Dicotyledonea, da ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, seção Catyang, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e subespécie *unguiculata*, subdividida em quatro cultigrupos *Unguiculata*, *Sesquipedalis*, *Biflora* e *Textilis* (PADULOSI; NG, 1997; SMARTT, 1990)

Planta originária do continente Africano, que com a colonização portuguesa no XVI foi trazida e introduzida primeiramente no estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988). Onde a partir da Bahia, a cultura foi disseminada por todo o país, e em 2007 o Brasil começou a exportar seus grãos. Pois os primeiros compradores foram Canadá, Portugal, Israel, Turquia e Índia, podendo se constatar que há mercado muito maior para a cultura (FREIRE FILHO et al., 2011).

O feijão-caupi integra uma das principais culturas de subsistência das regiões Norte e Nordeste do Brasil (BEZERRA et al, 2010). Possui uma área cultivada no país de aproximadamente 1 milhão de hectares, onde destes cerca de 90% estão situados nas regiões norte e nordeste (BEZERRA, et al, 2010). Pois é uma cultura de extrema importância alimentar para estas populações destas regiões, principalmente as mais carentes, um alimento de alto valor nutritivo e, com isso, um dos principais componentes na dieta alimentar, além de também de ser uma geradora de emprego e renda tanto na zona rural, como também na zona urbana (LIMA et al., 2007).

A produção mundial de feijão-caupi em 2014 foi aproximadamente 5,6 milhões de toneladas, produzidas em 12,5 milhões de hectares, conforme registros da FAO (2015). Entretanto estes dados não são precisos acerca da produção do caupi, tendo em vista que as informações obtidas pelo “Levantamento Sistemático da Produção Agrícola” (IBGE, 2016) consideram os dois tipos de feijão, ou seja, macassar e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

Segundo Freire Filho et al. (2011), periodicamente são realizadas estimativas para sua produção por meio de informações de empresas de assistência, extensionistas, pesquisadores, produtores de grãos, produtores de sementes e comerciantes. Entretanto, a Embrapa Arroz e Feijão tem obtido estimativas, não oficiais, sobre a produção anual de feijão-caupi no Brasil e nos estados produtores. De acordo com estas estimativas, a produção em 2014 foi de 482.665 toneladas colhidas em 1.202.491 hectares (Tabela 1) (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2015).

Importante ressaltar que em 2011 o Brasil produziu cerca de 800 mil toneladas colhidas em 1,7 milhões de hectares, esse recorde ocorreu devido às boas condições pluviométricas, especialmente no Nordeste do Brasil (SILVA et al., 2016)

**Tabela 1.** Área, produção e produtividade de feijão-caupi por estado brasileiro. Fonte de dados: Embrapa Arroz e Feijão, 2015.

<b>Estado</b>	<b>Área (ha)</b>	<b>Produção (ton)</b>	<b>Produtividade (Kg/ha)</b>
<b>MT</b>	116.000	127.000	1.095
<b>CE</b>	398.002	107.291	270
<b>PI</b>	214.224	55.278	258
<b>PE</b>	180.338	52.406	291
<b>MA</b>	98.152	50.314	513
<b>PA</b>	39.169	26.442	675
<b>BA</b>	46.200	20.890	452
<b>PB</b>	64.551	17.604	273
<b>RN</b>	25.420	10.407	409
<b>AM</b>	5.295	5.364	1050
<b>AL</b>	8.960	5.364	599
<b>RR</b>	3.000	2.001	667
<b>AP</b>	1.180	1.108	939
<b>SE</b>	2.000	1.000	500
<b>Total</b>	<b>1.202.491</b>	<b>482.665</b>	<b>401</b>

A baixa fertilidade natural e também dos teores de matéria orgânica dos solos, são alguns dos fatores responsáveis pela produtividade. (GIANLUPPI, 1997). Além da deficiência hídrica que é uma situação comum a muitas culturas fator este que afeta a produção agrícola, influenciando todos os aspectos relacionados ao desenvolvimento vegetal (DAMATTA, 2007).

Segundo Santos & Carlesso (1998) a deficiência hídrica é um dos fatores mais limitantes na produção agrícola mundial. Deste modo uma das formas de tentar elevar a produtividade da cultura no estado que possa produzir-se com baixo custo e elevada renda para o produtor rural existe a possibilidade da exploração de tecnologias como a da fixação biológica de nitrogênio (FBN) que com a prática da inoculação das sementes com estirpes do grupo rízóbio que sejam eficientes para a cultura tem sido muito explorada (ZILLI et al., 2009). Além das vantagens econômicas desta prática, também possui vantagens ecológicas, pois é de baixíssimo impacto ambiental. Segundo Martins et al., (2003) relata que trabalhos desenvolvidos, especialmente no semiárido nordestino, têm sido promissores, demonstrado a obtenção de rendimentos de grãos significativos com a utilização de inoculantes com estirpes eficientes.

## 2.2. SIMBIOSE ENTRE BACTÉRIAS E LEGUMINOSAS

O nitrogênio é um macronutriente encontrado em muitos compostos orgânicos, tais como os aminoácidos e os ácidos nucléicos. Desta forma as plantas necessitam do nitrogênio e maior quantidade do que os demais nutrientes, pois a indisponibilidade dele limita a produtividade das plantas em ecossistemas naturais e agrícolas (EPSTEIN & BLOOM, 2006). A sua deficiência ocasiona vários níveis de clorose além do enfraquecimento, comprometendo assim o crescimento e consequentemente a produção (MELO, 2013).

Por se tratar de um elemento que apresenta mobilidade nas plantas, os primeiros sintomas surgem nas folhas mais velhas e transloca-se, consequentemente para as mais jovens, tornando-se uma clorose generalizada (MELO, 2013). Muitos trabalhos têm demonstrado que há efeitos positivos do processo de FBN em feijão-caupi (XAVIER et al., 2006, XAVIER et al., 2007; XAVIER et al., 2008).

Com isso, a fixação biológica de nitrogênio consiste na utilização do nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) que está em grande quantidade na atmosfera terrestre e que serve para o metabolismo de um grupo seletivo de seres vivos, que inclui um grupo de microrganismos procariotos. Por meio da simbiose entre planta e bactérias fixadoras de nitrogênio se formam nódulos nas raízes das leguminosas e consequentemente por meio de processos metabólicos convertem nitrogênio atmosférico em amônia a qual é a forma que a planta consegue absorver e assimilar para formar elementos essenciais, tais como proteínas (SILVA et al., 2006).

Para que a fixação biológica de nitrogênio seja efetiva é necessário que ocorra a nodulação nas plantas. O processo de nodulação ocorre durante a associação simbiótica é controlado, em grande parte, pela troca de sinais entre os rizóbios e a planta hospedeira (HIRSCH et al., 2003). Devido à diversidade de compostos e metabólitos secundários que compõem os exsudatos radiculares, plantas podem enviar um número bem diverso de sinais. (TONON, 2008). Estes sinais são específicos entre o hospedeiro e o simbionte, tendo em vista que diferem consideravelmente entre as plantas da família Fabaceae, desta forma a esta especificidade possibilita que os rizóbios simbiontes identifiquem os seus próprios hospedeiros. (BAIS et al., 2004).

Entretanto, além do reconhecimento entre o simbionte e o hospedeiro por meio de trocas de sinais bioquímicos, para se estabelecer a simbiose também se leva em consideração fatores abióticos (LIEVEN-ANTONIOU & WHITTAN, 1997). Como as condições do solo que são muito importantes e exercem influência sobre estes seres. Fatores como acidez do solo, salinidade, deficiências ou excesso de minerais, estresse hídrico, variações de temperatura e também a quantidade de nitrogênio inorgânico no solo, podem afetar a interação entre a leguminosa e o rizóbio, que levará a interferência do fluxo de nitrogênio (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Além dos fatores supracitados, pode ocorrer de rizóbios nativos que são ineficientes na fixação biológica de nitrogênio, podem competir com os rizóbios que são eficientes pelos sítios de infecção na planta hospedeira, deixando o rizóbio eficiente sem formar nódulo, deste modo este é mais um fator que é limitante para o estabelecimento da simbiose (MOREIRA & SIQUEIRA, 2005).

A capacidade diazotrófica, ou seja, a capacidade de transformar o nitrogênio da forma indisponível para a forma disponível para as plantas está restrita a Bacteria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Estes microrganismos são seres aeróbicos não esporulantes, que pertencem ao filo alpha Proteobacteria, os quais são geralmente identificados como rizóbio, que atualmente estão distribuídos em seis gêneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium/ Ensifer*, *Allorhizobium* e *Azorhizobium*) (ZAKHIA & LAUJUDIE, 2001; WILLEMS, 2007).

O melhor exemplo da utilização desta tecnologia aqui no Brasil é a cultura da soja, onde a adubação mineral nitrogenada é totalmente substituída por inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (MEDEIROS et al., 2007). A utilização de insumos biológicos representa além da redução de impactos ambientais advindos da produção e utilização de insumos minerais, também representa uma redução de custos para o produtor rural. A utilização de inoculantes representa uma economia de cerca de US\$ 3 bilhões para o país em fertilizantes nitrogenados (MERCANTE, 2007).

Desta forma a identificação destas características em isolados de rizóbio com elevada capacidade de fixação biológica de nitrogênio é importante para seleção destes microrganismos, que sejam resistentes e adaptados a estas condições.

### **2.3. SELEÇÃO DE ESTIRPES NATIVAS DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES PARA LEGUMINOSAS**

O processo de nodulação e a FBN são influenciadas por fatores edafoclimáticos que podem trazer benefícios ou prejuízos ao processo (SILVA et al., 2010). No processo de simbiose entre leguminosas e o rizóbio, o nódulo representa um abrigo para a bactéria (MARTINS, 2010). Entretanto, a partir do momento que o rizóbio se torna parte do sistema simbiótico, ele passa a ser afetado por qualquer fator que influencie na diminuição do vigor da planta, fatores tais como, deficiências nutricionais, condições ambientais sub-ótimas, entre outros que podem interferir no processo de nodulação e fixação do nitrogênio (MARTINS, 2013).

A seleção de rizóbios deve ser objetiva quanto a identificação de estirpes que sejam eficientes, adaptadas às condições locais e que sejam competitivas frente à população nativa (STROSCHEIN, 2011). A busca de melhores estirpes deve começar pela mais ampla possível avaliação do material genético existente já adaptado de preferência às condições ambientais locais. (STROSCHEIN, 2011). Como também se podem trazer estirpes eficientes de outros locais, que apresentem condições ambientais diferentes, e testar a sua resposta a estas condições.

Neste contexto, certas características mais específicas, como tolerância à baixa ou alta temperatura, baixa umidade, salinidade, acidez e toxicidade ao alumínio e teores de nitrogênio mineral podem também ser sujeitas à seleção para obtenção de mutantes ou variantes espontâneas ou pela adaptação dirigida (VARGAS & HUNGRIA, 1997).

Segundo Pelegrin et al. (2009) os fatores relacionados a acidez do solo, como pH baixo e elevadas concentrações de alumínio tóxico, frequentemente, limitam todas as etapas do processo de infecção das raízes, na formação de nódulos e também na assimilação do N pela planta. No meio ácido ocorre uma diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias, consequentemente pode afetar o seu crescimento (HARA & OLIVEIRA, 2007).

De acordo com Prisco e Gomes Filho (2010), a salinidade prejudica diretamente os processos fisiológicos e bioquímicos das plantas. Quanto à salinidade do solo, não apenas as plantas, mas também os rizóbios são sensíveis à salinidade (NOGALES et al., 2002; FREITAS et al., 2007) desde a fase de vida livre como também durante o processo simbiótico (DOMÍNGUEZ-FERRERAS et al., 2009).

A salinidade do solo pode limitar os processos simbióticos afetando tanto a sobrevivência quanto a proliferação de rizóbios no solo e na rizosfera, causando a inibição do processo de infecção, afetando a função do nódulo nas raízes ou como também reduzindo o crescimento das plantas (SINGLETON et al., 1982; SINGH et al., 2008) o quantidade de sais em excesso podem ter um efeito negativo sobre as populações de rizóbios como toxicidade direta, como também através de estresse tanto osmótico quanto iônico (NOGALES et al., 2002; MAHMOOD et al., 2008). A salinidade induz efeitos depressivos sobre a nodulação, leghemoglobina e nitrogenase (MANCHANDA e GARG, 2008).

Por isso o monitoramento de alterações fisiológicas no feijão-caupi pode ser uma das ferramentas adequadas para o diagnóstico de situações de estresse que a planta esteja sofrendo, e se isso pode interferir nos processos simbióticos. Prazeres et al (2015) em experimento com salinidade em feijão-caupi, relataram que, os efeitos da salinidade influenciaram o crescimento das plantas como também as trocas gasosas, reduzindo a taxa fotossintética das plantas, e o maior nível salino também ocasionou a redução da condutância estomática nas plantas superior a observada quando se aplicou a menor dose de potássio, a taxa de respiração também seguiu a tendência de redução da condutância estomática. Em plantas de melancia, por exemplo, a salinidade reduz à área foliar, o acúmulo de matéria seca, dos macronutrientes, a condutância estomática, a concentração interna e a assimilação líquida de gás carbônico e a transpiração (COLLA et al., 2006; LUCENA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016)

Neste contexto, se torna necessário mais estudos que possam constatar quais são os fatores limitantes para o desenvolvimento destes microrganismos a fim de promover uma seleção eficiente. Segundo Frigo (2013) que avaliou o crescimento de 5 estirpes, sendo as estirpes C08, C15, RZ16 e RZ23 pertencentes ao acervo da Universidade Federal do Mato Grosso, mais o inoculante comercial BR3267 desenvolvido pela EMBRAPA Agrobiologia, onde constatou que algumas estirpes se desenvolveram melhor que outras num período de 48h, submetidas as mesmas condições ambientais e obtiveram crescimento positivo em diferentes concentrações de NaCl, de pH e também de temperatura que iniciam de 28°C a 42° C (Tabela 2).

**Tabela 2.** Diâmetro, Concentração de NaCl, diferentes pH e temperaturas no desenvolvimento de colônias de rizóbios utilizados como inoculantes em plantas de feijão-caupi cultivado em LATOSSOLO Vermelho do cerrado (FRIGO, 2013).

Estirpe	Diâmetro (cm)	NaCl (%)			pH					Temperaturas °C			
		1%	2%	3%	4,0	5,0	8,0	9,0	10,0	28°C	32°C	37°C	42°C
<b>C08</b>	0,60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>C15</b>	0,47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>RZ16</b>	0,38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>RZ23</b>	0,70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>BR3267</b>	0,41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

O conhecimento sobre a adaptação das espécies a ambientes que apresentam restrições quanto à incidência direta de radiação solar é eficaz, pois a luz é um importante fator que interfere em processos de ativação enzimática, abertura e fechamento estomático, na atividade fotossintética, entre outros. Porém, altas intensidades de radiação solar absorvidas pelas plantas podem levá-las a saturação luminosa, diminuindo a eficiência no uso da radiação (JIANG et al. 2006).

### 3. MATERIAL E METODOS

O município de Areia, local de estudo, está localizado na microrregião geográfica do brejo paraibano a 574 m de altitude e (Lat. -6° 58"; Long. 35° 41") onde apresenta uma temperatura média anual de 24,0°C com uma pluviosidade média anual de 1400 mm, umidade relativa, média de 80% e de acordo com Koppen (1936) o clima é classificado com As, ou seja, clima tropical, semi-úmido, Thornthwaite (1948), classifica o clima da região como B1 Ra „a“, que é um clima úmido, apresentando pouca deficiência de umidade, megatérmico, com pequena variação de temperatura.

#### 3.1. LOCAIS DE AMOSTRAGEM

Foram coletadas duas amostras de solos onde anteriormente tinha sido cultivado o feijão-caupi no município de Areia, estado da Paraíba, uma amostra foi coletada na estação experimental Chã de Jardim de uma área de pousio de 10 anos e a outra amostra foi do distrito de Mata Limpa coordenadas: Altitude 563 m, S 06°54'20,8" X, W 35°40'52,0" Y em que a prática se dá sem insumos químicos. Ambos os solos são classificados como Latossolo Amarelo Distrófico húmico (Embrapa, 2013) com vistas à obtenção do maior número possível de isolados de rizóbios autóctones capazes de nodular esta espécie. Amostras dos solos foram enviadas ao Laboratório de Análise de Fertilidade do Solo do Departamento de Solos e Engenharia Rural da UFPB para determinação das características químicas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Caracterização química dos solos utilizados na obtenção de nódulos ML: Mata limpa; CJ: Chã de jardim.

SOLO	pH	P	K	Na	Ca+Mg	Ca	Mg	Al	H+Al	C	MO	SB	CTC	V
		---mg dm <sup>-3</sup> ---	-----cmolc dm <sup>-3</sup> -----						----g Kg---				%	
ML	5,5	11,3	95,2	0,06	1,35	0,73	0,62	0,3	4,7	9,85	17	1,66	6,36	26
CJ	5,2	3,12	34,7	0,07	0,85	0,55	0,3	0,45	7,34	15,7	27,1	1,01	8,35	12,1

### 3.2. OBTENÇÃO DOS NÓDULOS

Para a obtenção de nódulos a partir das amostras de solo, foi realizado um experimento com a inoculação de plântulas de *Vigna unguiculata* com uma suspensão dos solos amostrados em um ambiente semi-protégido. As sementes foram previamente desinfestadas por imersão das sementes em álcool (70%) por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos, sendo em seguida colocadas para germinação nos vasos. Cinco sementes foram plantadas em cada vaso do tipo “Leonard” (VINCENT, 1970), contendo, como substrato na parte superior, uma mistura de vermiculita e areia (na proporção de 2:1), sendo todo o conjunto esterilizado em autoclave a 121°C por 90 minutos antes do plantio (Figura 1). E os vasos foram lavados e deixados em imersão em solução de hipoclorito de sódio por 72 horas.

Após, foi adicionada na parte inferior, solução nutritiva (SARRUGE, 1975) sem nitrogênio, pH 6,0 e esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos. Após o plantio, os vasos foram inoculados com uma alíquota de 10 mL da suspensão de cada amostra de solo em solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada, sendo utilizadas 3 repetições para cada amostra de solo. Também foi utilizado 2 tratamentos como controle, sendo um com solução nutritiva contendo nitrogênio e sem inoculação, e outra sem inoculação e sem nitrogênio toda a solução utilizada em todos os tratamentos durante o experimento foram anteriormente autoclavada a 121°C por 15min para evitar contaminação. Ao total foram cinco tratamentos com três repetições cada e duas plantas por vaso.

Aos quatorze dias de crescimento, foi realizado o desbaste deixando-se duas plântulas por vaso. A solução nutritiva dos vasos foi completada a cada três dias utilizando-se solução nutritiva (SARRUGE, 1975) sem nitrogênio, pH 6,0 e esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos, intercalada com a adição de água destilada esterilizada.

Após 40 dias da inoculação, foi avaliada a nodulação, considerando-se tamanho e coloração dos nódulos, e coletando-se os nódulos das plantas para o isolamento dos rizóbios no laboratório.

### **3.3. ISOLAMENTO DOS RIZÓBIOS AUTÓCTONES**

O isolamento dos rizóbios foi executado a partir dos nódulos radiculares de *Vigna unguiculata* que foram obtidos das plantas inoculadas com suspensão de solo, cultivadas na casa de vegetação.

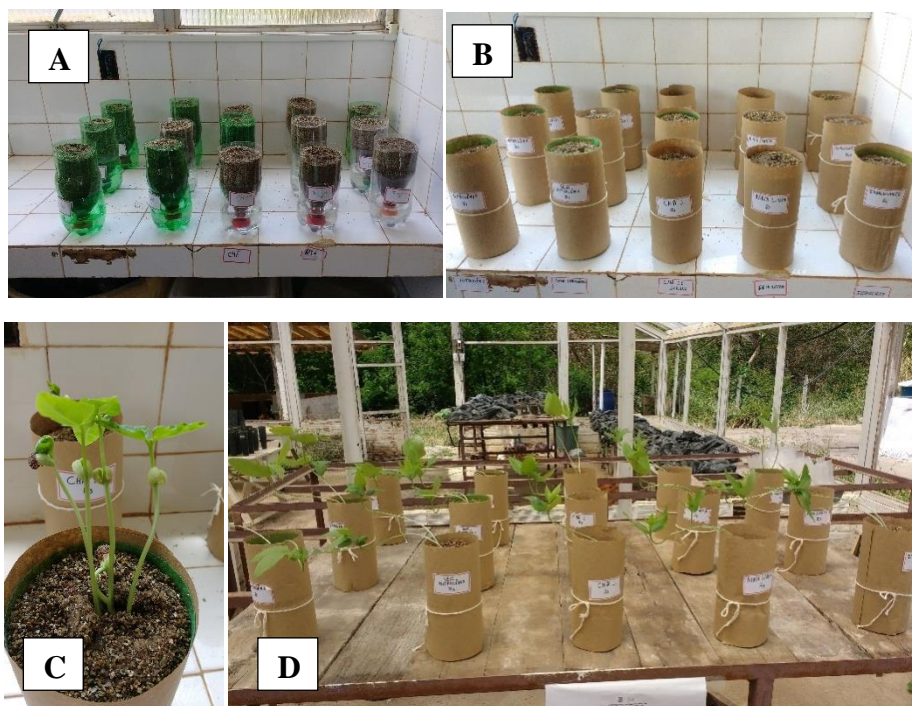
No laboratório, os nódulos foram previamente desinfestados por lavagens sucessivas em álcool (70%) por 30 segundos, seguidas de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e sete lavagens com água destilada esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Após a desinfestação, os nódulos foram esmagados com um bastão de vidro previamente autoclavado a 121°C por 20 minutos, posteriormente foram inoculados em placas de petri contendo meio ágar levedura-manitol com vermelho congo (LMV) (VINCENT, 1970) visando-se a obtenção de colônias bacterianas isoladas.

Estes isolados foram re-inoculados em placas com meio LMV sucessivamente para purificação da cultura, até a obtenção de colônias com características homogêneas e persistentes. Para se ter uma boa visualização das colônias para caracterização, cada isolado foi diluído 6x em solução salina e re-inoculados para a caracterização morfológica.

### **3.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE RIZÓBIOS**

A avaliação da morfologia das colônias foi realizada a partir da inoculação dos isolados diluídos 6x, em placas de Petri contendo meio de cultivo LMV, com pH 6,8 a partir de 24 horas da incubação a 28°C, sendo avaliado o tamanho, forma, elevação, bordas (lisa ou irregular), superfície (lisa ou granular), cor, densidade ótica (opaca, translúcida, transparente) e consistência ao toque com alça (gomosa, pastosa, viscosa ou aquosa). Também foi realizado teste de Gram.



**Figura 1.** Condução do experimento em casa de vegetação (A,B,C,D).

### 3.5. BIOENSAIO DE EFICIÊNCIA DOS ISOLADOS NA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO

Os isolados foram selecionados levando em consideração a distância entre eles dentro de cada um dos 7 grupos que foram formados no Dendograma de Jaccard onde foram avaliados quanto à eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em experimento realizado em casa de vegetação, em vasos de “Leonard” (VINCENT, 1970), esterilizados. Os vasos continham uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1, na parte superior, e, na parte inferior, solução nutritiva (SARRUGE, 1975) isenta de nitrogênio, com pH 6,0, e esterilizada em autoclave a 120°C por 15 minutos. Em cada vaso, foram colocadas cinco sementes de *Vigna unguiculata*, previamente desinfestadas, conforme descrito anteriormente, utilizando-se cinco vasos por tratamento

A inoculação dos vasos foi realizada utilizando-se uma alíquota de 10 mL do caldo de culturas de cada estirpe de isolado estudado, crescidas em meio levedura-manitol, incubadas a 28°C. Nesta avaliação, foi utilizada para comparação estirpe recomendada 03-84-6/2010 UFLA. Além dos tratamentos inoculados, foram conduzidos dois tratamentos controle, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de alíquotas de 1 ml da solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (20 g  $\text{L}^{-1}$ ), equivalente a 100 kg de N  $\text{ha}^{-1}$ , adicionadas a cada 15 dias, ao longo do experimento. Após quinze dias de desenvolvimento, foi realizado o desbaste das plantas, deixando-se duas por vaso. O experimento foi conduzido com cinco repetições por tratamento.

Ao final do período de 35 dias, a parte aérea foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e submetida à secagem em estufa a 65°C, durante três dias. Uma vez seca, a parte aérea foi pesada, em seguida moída para a determinação química do

acúmulo de nitrogênio no tecido, segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Os nódulos foram destacados das raízes, contados e colocados em estufa a 65°C, durante três dias, para secagem. Foram avaliados o número e a massa seca de nódulos.

O índice de eficiência relativa de fixação de Nitrogênio relativa (EFR) dos isolados foi calculado através da fórmula descrita abaixo, conforme proposto por Brockwell et al. (1966).

$$(a) \quad EFR = \frac{(N_{\text{total tratamento}}) - (N_{\text{total T-N}})}{(N_{\text{total T+N}}) - (N_{\text{total T-N}})} \times 100$$

$$(b) \quad \%N = \frac{\text{mL.H}^+\text{Am} - \text{mL H}^+\text{Br}}{\text{g Solo} \times 10.000} \times 700$$

(a) Onde: É a massa dos respectivo dos tratamentos:  $N_{\text{total tratamento}}$  = nitrogênio total da planta do tratamento inoculado;  $N_{\text{total T-N}}$  = nitrogênio total do controle não inoculado e sem nitrogênio;  $N_{\text{total T+N}}$  = nitrogênio total do controle não inoculado e que recebeu suplementação nitrogenada.

(b) Onde: mL.  $\text{H}^+\text{Am}$  = Valor titulado da amostra; mL  $\text{H}^+\text{Br}$  = Valor titulado da amostra em Branco; g Solo = massa do material.

Ao final os dados tabelados da caracterização morfológica dos isolados no software Excel, foram utilizados para geração de dendrograma de similaridade de Jaccard.

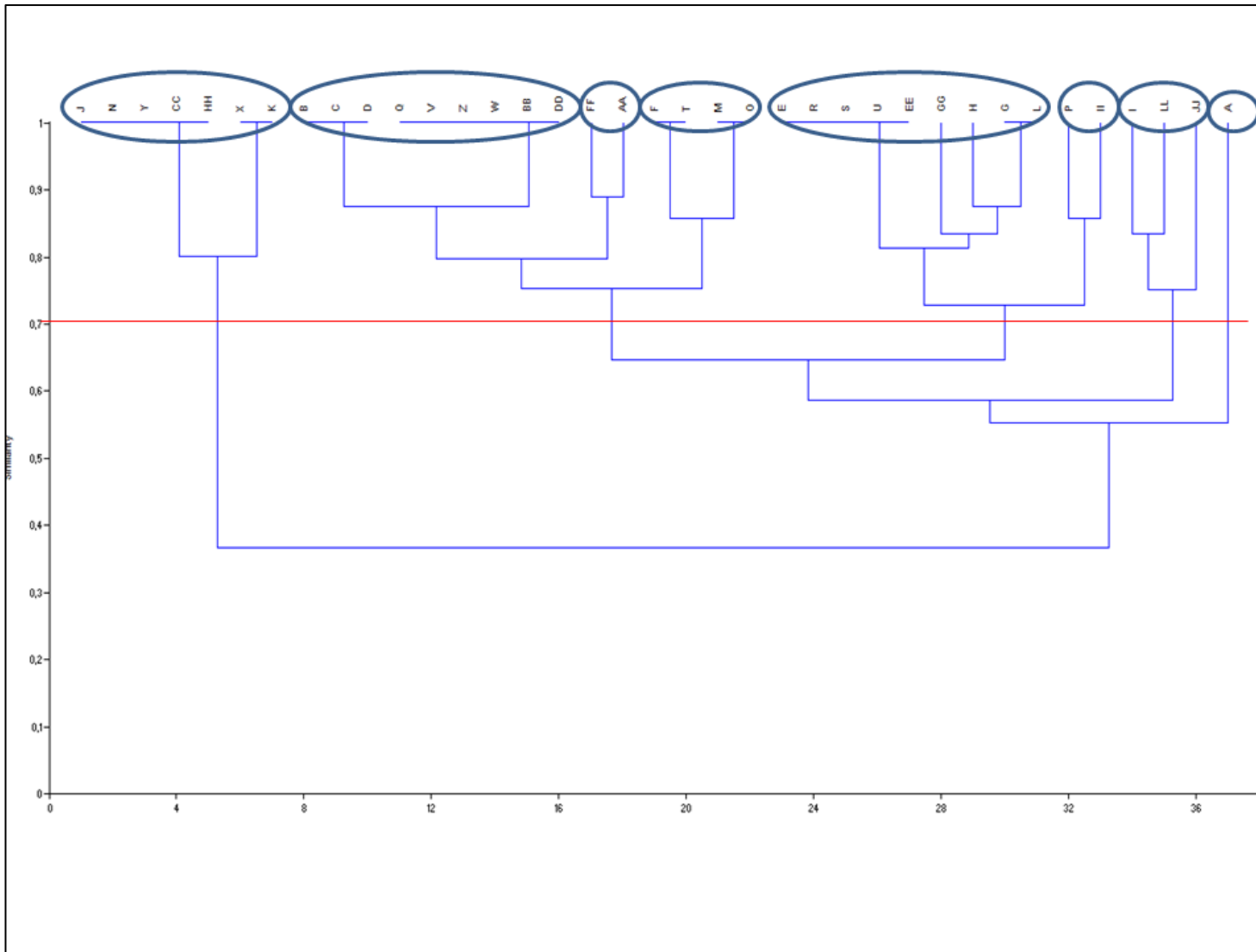
A análise de variância e o teste de comparação de médias de Scott e Knott ao nível de 1% de probabilidade foram realizados com o programa computacional Genes (Cruz, 2008). E a análise de correlação de Pearson foi utilizado o software JM® versão 10.0.0.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos após os 40 dias, pode-se constatar que todos os tratamentos estavam com nódulos, com exceção da segunda repetição do tratamento sem nitrogênio Este resultado não seria positivo se o trabalho fosse para avaliar características das plantas como para eficiência de nitrogênio e demais parâmetros que necessite das plantas, tendo em vista que não haveria controle, entretanto para fins de seleção e caracterização microbiológica este resultado não vem a ser considerado negativo. Esta contaminação dos tratamentos controle pode ter sido ocasionada pelo tempo de autoclavagem dos substratos tendo em vista que a areia antes de autoclavar já estaria contaminada com bactérias do grupo rizóbio que sobreviveram a autoclagem de 121°C a 90 minutos ou causados pelas condições do ambiente já que o experimento foi conduzido em condições semi controladas se assemelhando a condições de campo. Conforme Mazaró et al. (2007) que avaliou o tempo de autoclavagem do substrato com intervalo, constatou que duas autoclagens de 30 minutos a 121°C com um intervalo entre as duas de 24 horas, possibilita a completa esterilização do

substrato, onde os microrganismos que resistiram a primeira exposição ao calor e pressão, não suportam uma segunda exposição.

Contudo os resultados coletados ao final da caracterização morfológica dos isolados (Tabela 5) demonstraram um total de 37 isolados provenientes dos nódulos das plantas mais um isolado da estirpe recomendada, que foram agrupados em oito grupos geneticamente semelhantes de acordo com o dendrograma (Figura 2).



**Figura 2.** Dendrograma de Jaccard com o agrupamento dos grupos de isolado.

**Tabela 4.** Planilha de caracterização morfológica dos isolados

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA												
ID - UFPB	Localidade	crescimento (dias)	Tamanho	Forma	Elevação	Bordo	Superfície	Consistência	Configuração	Cor	Detalhe óptico	Teste Gram
03-84-6/2010	LAVRAS-MG	5	MENOR 1mm	CIRCULAR	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	IRREGULAR	SEM COR	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 01	MATA LIMPA	2	3	CIRCULAR	4	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 02	MATA LIMPA	2	3	CIRCULAR	4	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 03	MATA LIMPA	2	2,7	CIRCULAR	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 04	MATA LIMPA	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 05	MATA LIMPA	1	1,1	CIRCULAR	3	INTEIRA	LISA	AQUOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 06	MATA LIMPA	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 07	MATA LIMPA	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	3	INTEIRA	LISA	AQUOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 08	MATA LIMPA	2	3,7	CIRCULAR	4	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	CREME	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 09	DSER	1	MENOR 1mm	IRREGULAR	6	DENTEADO	RUGOSA	PASTOSA	IRREGULAR	SEM COR	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 10	DSER	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 11	DSER	1	4	CIRCULAR	4	INTEIRA	LISA	GOMOSA	GRANULAR	SEM COR	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 12	DSER	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	6	DENTEADO	RUGOSA	PASTOSA	IRREGULAR	SEM COR	TRANSPARENTE	NEGATIVA
UFPB Vu 13	DSER	1	4	CIRCULAR	3	INTEIRA	LISA	GOMOSA	GRANULAR	SEM COR	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 14	DSER	3	MENOR 1mm	PONTIFORME	1	INTEIRA	LISA	AQUOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 15	DSER	1	2,7	CIRCULAR	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 16	DSER	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 17	DSER	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	1	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	TRANSPARENTE	NEGATIVA
UFPB Vu 18	DSER	1	3,5	CIRCULAR	4	INTEIRA	LISA	GOMOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 19	DSER	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 20	DSER	1	5	CIRCULAR	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 21	CHÃ	1	MENOR 1mm	IRREGULAR	3	DENTEADO	RUGOSA	PASTOSA	ENRUGADA	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 22	CHÃ	1	2	CIRCULAR	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 23	CHÃ	1	MENOR 1mm	IRREGULAR	6	DENTEADO	RUGOSA	PASTOSA	IRREGULAR	SEM COR	TRANSPARENTE	NEGATIVA
UFPB Vu 24	CHÃ	1	2	CIRCULAR	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 25	CHÃ	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	1	DENTEADO	RUGOSA	PASTOSA	ENRUGADA	SEM COR	OPACA	NEGATIVA

UFPB Vu 26	CHÁ	1	MENOR 1mm	CIRCULAR	4	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 27	INOCULANT E	1	1,1	CIRCULAR	4	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 28	INOCULANT E	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	6	DENTEADO	RUGOSA	PASTOSA	ENRUGADA	SEM COR	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 29	INOCULANT E	1	1,1	CIRCULAR	4	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 30	INOCULANT E	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	1	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 31	INOCULANT E	1	MENOR 1mm	CIRCULAR	4	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	ROSA	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 32	INOCULANT E	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	4	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	ROSA	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 33	INOCULANT E	1	MENOR 1mm	PONTIFORME	6	DENTEADO	RUGOSA	PASTOSA	ENRUGADA	SEM COR	TRANSLUCIDA	NEGATIVA
UFPB Vu 34	INOCULANT E	2	MENOR 1mm	PONTIFORME	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	SEM COR	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 35	INOCULANT E	2	1,1	PONTIFORME	3	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	CREME	OPACA	NEGATIVA
UFPB Vu 36	INOCULANT E	2	2,5	CIRCULAR	4	INTEIRA	LISA	PASTOSA	GRANULAR	CREME	OPACA	NEGATIVA

Podemos notar que os solos das áreas agrárias do município de Areia (PB) possuem diversidade de rizóbios desde aqueles que as características se aproximam geneticamente da estirpe recomendada como podemos notar os isolados de (UFPB Vu 01; UFPB Vu 36 e UFPB Vu 35) Podendo estes apresentar qualidades ótimas de nodulação nas plantas e consequentemente eficiência de nitrogênio, o que também não descarta a possibilidade de outros genótipos mais distantes geneticamente serem eficientes igual à estirpe recomendada ou até melhor que ela, levando em consideração ao clima e solo que estes já estão adaptados.

Quanto as características morfológicas avaliadas dos isolados (tabela 5), de acordo com Martins et al, (1994) que diz que as colônias de rizóbio em meio YMA são diferentes umas das outras com base no tempo de crescimento, sendo estas classificadas como rápidas aquelas que apresentam um crescimento moderado e abundante até 3 dias; intermediárias que crescem entre 4 a 5 dias; lentas aquelas que possuem um crescimento de 6 até 9 dias; e as muito lentas que iniciam o seu crescimento a partir de 10 dias. Os isolados encontrados neste experimento apresentaram crescimento rápido onde até três dias as colônias já estavam formadas. Com isso pode-se contestar os resultados encontrados por Sprent (1994), Barnet & Catt (1991) segundo estes em experimento com bactérias isoladas de nódulos de raízes de *Acácia* spp., o crescimento rápido das bactérias fixadoras de nitrogênio é influenciado de acordo com a sua localização geográfica, onde as de crescimento rápido são obtidas somente em zonas áridas como as de seus estudos na Austrália em Fowler's Gap; e no presente estudo o trabalho foi desenvolvido em área denomina de brejo paraibano, devido as características edoclimáticas. De acordo com (Bowen, 1965); Lange, 1961) das leguminosas australianas são tradicionalmente semelhantes ao caupi quanto a nodulação por estirpes de *Bradyrhizobium* spp.

Segundo Norris (1965), estirpes de crescimento rápido são originárias de regiões temperadas, e as de crescimento lento se originam em regiões do trópico úmido. Outros autores como Tam & Broughton (1981) e Martins (1997); Xavier et al. (1998); Freitas et al. (2007); Santos et al., (2007) e Medeiros et al., (2009), corroboram com o presente estudo, tendo em vista que os autores mencionam que rizóbio de crescimento rápido são mais frequentes em regiões semi-áridas, onde está característica seria uma estratégia para sobrevivência em um meio ao um ambiente seco.

Xavier et al. (2007) também corroboram com estes resultados supracitado para o fator temperatura, num experimento que testando o crescimento de estirpes de rizóbio provenientes de três regiões Zona da Mata, Agreste e Sertão em feijão-caupi, encontraram resultados positivos para crescimento em altas temperaturas, acima de 40°. Pode-se notar que não há um consenso sobre os fatores que interferem na simbiose entre plantas e rizóbios.

Para dar prosseguimento ao experimento onde selecionou os isolados dos quais formaram os tratamentos: 1- Estirpe Recomendada; 2- (UFPB Vu 08); 3- (UFPB Vu 14); 4- INOCULANTE (TotalNitro); 5- (UFPB Vu 02); 6- (UFPB Vu 05); 7- (UFPB Vu 04); 8- (UFPB Vu 31); 9- (UFPB Vu 12). De acordo com a análise de variância houve diferenças significativas para todas as variáveis avaliadas como: Número de nódulos (NN), Massa seca de nódulo (MSN), massa seca de parte aérea (MSPA),

Nitrogênio total (Ntotal) e Índice de eficiência relativa de fixação de nitrogênio (ERF), isto indica que os tratamentos, ou seja, os isolados estudados apresentam diferenças estatísticas entre eles que estão além das diferenças morfológicas, mas também que estes influenciam nas características das plantas que é resultado da simbiose entre ambos.

**Tabela 5** . Análise de variância para: número de nódulos (NN); massa seca de nódulos (MSN); massa seca de parte aérea (MSPA); Índice de eficiência de fixação de nitrogênio (ERF).

F.V	Quadrados Médios					
		NN	MSN	MSPA	Ntotal	ERF
<b>Tratamento</b>	10	62219,88**	0,06**	1,77**	30,28**	3381,01**
<b>Resíduo</b>	44	4231,45	0,00	0,27	2,37	41,86
<b>C.V (%)</b>	-	41,16	28,81	25,16	31,51	24,00
<b>Total</b>	54	-	-	-	-	-

\*\*Significativo a 1% de probabilidade.

Com os resultados obtidos nas avaliações, pode-se notar que os isolados tiveram um grande poder de indução de nodulação no feijão-caupi, com médias a partir de 68 nódulos por vaso até aproximadamente 342, onde os tratamentos 3 e 4 obtiveram os maiores valores respectivamente 305 e 343 nódulos e o menor valor foi do isolado 3, com isso podemos notar também que como esperado a massa seca de nódulos tende a aumentar quanto maior for a quantidade de nódulos, só apresentaram resultados superiores de MSN os isolados que obtiveram acima de 150 nódulos, onde pode-se notar que os maiores valores foram dos isolados 3, 4, 5, 8 e 9 que foram os isolados com valores médios de nódulos superiores a 150 (Tabela 6) de acordo com Ferreira et al. (2011) estes valores são interessantes em bactérias que possam ser usadas como inoculantes, tendo em vista que a manutenção da nodulação durante a fase reprodutiva pode resultar num aumento da produtividade.

Observou-se que o Inoculante testado obteve resultados positivos o que pode estar relacionado com a sua adaptabilidade ao ambiente do município de Areia-PB, contudo não significa que esta pode ser recomendada para a região tendo em vista que este experimento foi realizado em ambiente controlado, e em campo há fatores externos que podem influenciar em um baixo desempenho, fatores estes que devem ser mais estudados.

Para os valores de massa seca de parte aérea MSPA obtiveram os maiores valores os tratamentos 3 e 4 (3,20g e 2,67g) respectivamente, os tratamentos com e sem nitrogênio obtiveram valores semelhantes, isto pode estar relacionado ao fato da aplicação de nitrogênio ter sido realizada 2 vezes com intervalos de 15 dias, com alíquotas de solução nitrogenada e a proporção não tenha sido suficiente para promover

o acúmulo de biomassa nas plantas, fazendo com que não diferenciasses estatisticamente do controle. (Tabela 5).

Para a variável de nitrogênio total apenas os tratamentos 3 e 4 obtiveram as maiores médias, não diferenciando ambas estatisticamente, este resultado demonstra que estes dois isolados são eficientes para estas condições (tabela 7).

Quanto a eficiência relativa de fixação de nitrogênio (ERF) o tratamento com nitrogênio foi o que obteve maior percentagem, entretanto os tratamentos 3 e 4 foram os que obtiveram as maiores médias 37,01% e 31,75%, os tratamentos com e sem nitrogênio e a estirpe recomendada obtiveram valores menores, este valor baixo da estirpe que também foi observado nas outras variáveis, e pode estar relacionado com a adaptação dela com o ambiente do município de Areia-PB, os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si.

**Tabela 6.** Análise de variância para: número de nódulos (NN); massa seca de nódulos (MSN); massa seca de parte aérea (MSPA); Índice de eficiência relativa de fixação de nitrogênio (ERF).

Tratamentos	Médias				
	NN (Nº/vaso)	MSN (g/vaso)	MSPA (g/vaso)	Ntotal (mg/vaso)	ERF (%)
<b>Nitrogênio</b>	0,00d	0,00c	1,59c	2,19c	100,00a
<b>Testemunha</b>	0,00d	0,00c	1,00c	1,29c	0,00d
<b>1- UFLA 03-84-6/2010</b>	125,40c	0,17b	2,02b	3,46c	19,85c
<b>2- UFPB Vu 08</b>	68,00d	0,12b	1,47c	3,51c	12,46c
<b>3- UFPB Vu 14</b>	305,20a	0,29a	3,20a	8,38a	31,75b
<b>4- INOCULANTE</b>	342,80a	0,28a	2,67a	9,76a	37,01b
<b>5- UFPB Vu 02</b>	150,00b	0,22a	2,14b	5,46b	20,68c
<b>6- UFPB Vu 05</b>	234,20b	0,20b	2,40b	4,66b	19,80c
<b>7- UFPB Vu 04</b>	131,60c	0,17b	1,88b	4,95b	17,68c
<b>8- UFPB Vu 31</b>	211,00b	0,26a	2,10b	4,95b	18,73c
<b>9- UFPB Vu 12</b>	170,40c	0,25a	2,13b	4,89b	18,53c

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-knott a 1% de probabilidade.

**Tabela 7.** Correlação Pearson entre as variáveis estudadas.

<b>Interação</b>	<b>Correlação</b>	<b>Contagem</b>	<b>Significância</b>
<b>MSN x NN</b>	0,8692	55	<,0001*
<b>MSPA x NN</b>	0,8044	55	<,0001*
<b>MSPA x MSN</b>	0,8229	55	<,0001*
<b>Ntotal x NN</b>	0,8261	55	<,0001*
<b>Ntotal x MSN</b>	0,8047	55	<,0001*
<b>Ntotal x MSPA</b>	0,8102	55	<,0001*

Apesar dos valores de correlação serem baixos eles corroboram com Pimratch et al. (2004b) que fala que durante a fase vegetativa estes resultados são normais.

Com os resultados expressos na tabela 8, pode-se notar que ERF de acordo com a correlação de Pearson não está diretamente relacionada com a quantidade de massa seca de parte aérea do feijão-caupi.

De acordo com a (Tabela 8) pode-se notar que nem todas as variáveis possuem interação entre elas, onde nem todas obtiveram resultados significativos. Também se pode notar que o aumento da MSN influencia também no aumento da MSPA, resultados como esse foram encontrados também por Nascimento et al. (2010). Pimratch et al. (2004 a,b) sugerem que o acúmulo da MSPA é a característica mais confiável para seleção de cultivares com maior potencial simbiótico em solos com baixa disponibilidade de nitrogênio.

Entretanto estes resultados não convergem com os encontrados por Nascimento et al., (2010) que segundo os autores a produção de biomassa e de nitrogênio total, foram influenciados pela capacidade de fixação do isolado, resultados com alta correlação envolvendo as variáveis de biomassa seca de parte aérea, nitrogênio total e eficiência relativa em Amendoim na zona da mata pernambucana foram encontrados por Silva (2007), Apesar dos valores de correlação serem baixos eles corroboram com Pimratch et al. (2004b) que fala que durante a fase vegetativa estes resultados são normais.

## **5. CONCLUSÃO**

Os solos de zona úmida da Caatinga possuem bactérias fixadoras de nitrogênio e que dentre estes isolados estudados os melhores foram os tratamentos 3 e 4 que corresponde a estirpe encontrada nos solos do município de Areia-PB (UFPB Vu 14) e o Inoculante comercial. Número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca de parte aérea, nitrogênio total estão relacionados entre si. Este estudo ressalta a importância e necessidade do estudo destes microrganismos e o seu potencial na fixação de nitrogênio na cultura do feijão-caupi na Paraíba.

## 6. REFERÊNCIAS

- BAIS, H.P.; PARK, S.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R.M. E VIVANCO, J.M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**. vol.9, n.1, p.26-32, 2004.
- BERTINI, C. H. C. M.; TEÓFILO, E. M.; DIAS, F. T. C. Divergência genética entre acessos de feijão caupi do banco de germoplasma da UFC. **Revista Ciência Agrônômica**, v.40, n. 01, p. 99-105, 2009.
- BEZERRA, A.K.P.; LACERDA, C.F.; HERNANDEZ, F.F.F; SILVA, F.B.; GHEYSI, H.G. Rotação cultural feijão-caupi/milho utilizando-se águas de salinidades diferentes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.5, p.1075-1082, 2010.
- BROCKWELL, J.; HELY, F.W; NEAL-SMITH, C.A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Tamworth, v.6, p.365-370, 1966.
- CHAGAS JUNIOR, A.F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R.R.; SANTOS, G.R.; CHAGAS, L.F.B. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, CE. v. 41, n. 4, p. 709-714, 2010.
- COLLA, G.; ROUPAHEL, Y.; CARDARELLI. Effect of salinity on yield, fruit quality, leaf gas exchange, and mineral composition of grafted watermelon plants. **Hort Science**, v. 41, n. 3, p. 622–627, 2006.
- DAMATTA, F. M. Ecophysiology of tropical tree crops: an introduction. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 239-244, 2007.
- DOMINGUÉZ-FERRERAS, A.; MUÑOZ, S.; OLIVARES, J.; SOTO, M.J.; SANJUÁN, J. Role of potassium uptake systems in *Sinorhizobium meliloti* osmoadaptation and symbiotic performance. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.191, n.7, p.2133-2143, 2009.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2014): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2015. Disponível em: . Acesso em: 08 de jan. de 2018.
- EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3.ed. Brasília, 353p. 2013.
- FAO, 2015. PRODUÇÃO MUNDIAL DE FEIJÃO-CAUPI. Disponível em: (<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>). Acesso em: 07 de jan. 2018.
- FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). O caupi no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 1988. p. 26-46.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V.Q.; ROCHA, M.M.; SILVA, K.J.D.; NOGUEIRA, M.S.R.; RODRIGUES, E.V. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

- 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. **Bragantia**. V. 66, n.3, p. 497-504, 2007.
- GIANLUPPI, D. Características pedoclimáticas dos cerrados. Boa Vista: Embrapa Roraima, 1997. 2p. (Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, 04).
- HAFEEZ, F.Y. Competition between effective and less effective strains of *Bradyrhizobium* spp. for nodulation in *Vigna radiata*. **Biology and Fertility of Soils**, v.33, n.5, p. 382-386, 2001.
- HARA, F.A. S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v.34, p.343-357, 2007.
- HIRSCH, A.M.; BAUER, W.D.; BIRD, D.M.; CULLIMORE, J.; TYLER, B. e YODER, J.I. Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. **Ecology**, v.84, n.4, p.858- 868, 2003.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- KÖPPEN, W. Der geographische system der klimate. In: KOPPEL, W., GEIGER, R. (Ed.) Handbuch der klimatologie. Berlin: Borntrager, 1936. v.1 part c.
- THORNTHWAITE, C.W. An approach towards a rational classification of climate. *Geographical Review*, London, v.38, p.55-94, 1948.
- LIEVEN-ANTONIOU, C.A. e WHITTAM, T.S. Specificity in the symbiotic association of *Lotus corniculatus* and *Rhizobium loti* from natural populations. *Molecular Ecology*, v.6, p.629-639, 1997.
- LIMA, C. J. G. S.; OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS J. F.; OLIVEIRA M. K. T.; ALMEIDA JÚNIOR, A. B.; Resposta do Feijão Caupi a Salinidade da Água de Irrigação. *Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável*. Mossoró, RN. v.2, n.2, p. 79–86, 2007.
- LUCENA, R. R. M.; NEGREIROS, M.Z.; MEDEIROS, J.F.; GRANGEIRO, L.C.; MARROCOS, S.T.P. Crescimento e acúmulo de macronutrientes em melancia “Quetzale” cultivada sob diferentes níveis de salinidade da água de irrigação. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 1, p. 34–42, 2011.
- MAHMOOD, A.; ATHAR, M.; QADRI, R.; MAHMOOD, N. Effect of NaCl salinity on growth, nodulation and total nitrogen content in *Sesbania sesban*. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v.73, n.3, p.137-141, 2008.
- MANCHANDA, G.; GARG, N. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. **Acta Physiological Plantarum**, Berlin, n.30, p.595-618, 2008.
- MARTINS, L. M.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMJANE, N.G. Contribution of biological nitrogen

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

MAZARRO, S.M.; GUIMARÃES, S.S.; SZEPAHUK, V.; RODRIGUES, M.B.; PALADINI, M.V. Avaliação do tempo de autoclavagem sobre o potencial de contaminação de substrato na técnica de produção em serragem de cogumelos *Ganoderma lucidum*. **Synergismus scyentifica**. UTFPR. Pato Branco, n. 02, p. 1-4, 2007.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C.M.; LIMA, J.A.M.; FERNANDES, Y.T.D.; OLIVEIRA, V.R.; BORGES, W.L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.

MEDEIROS, E.V.; SILVA, K.J.P.; MARTINS, C.M.; BORGES, W.L. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de biologia e ciência da terra**. v.7. n.2, 2017.

MELO, E.B.S. Parâmetros fisiológicos em genótipos de amendoim inoculados com *Bradyrhizobium*. Dissertação (Mestre em Ciência Agrárias), Universidade Estadual da Paraíba, p. 44. 2013.

MERCANTE, F. M. Uso de inoculante garante economia de 3 bilhões de dólares na cultura da soja no país. Disponível em: <SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory?.**Plant and Soil**, v. 161, 1994, p. 1-10.

MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 726 p. 2006.

MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: UFLA, 2008. p.621-680.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. In: MOREIRA, F.M.S. e SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. 2 ed. Lavras. Editora UFLA, p.449-541, 2005.

NASCIMENTO, L.R.S.; SOUSA, C.A.; SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; SAMPAIO, E.V.S.B. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.5, n.1, p.36-42., 2010.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.889-895, 1997.

NOGALES, J.; CAMPOS, R.; ABDELKHALEK, H.B.; OLIVARES, J.; LLUCH, C.; SANJUAN, J. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, United States, v.15, n.3, p.225-232, 2002.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. L. de; MEDEIROS, R. D. de; SILVA, P. R. V. P.; SMIDERLE, O. J.; MOURÃO JÚNIOR, M. Técnicas de manejo para o cultivo do caupi em Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2002. 19p. (Embrapa Roraima. Circular Técnica, 03).

OLIVEIRA, F.A.; SÁ, F.V.S.; PEREIRA, F.H.F.; ARAÚJO, F.N.; PAIVA, E.P.; ALMEIDA, J.P.N. Comportamento fisiológico e crescimento de plantas de melancia sob diferentes concentrações de solução nutritiva. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 10, n. 1, p. 439–448, 2016.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B. et al. (Ed.). Advances in cowpea research. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture; Tsukuba: **Japan International Research Center for Agricultural Sciences**, 1997. p. 1-12.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F.M.; OTSUBO, I.M.N.; OTSUBO, A.A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, n.33, p.219-226, 2009.

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

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

PRAZERES, S.S.; LACERDA, C.F.; BARBOSA, F.E.L.; AMORIM, A.V.; ARAUJO, I.C.S.; CAVALCANTE, F.F. Crescimento e trocas gasosas de plantas de feijão-caupi sob irrigação salina e doses de potássio. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 9, n. 2, p. 111-118, 2015.

PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, G. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N. da S.; LACERDA, C.F. de (Eds.). Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados. Fortaleza: INCTSal, p.143–159. 2010.

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, n. 4, p. 249-256, 2007.

SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; BORGES, W.L.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G.; NASCIMENTO, L.R.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; BEZERRA, R.V. Faixa hospedeira de rizóbios isolados das espécies *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p. 20-27, 2007.

- SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v.1, n.3, p.231- 234, 1975.
- SILVA, E.F.L.; ARAÚJO, A.S.F.; SANTOS, V.B.; NUNES, L.A.P.L.; CARNEIRO, R.F.V. Fixação biológica do n<sub>2</sub> em feijão-caupi sob diferentes doses e fontes de fósforo solúvel. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 394-402, 2010.
- SILVA, K.J.D.; ROCHA, M.M.; MENEZES JÚNIOR, J.A. Cultura do Feijão-caupi no Brasil. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2016. 10p. (Embrapa Meio-norte. Circular Técnica, 01).
- SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F; FIGUEIREDO, M.V.B. Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.28, n. 3, 2006, p. 407-412.
- SINGH, B.; KAUR, R.; SINGH, K. Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, n.20, p.3671-3676, 2008.
- SINGLETON, P.W.; SWAIFY, S.A.; BOHLOOL, B.B. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, n.4, p.884-890, 1982.
- SMARTT, J. Grain legumes: evolution and genetic resources. Cambridge: Cambridge University Press, 333 p. 1990.
- STROSCHEIN, M.R.D. Seleção de rizóbios e efeito do nitrogênio na simbiose com alfafa e cornichão. Tese (Doutor em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 140. 2011.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2.ed. Porto Alegre, Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).
- THIES, J.E.; BOHLOOL, B.B.; SINGLETON, P.W. Subgroups of cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1540-1545, 1991.
- TONON, B. C. A compatibilidade simbiótica e caracterização de rizóbios de *Lotus* spp., isolados de solos do rio grande do sul. Dissertação (Mestre em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 80. 2008.
- VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Biologia dos solos do cerrado. Planaltina: EMBRAPAC, 524 p. 1997.

VINCENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v.287, p.3-14, 2006.

WILLEMS A. The taxonomy of rhizobia: an overview. In: VELAZQUEZ, E; BARRUECO, C. (Ed.) First international meeting on microbial phosphate solubilization. Berling: **Springer**, 2007. p. 314

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. 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, 1998.

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

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro. **Caatinga** (Mossoró, Brasil), v. 20, n. 4, p. 01-09, 2007.

XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L. Influência da inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e produtividade de grãos de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 2037-2041, 2008.

XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 572-575, 2007.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of Rhizobia. **Agronomie**, Paris, v. 21. n. 6, p. 569-576. 2001.

ZHANG, W.T.; YANG, J.K.; YUAN, T.Y.; ZHOU, J.C. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, v.44, p.201-210, 2007.

ZILLI, J. É; MARSON, L. C.; MARSON, B. F; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Revista ACTA Amazônica**. 2009.

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

ZILLI, J.É.; VALICHESKI, R.R.; RUMJANEK, N.G.; SIMÕES-ARAÚJO, 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.

## 7. APÊNDICES

**Tabela 8.** Análise de variância dos testes fisiológicos Irga e Clorofilog, (Ci): Carbono Interno; E: Transpiração; (gs): Condução Estomática; (A): Assimilação líquida de gás Carbônico; e Clorofila total.

F.V	Quadrados Médios					
		Ci	E	gs	A	Clorofila
<b>Tratamento</b>	8	4045,67**	3,61**	0,19**	35,83**	46,15**
<b>Resíduo</b>	18	42,89	0,00	0,00	0,50	4,63
<b>C.V (%)</b>	-	2,16	1,35	2,85	8,21	5,14
<b>Total</b>	26	-	-	-	-	-

\*\*Significativo a 1%

**Tabela 9 .** Médias dos testes fisiológicos Irga e Clorofilog: (Ci) Carbono Interno; (E) Transpiração; (gs) Condução Estomática; (A) Assimilação líquida de gás Carbônico; e Clorofila Total.

Tratamentos	Médias				
	Ci	E	Gs	A	Clorofila
<b>10- UFLA 03-84-6/2010</b>	262,33c	2,12f	0,09f	6,56c	44,30a
<b>11- UFPB Vu 08</b>	271,66c	4,00e	0,21d	11,83b	40,05b
<b>12- UFPB Vu 14</b>	249,00d	4,17d	0,22d	14,57a	44,20a
<b>13- INOCULANTE</b>	325,66a	4,15d	0,20d	5,99c	47,83a
<b>14- UFPB Vu 02</b>	339,33a	4,87c	0,26c	5,45c	36,70b
<b>15- UFPB Vu 05</b>	339,67a	5,63a	0,32a	6,71c	41,23b
<b>16- UFPB Vu 04</b>	347,00a	5,69a	0,33a	5,98c	45,37a
<b>17- UFPB Vu 31</b>	292,00b	5,26b	0,30b	12,70b	36,20b
<b>18- UFPB Vu 12</b>	301,67b	4,18d	0,18e	7,47c	40,71b

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-knott a 1% de probabilidade.