

PHILIPPE CÁSSIO DE ALMEIDA

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE  
LEGUMINOSAS EM CULTIVOS SOLTEIROS E CONSORCIADOS COM  
GRAMÍNEAS**

Serra Talhada – PE  
2020

**A  
L  
M  
E  
I  
D  
A**

**P  
C**

**D  
I  
V  
E  
R  
S  
I  
D  
A  
D  
E**

**E  
·  
·  
·  
2  
0  
2  
0**

PHILIPÉ CÁSSIO DE ALMEIDA

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE  
LEGUMINOSAS EM CULTIVOS SOLTEIROS E CONSORCIADOS COM  
GRAMÍNEAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos.

Coorientadora: Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas.

Coorientador: Dr. Vinicius Santos Gomes da Silva.

Serra Talhada -PE

2020

447

ALMEIDA, Philipe Cássio de  
DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS EM CULTIVOS  
SOLTEIROS E CONSORCIADOS COM GRAMÍNEAS / Philipe Cássio de ALMEIDA. - 2020.  
46 f. : il.

Orientadora: Carolina Etienne de Rosalia e Silva Santos .  
Coorientadora: Ana Dolores Santiago de Freitas .  
Inclui referências e apêndice(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Serra Talhada, 2020.

1. Microbiota. 2. Nordeste. 3. Nitrogênio. 4. Rizóbio. 5. Semiárido. I. Santos , Carolina Etienne de Rosalia e Silva,  
orient. II. Freitas , Ana Dolores Santiago de, coorient. III. Título

CDD

---

PHILIFE CÁSSIO DE ALMEIDA

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE RIZÓBIOS DE LEGUMINOSAS EM  
CULTIVOS SOLTEIROS E CONSORCIADOS COM GRAMÍNEAS  
CULTIVADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

APROVADA em 14/02/2020

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos – UFRPE  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Dolores Santiago de Freitas – UFRPE  
Coorientadora, Examinador Interno

---

Prof. Dr. Vinicius Santos Gomes da Silva – IFPE  
Coorientador, Examinador Externo

A minha família por tudo;  
Aos meus pais, pelo apoio em especial;  
À Bárbara Mendes pelo companheirismo;  
À Maria Da luz de Melo, uma estrela que  
brilha no infinito...

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À vontade de potência que reside em mim, aos meus familiares, em especial Renata Rosa da Silva, Jackeline Rosa da Silva, Helenice Dornelas R. Silva, Edson de Melo, Diego de Melo e Nicacio Bezerra da Silva por sempre fazerem de suas casas as minhas.

Aos meus amigos, Ernesto Ângelo, Leandro dos Santos, Ricardo Lúcio de Almeida, Demidrus Sá, Regina Maria, Fernanda Larissa, Hélio Marcos Leão e Diego Lucílio pela amizade sincera, consideração, respeito e momentos que só quem tem amigo entende.

A minha orientadora Dra. Carolina Etienne de Rosália S. Santos e equipe por pensar em cada situação e avaliá-la da melhor forma possível e por compartilhar o dom de ensinar de uma forma que não se vê mais por aí, à sua equipe pela ajuda, pela dedicação em ensinar as técnicas necessárias com paciência. A todas as famílias que permitiram através de seus impostos que fosse possível usufruir das assistências universitárias. A meus pais pelo amor incondicional. À escola Primeira Classe pela oportunidade e confiança. A minha namorada por ser mais que namorada, ser companheira, paciente, paciente e um pouco paciente. À UFRPE-SEDE e UFRPE -UAST, por tudo. À todos envolvidos direto e indiretamente.

## RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo natural que ocorre entre planta e bactéria em uma relação ecológica denominada de simbiose, apresentando grande capacidade para minimizar a utilização dos fertilizantes rico em nitrogênio nos sistemas agrícolas. Leguminosas e gramíneas são plantas importantes tanto no sentido socioeconômico quanto ambiental, no que tange a redução de impactos das práticas agrícolas sobre o meio, além de sua capacidade de fixação de N juntamente com bactérias diazotróficas assim como cultivadas em consórcio que pode afetar a diversidade e eficiência. O objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade e eficiência de rizóbios obtidos de nódulos radiculares das leguminosa feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* (L)) em cultivos consorciados e solteiros com as gramíneas milho, (*Zea mays* L); sorgo, (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); ou milheto, (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), bem como se o consórcio altera diversidade e eficiência das populações de rizóbio. O experimento foi conduzido em campo após o processo de isolamento, autenticação e seleção das bactérias, utilizando amostras da camada superficial de um Planossolo. Obedecendo a um delineamento em blocos ao acaso com 5 repetições e 4 tratamentos. Os índices de diversidade foram calculados e apresentaram médias para: Índice de Shannon-Weaver ( $H'$ ) 1,80, Índice de Simpson com 0,78, Índice de margalef com 2,95 e Índice de Equabilidade de Pielou com 0,95. A avaliação da eficiência média no processo de fixação de  $N_2$  constatou que nenhum dos tratamentos foi considerado ineficiente, o tratamento B1T17 foi considerado eficiente com 63,03,18% em relação ao controle, já o tratamento B1T12 mostrou-se eficiente com 100% de eficiência em relação ao controle e a estirpe recomendada para feijão caupi apresentou 83,18% de eficiência. Ao nível de produtividade média o tratamento B1T17 produziu a maior média com  $520 \text{ Kg/ha}^{-1}$  estando acima da média nacional, enquanto que o tratamento B1T12 produziu  $360 \text{ Kg/ha}^{-1}$  e por fim o tratamento nitrogenado (N) com  $450 \text{ Kg/ha}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** Microbiota; nordeste; nitrogênio; rizóbio; semiárido

## ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (BNF) is a natural process that occurs between plants and bacteria in an ecological relationship called symbiosis that presents great capacity to minimize the use of nitrogen-rich fertilizers in agricultural systems. Legumes and grasses are important plants in both the socioeconomic and environmental senses in relation to the reduction of impact from agricultural practices on the environment in addition to their ability to fix N together with diazotrophic bacteria, as well as cultivated in intercropping that can affect diversity and efficiency. The aim of the present study was to evaluate the diversity and efficiency of rhizobia obtained from root nodules of leguminous cowpea and pork bean in intercropped and single crops with maize grasses (*Zea mays* L); sorghum, (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); or millet, (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), as well as whether nodules in consortium alter diversity and efficiency. The experiment was carried out in the field after the process of isolation, authentication and selection of bacteria, using samples of the top layer of a Planossol, following a randomized block design with 5 repetitions and 4 treatments. The diversity indices were calculated and presented averages for: Shannon-Weaver index ( $H'$ ) 1.80, Simpson index with 0.78, Margalef index with 2.95 and Pielou Equability Index with 0.95. The evaluation of the average efficiency in the N<sub>2</sub> fixation process found that none of the treatments was considered inefficient, the B1T17 treatment was considered efficient with 63.03.18% in relation to the control, whereas the B1T12 treatment was efficient with 100% of efficiency in relation to control and the recommended strain for cowpea showed 83.18% efficiency. At the level of average productivity, the B1T17 treatment produced the highest average with 520 Kg / ha-1 being above the national average, while the B1T12 treatment produced 360Kg / ha-1 and finally the nitrogen treatment (N) with 450 Kg / ha -1.

**Keywords:** Microbiota; northeast; nitrogen; rhizobia; semiarid

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Local de coleta. Fonte: adaptado de Silva, 2018.....	27
Figura 2.Processo de isolamento bacteriológico .....	28
Figura 3.a) Processo de Inoculação em feijão-caupi, cultivar IPA 206; b) Plantação das sementes desinfestadas; c) Isolados.....	30
Figura 4.Isolados com alteração de pH em processo de fabricação de muco. ....	36
Figura 5.Dendrograma UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard de 82 isolados e 45 grupos com 8 representantes e similaridade de 100% após o processo de caracterização fenotípica. ....	36
Figura 6.Índices de diversidade dos isolados. ....	37
Figura 7.Avaliação da eficiência média no processo de fixação de nitrogênio em função dos isolados consorciados e solteiros. B1T17- Isolado de feijão-caupi; S/INOC- Tratamento sem inoculante; BR3267- Estirpe Recomendada para feijão-caupi; B1T12- Isolado de Milheto em consórcio com feijão-caupi.....	39
Figura 8.Média da massa seca da parte aérea, submetidos ANOVA e teste de Tukey a 95% de confiança não diferindo estatisticamente entre si.....	39
Figura 9.Média da massa seca da raiz, submetidos ANOVA e teste de Tukey a 95% de confiança diferindo estatisticamente entre si.....	40
Figura 10.Produtividade média em quilogramas por hectare em função dos tratamentos. ....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados: B1T12 (Feijão-caupi em consórcio com milho), B1T17 (Feijão-caupi solteiro); número de nódulos e massa seca dos nódulos.....	31
Tabela 2. Características químicas e granulometria do solo referente a estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim PE (EAIP) Sertão de Pernambuco. ....	32
Tabela 3. Caracterização fenotípica dos isolados de nódulos oriundos de raízes de leguminosas solteiras e em consórcio com gramíneas de um planossolo. ....	35

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 A região semiárida .....	15
2.2 As leguminosas .....	16
2.3 As gramíneas tropicais .....	18
2.4 Consórcios entre gramíneas e leguminosas.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Localização, coleta e caracterização do solo.....	27
3.2 Isolamento bacteriano e caracterização de isolados de rizóbios .....	27
3.3 Autenticação em condições estéreis .....	30
3.4 Experimento de campo.....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1 Características fenotípicas dos isolados.....	34
4.2 Agrupamentos dos isolados.....	36
4.3 Avaliação da eficiência fixadora.....	38
4. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
APÊNDICE .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade do solo é responsável pela estabilidade e mudança do ecossistema estando ligada direta ou indiretamente a processos de formação do solo, ciclagem e armazenamento de nutrientes. A melhor compreensão da diversidade da microbiota do solo, pode proporcionar desenvolvimento de estratégias que permitam a otimização dos processos biológicos que visem aumentar a sustentabilidade dos agrossistemas. De uma maneira geral, a diversidade dos microrganismos reflete as associações obrigatórias ou facultativas com organismos superiores, como as plantas (ODUM, 1988). Desta forma, as bactérias conhecidas genericamente, como rizóbios, que formam associações com plantas leguminosas, possuem grande importância na ciclagem de nutrientes, pois como fixam nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) simbioticamente, também devolvem via ciclo biogeoquímico este nutriente ao sistema (FRANCO & BALIEIRO, 2000).

Contudo grande parte das bactérias presentes no solo estão interagindo fortemente com as plantas proporcionando além da fixação biológica do nitrogênio, seu crescimento, induzindo a produção de hormônios e produzindo substâncias antifúngicas assim como outros fatores importantes ao desenvolvimento e sobrevivência do vegetal (VESSEY, 2003; HARA e OLIVEIRA, 2005; MARRA et al., 2012 E COSTA et al., 2013). Sociocultural e economicamente importante no Brasil e em regiões específicas, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), se destaca por ser um dos principais alimentos consumidos pela população, rico em proteínas, e utilizado em dietas é muito produzido pelo pequeno produtor, que em sua totalidade abarca uma parcela significativamente considerável em todo o país (PELEGRIN et al., 2009).

No interior nordestino é cultivado assim como também consumido, em larga escala, apresentando produtividade média ainda baixa com cerca de 400kg ha (IBGE, 2016). Isso pode ser explicado por vários fatores como, por exemplo, a localização geográfica da região, o período de seca sazonal e a forma de cultivo (LOLLATO, SEPULCRI & DEMARCHI, 2001).

A absorção de nitrogênio, pelas plantas, pode ocorrer tanto no solo, as custas de acúmulo de matéria orgânica e fertilizantes minerais como através do processo da fixação biológica (FAGAN et al, 2007). Em sistemas agrícolas de subsistência, como os praticados predominantemente no semiárido brasileiro, a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), contribui para aumentar a disponibilidade de N no solo e para a cultura do feijão-caupi é uma alternativa poderosa, que demanda baixo custo, assim como dispõe de condições ambientais propícias, o que porventura acaba minimizando a utilização ou em alguns casos até mesmo substituindo ou complementando o nitrogênio fornecido através de fertilizantes industriais (PELEGRIN et al, 2009).

Muitas vezes a opção por essa alternativa é alvo de desconfianças, que vem ao longo do tempo perdendo força graças a vários estudos de campo, comprovando que, cultivares que exigem maior demanda, (ciclo por volta de 80 e 90 dias) estando sob condições favoráveis e noduladas corretamente, tendem a exceder os 40 kg N ha<sup>-1</sup> (HUNGRIA et al,2003). A utilização química na forma de fertilizantes com o intuito de repor nutricionalmente o solo, se torna inviável para a maior parte dos agricultores da região, tanto pelo seu alto preço no mercado quanto pela instabilidade climática, podendo não apresentar os resultados esperados de determinada cultura quando aplicado (SAMPAIO et al., 2009).

Quando o solo é submetido à cultivos de forma recorrente a tendência é que se esgote ao ponto de se tornar obsoleto e entregue ao processo de sucessão ecológica secundária. Desta forma a FBN se torna uma ferramenta multifuncional dentro de agrossistemas, permitindo recuperação desses locais de forma mais eficiente utilizando leguminosas associadas simbioticamente a bactérias que fixam nitrogênio (YUAN et al., 2016). Assim sendo, uma alternativa para minimizar a deficiência de N nos sistemas de produção é a inclusão do manejo adequado da FBN em culturas capazes de se associar com bactéria fixadoras (tanto leguminosas, quanto gramíneas) que podem desempenhar um papel crucial na manutenção de estoques adequados de nitrogênio no solo (FREITAS et al., 2015). O aumento do potencial de nitrogênio no sistema pode ser uma alternativa quando se utiliza o processo de consórcio. Tal estratégia envolve gramíneas e leguminosas o que promove uma diminuição na utilização dos produtos nitrogenados como fertilizantes.

O consórcio exige estratégias no plantio que sistematicamente inserem as leguminosas entre fileiras de gramíneas, desta forma uma parte do nitrogênio proveniente da fixação biológica é transcolado para a gramínea e vice-versa que se encontra em associação. O solo, é recompensado quando se utiliza tal procedimento, visto que, os nutrientes das leguminosas, referente a sua biomassa se encontram disponíveis ao serem cortados, contribuindo para um solo adequadamente nutrido e livre de fertilizantes.

Assim sendo foi desenvolvida a hipótese que rizóbios em simbiose com as leguminosas, feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) consorciadas com gramíneas, milho, (*Zea mays*) L; sorgo, (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); ou milheto, (*Pennisetum glaucum*) são mais diversificados e eficientes em fixar nitrogênio. Desta forma o objetivo geral do presente estudo foi avaliar a diversidade e eficiência de bactérias obtidas de nódulos radiculares das leguminosas feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) em cultivos consorciados e solteiros com as gramíneas, milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), ou milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.).

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1A região semiárida**

A região Nordeste do país representa aproximadamente 18,2% da área total do país. Com 1.56 milhão de km<sup>2</sup> (EMBRAPA, 2007). Tal região, encontra-se a grande parte do Semiárido brasileiro, abrangendo 75% do Nordeste (1.170.000 km<sup>2</sup>) e 13% do Brasil (IBGE, 2001). A área de abrangência do Semiárido se caracteriza pelo clima quente e seco, com precipitações pluviométricas entre 300 e 800 mm, oscilando, também, as épocas de começo e de final da estação de chuva. As chuvas irregulares são características desta região semiárida, que apresenta baixos índices pluviométricos e grandes períodos de seca (NYS & ENGLE, 2014; HASTENRATH, 2012).

A região semiárida brasileira comporta mais de 23,8 milhões de pessoas, ou seja, cerca de 11,84% da população brasileira. Destacando-se por ser uma das regiões semiáridas mais populosa em todo mundo, mesmo possuindo pluviosidade média no ano abaixo dos 800mm ainda assim é a região semiárida que mais chove no planeta. (NEVES et al., 2010; ASA, 2016).

## 2.2 As leguminosas

Considerada uma planta tropical, pertencente à família Fabaceae, o feijão-deporco, (*Canavalia ensiformis*) promove cobertura por suas folhas grandes, é uma planta anual e ereta, além de possuir capacidade de crescer em solos ácidos, associando-se a bactérias fixadoras de nitrogênio de forma natural (EMBRAPA, 2000). É bastante usado na adubação verde, substituir ou complementar a adubação mineral adicionando matéria orgânica aos solos fornecendo nutrientes ao através da decomposição de sua biomassa e contribuindo com a ciclagem de nutrientes.

A adubação verde é uma técnica baseada no uso de plantas que são incorporadas ao solo com a finalidade de melhorar sua qualidade física e fornecer nutrientes, aumentando assim a capacidade produtiva do solo de forma sustentável, pois não há adição de fertilizantes nitrogenados. Outra função importante do feijão-deporco é como controle biológico de patógenos do solo (CRUZ et al., 2013; FUSLANETTO et al., 2008; OLIVEIRA, CARVALHO & MORAES, 2002), pelo fato de conter substâncias e compostos resultantes do metabolismo de aminoácidos como, enzimas, glicoproteínas e polipeptídios que possuem a capacidade de diminuir a taxa populacional dos indivíduos causadores de doenças, há também uma enzima (uréase) que é capaz de inibir o desenvolvimento e a germinação de várias espécies de fungos fitopatogênicos do tipo filamentoso (LÓPEZ, 2012).

Espécies da família das leguminosas são as mais utilizadas nessa prática, devido à sua capacidade de fixar  $N_2$  mediante simbiose com rizóbios; sua baixa relação Carbono/Nitrogênio (C/N), aliada à grande presença de compostos solúveis, que favorecem a rápida decomposição e mineralização; além de possuírem sistema radicular profundo e ramificado, com capacidade de extrair nutrientes nas camadas mais profundas do solo (FERREIRA et al., 2011; PARTELLI et al., 2011). Sua utilização é ideal para o cultivo em consórcio, pelo fato de apresentar morfológicamente e fisiologicamente boas características, uma delas é a adaptabilidade mediante luz difusa (HENRICHS et al., 2002), promovendo parcialmente a sombra através da cultura primária assim como um crescimento rápido (ALVARENGA et al., 1995).

Através da caracterização tanto bioquímica quanto genética tornou-se possível identificar quais bactérias estavam, exatamente, associadas ao feijão-de-porco com o intuito de estudar seu potencial ecológico, autenticação de estirpes envolvidas na produção de inoculantes para o varejo (CHUEIRE, et al.,2003) e por fim já em posse das informações supracitadas, formular estratégias para selecionar estirpes que sejam eficientes para a FBN (COSTA,2014).

Conhecido por vários nomes populares o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), feijão de corda, feijão fradinho ou feijão macassar, detém um valor cultural assim como comercial para o país, fazendo parte de um dos alimentos mais importante presente nas mesas dos brasileiros, com maior vigor no norte e nordeste, além de comportar um alto teor proteico (AKANDEA, 2007) e nutritivo, sendo ainda fonte de renda para populações urbanas e rurais. Tendo como centro de origem o continente africano (MOSTASSO et al. 2002), seu cultivo neste continente é extremamente forte, assim como também, em países da Ásia (FILHO, 2005). Ao longo dos tempos e do conhecimento de sua cultura logo se adaptou as condições tropicais úmidas (VALADARES et al. 2010).

A introdução do feijão-caupi no Brasil, se deu por volta do século XVI com fortes indícios que apontam para o estado da Bahia (FILHO, 2011). Após sua introdução, o feijão-caupi apresentou elevada plasticidade aos fatores abióticos (FREIRE FILHO et al. 2005; ROCHA et al. 2007; OLIVEIRA et al. 2011), ou seja, mostrou-se bem adaptado a várias regiões e seus diferentes climas e sistemas produtivos (BEZERRA et al. 2008; ARAGÃO et al. 2011; SOUZA et al. 2011), chegando a ter grande relevância entre as leguminosas de grãos, potencializando ainda mais seu perfil nutricional e seu consumo oferecendo também um maior custo benefício (FILHO, 2011). Estratégias que possibilitem uma maior fixação de N<sub>2</sub> são fundamentais para transformar ainda mais o cultivo do feijão-caupi, proporcionando aumentos em termos de produção de grãos e competitividade.

### 2.3 As gramíneas tropicais

Com centro de origem no México e América Central, o milho (*Zea mays* L.) pertence à família Poaceae, tem seus primeiros cultivos registrados há pelo menos 7300 anos. Foi considerado por muitos pesquisadores a espécie mais bem cultivada no mundo, contudo necessita ainda de inúmeros estudos com relação a sua dispersão assim como dos aspectos expansivos, geográficos e evolutivos (CARVALHO et al., 2002; 2011). Excelente grão, no que tange aos aspectos alimentícios humanos e animais, também é responsável por movimentar um grande comércio interno e externo (GLATE, 2002).

O Brasil é um dos maiores produtores de milho do mundo. Cerca de 52% do milho que é produzido no mundo inteiro está na América, e o Brasil se encontra em posição de destaque, sendo o terceiro maior produtor do mundo (EMBRAPA, 2012). Quando o cultivo do milho está associado ao processo de inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio é gerada uma economia significativa de aproximadamente US\$ 1,2 bilhões a cada ano, porém, ainda assim o Nitrogênio industrial complementa 50% tal cultura (HUNGRIA et al., 2010).

No ano de 2017, o Brasil se destacou pelo seu potencial de produção de culturas agrícolas que fechou em mais de um bilhão de toneladas, desses, 97,84 milhões foram atribuídos ao milho (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2018). Entretanto, existem áreas onde a produção atinge resultados menos expressivos, seja pelo tipo de clima ou do solo, o que alimenta ainda mais as buscas por resultados que intensifiquem eficientemente a produção nessas regiões que não alcançaram bons rendimentos, mas que possuem um potencial produtivo significativo.

Domesticado supostamente na Etiópia, por volta de 5000 anos, o sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) teve seu cultivo inicial, na África Ocidental, a começar do Sudão até o rio Niger. Sua domesticação pode ter se processado por volta de 1500 anos, bem antes do desenvolvimento dos arados de madeira (FERNANDES, 1981). Considerado no Brasil como uma cultura recente, sendo comercialmente ativo na década de 70 no Rio Grande do Sul e São Paulo, o sorgo, apesar de contemporâneo atingiu uma área relativamente grande de plantio com cerca de 80 mil hectares (LIRA, 1981).

Grande parte dos estudos envolvendo sorgo é baseada na ideia de estudar a competitividade entre as cultivares. Contudo, mesmo apresentando esse potencial em termos de produção e da gama de disponibilidade de cultivares que se adequam as múltiplas regiões, pôde ser observado também produções baixas e inconstantes, apontando como responsável a fertilidade do solo e as pequenas aplicações de fertilizantes em áreas de silagem, que dependem, especialmente, das características do material de origem e do acondicionamento (NETO, et al.,2002). O pastejo/corte e fenação e a cobertura morta ou vassoura abrangem, em termos gerais, outras utilizações do sorgo (SANTOS et al., 2013;). Porém quando o sorgo é utilizado de forma consorciada com a soja por exemplo a produtividade por unidade de área resultou em até 46% de retorno monetário, quando comparado com seu cultivo solteiro (IQBAL et al., 2017). O milheto (*Pennisetum glaucum* (L.)) pertencente à família Poaceae, teve origem em continente africano e no Brasil regionalizou-se através do "pasto italiano". Sua cultura se destaca por ter rusticidade e grande capacidade de adaptação a ambientes semiáridos, ou seja, são plantas xerófitas e desenvolveram ao longo do tempo eficientes mecanismos de resistência à seca (TABOSA,1999).

O milheto possui um manejo fácil e disponibiliza um sistema de raízes eficientes (áreas laterais), que buscam nutrientes nas camadas mais profundas, trazendo-os para mais próximo das camadas superficiais do solo. Tamanha sua capacidade que mesmo quando a disponibilidade hídrica se encontre escassa, ainda sim absorvem água (TORRES et al., 2014).

O estudo, entendimento e a caracterização da microbiota do solo podem proporcionar a criação de métodos que potencialize os processos biológicos visando tornar o mais sustentável possível dentro de um agrossistema. Dois componentes estão associadas ao conceito de diversidade de espécie: a riqueza das espécies, apoiado pelo número total de espécies presentes, e uniformidade, apoiada pela abundância relativa das espécies e no grau de dominância (ODUM,1988). A utilização e o manejo apropriado da FBN estão entre uma das estratégias mais relevantes em várias regiões do Brasil, é incentivada pelo uso sustentável e vem proporcionando uma alimentação de qualidade e segura (SILVA et al, 2018).

A existência de bactérias envolvidas no processo não fixa o N<sub>2</sub> em quantidades superiores às que as plantas necessitam, essa técnica permite ao produtor uma redução de gastos quando comparado com a utilização de fertilizantes nitrogenados, prática que acaba evitando mais danos ao ambiente. Bactérias do gênero *Azotobacter* foram relatadas em solos ácidos pela primeira vez em 1953 através das pesquisas de Johanna Döbereiner, pioneira nos estudos referentes a FBN em gramíneas. Cinco anos mais tarde Döbereiner & Ruschel, (1958) estudaram a bactéria *Beijerinckia fluminensis* descrevendo e isolando-a de solos tropicais da rizosfera da cana de açúcar, deixando mais evidente ainda o papel dos diazotróficos de vida livre quando associados a gramíneas.

Em seguida no ano de 1975, Döbereiner & Day estudando o gênero *Spirillum*, que fora renomeado mais tarde para *Azospirillum*, chegaram à conclusão que o gênero possuía capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio endofiticamente, (TARRAND et al., 1978). Após esses estudos, várias outras espécies foram sendo descobertas, seja de vida livre (eg. *Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia fluminensis*, *Azotobacter paspali*, *Derrxia* spp., *Paenebacillus azotofixans*) sejam as endofíticas associativas, como (*Azospirillum* spp. e *Burkholderia* spp.) (*Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp.) De modo geral, os fertilizantes minerais não são tão utilizados no semiárido brasileiro prevalecendo culturas que dependem de nitrogênio (N), oriundas da matéria orgânica mineralizada e da FBN, pois regiões como a Nordeste dispõem de solos pobres ou com níveis muito baixos de N (FREITAS et al., 2010, MARTINS et al., 2015). O processo supracitado é responsável pela entrada de N em ecossistemas naturais e em agrossistemas, com valores estimados em torno de 40-60 x 10<sup>6</sup> toneladas ano<sup>-1</sup> no mundo (ERISMAN, 2011) e requer uma energia de ativação extremamente alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. Naturalmente há uma conversão do N<sub>2</sub> em amônia (NH<sub>3</sub>), sendo considerado este o segundo processo biológico mais importante do planeta, depois da fotossíntese, juntamente com a decomposição da matéria orgânica. (SILVA JÚNIOR et al., 2013).

As bactérias, os fungos, algas e actinomicetos juntos formam a microbiota do solo (SILVA & MEDONÇA, 2007). A riqueza da microbiota do solo é tão intensa que Mendes et al. (2011) inferiu que a cada um grama de solo ocorrem ali cerca de 10000 espécies distintas de microrganismos, que são de grande valia para o mercado econômico e agrônomo como, por exemplo, processos de decomposição e atividade residual da matéria orgânica junto com a ciclagem de nutrientes e associações que envolvem ação promotora ou inibidora de crescimento vegetal (ANDREOLA & FERNANDES, 2007).

A simbiose, relação interespecífica, harmônica e quase sempre estável que ocorre durante a FBN é a relação que vem sendo muito bem estudada, ocupando lugar de destaque nesse quesito. Diante disso, inúmeras espécies de rizóbios foram estudados, descritos e distribuídos da seguinte maneira: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*, entre outras, (MOREIRA, 2008).

A FBN é mediada por microrganismos edáficos que podem ou não formar associações com vegetais. Pela capacidade que possuem de fixar  $N_2$ , são denominados diazotróficos, esses organismos necessitam da presença de uma enzima para realizar o processo de fixação ou do também chamado complexo enzimático ou simplesmente nitrogenase. A nitrogenase vem sendo explorada no sentido de manipulação do seu funcionamento e a partir disso introduzir em cultivos a maquinaria para fixação de  $N_2$  do seu próprio nitrogênio através da transferência gênica direta do *nif*, genes responsáveis pela fixação de nitrogênio e essenciais para uma nova revolução agrícola (STOKSTAD, 2016; GOOD, 2018; VICENTE & DEAN, 2017).

Contudo, por mais atrativa que seja a engenharia de micro-organismos diazotróficos, tem sido algo extremamente desafiador manter a nitrogenase ativa, fornecendo energia e reduzindo o nitrogênio (BURÉN & RUBIO, 2018). Seu metabolismo torna-se instável quando a fotossíntese produz  $O_2$ , gás extremamente tóxico para sua síntese e seu funcionamento (CURATTI & RUBIO, 2014).

Grande parte do processo da FBN é catalisada pela nitrogenase mais precisamente a nitrogenase dependente de ferro e molibdênio (MoFe), que possuem dois componentes enzimáticos, a dinitrogenase de ferro-molibdênio MoFe (NifDK) e a dinitrogenase redutase da proteína de ferro Fe(NifH) (RUBIO & LUDDEN, 2008), a proteína Fe trata-se de um homodímero ou seja o acoplamento de duas moléculas de proteína idênticas que doa elétrons para MoFe (SETUBAL et al,2009). Também são necessários mais três co-fatores metal dependentes, os clusters F, P e M, que são essenciais para formação de uma haloenzima que irá transferir elétrons envolvidos na redução do  $N_2$  à  $NH^3$ , ou seja, em forma inorgânica e absorvível de N (HU & RIBBE, 2013; SICKERMAN et al, 2017).

É válido salientar que tal processo está intimamente ligado as especializações estruturais nas raízes das plantas, denominada de nódulos, permitindo a fixação do  $N_2$  por partes dos microrganismos, à compostos inorgânicos absorvíveis pelos vegetais, reduzindo ou até mesmo descartando a utilização de fertilizantes nitrogenados (MENDE; REIS; CUNHA,2010).

Estes nódulos contêm bactérias alojadas em seu interior, convivendo de forma íntima auxiliando na fixação e redução, é nesse momento que o complexo enzimático aparece, logo o nitrogênio é absorvido produzindo carboidrato, a glutamina (POOLE et al., 2018). A FBN transfere oito elétrons e hidrolisa 16 ATP por molécula de  $N_2$  fixado, sendo caracterizado como um dos processos metabólicos com maior gasto energético para a célula (REIS et al., 2006). O  $N_2$  em níveis percentuais se encontra na faixa de 78% (FELIX, 2004), naturalmente parte desse  $N_2$  se torna absorvível para a planta e consumidores primários, enquanto que a quantidade não reativa será devolvida à atmosfera através do ciclo biogeoquímico do N.

Para que ocorra tais processos é necessário que a forte ligação trivalente seja desfeita e ocorra a produção de amônio ( $NH_4^+$ ). Este balanço sofre um desequilíbrio através do uso excessivo de fertilizantes, assim como da produção energética, trazendo consequências em curto prazo, para os ecossistemas, acarretando mudanças desastrosas para o ambiente e alteração dos ciclos biogeoquímicos. O  $N_2$  também pode ser fixado quando o fenômeno dos raios ocorre via descargas elétricas e também pelo método de Haber-Bosh industrial que trabalha com temperaturas altas entre 300 a 500 °C e pressão que ultrapassa os 300 atm, cujo principal objetivo do processo é a fabricação de fertilizantes, sendo considerado pelo ponto de vista energético muito dispendioso não só energeticamente mas também ecologicamente (RIBEIRO,2013). Também pode ser fixado internamente nos nódulos, desde que o ATP esteja disponível, através do complexo nitrogenase, fundamental na redução do  $N_2$  a  $NH_3$ , utilizada pelas plantas (PEIX et al, 2001). O grupo dos diazotróficos apresentam várias formas de vida desde suas formas associativas simbióticas altamente específicas, até o estilo de vida livre. Podem ser classificados de acordo com a relação que estabelecem com os vegetais em dois tipos: associativos, habitando superficialmente ou internamente os tecidos e simbióticos, vivendo de forma mútua com os hospedeiros. (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A perda dessa biodiversidade da microbiota do solo, especialmente os microrganismos do solo alteram as populações de organismos secundários pertencentes a cadeia trófica, afetando processos como a ciclagem de nutrientes e decomposição de matéria orgânica o que empobrece o sistema agrícola e o torna dependente de fertilizantes (MOREIRA, et al.,2010).

Um processo que vem se tornando útil para se conhecer a diversidade é a caracterização genotípica das diazotróficas, mais precisamente, é o sequenciamento de genes codificadores para RNA ribossomal 16S, 23S e 5S, por se tratarem de moléculas universais que possuem funções muito específicas que se tornaram estáveis ao longo do processo evolutivo, além de não sofrerem influência do ambiente (WOESE, 1991). Existem muitas leguminosas cujo os potenciais ecológicos e alimentar estão sendo explorados e com sucesso, como é o caso da soja (*Glycine max L*) pertencente à família Fabaceae, que teve como centro de origem a China. Seus grãos possuem altos teores protéicos, servindo de alimento a humanos e animais (EMBRAPA, 2016). É considerada cultura de elite no Brasil tendo em vista seu amplo crescimento nas últimas três décadas contendo uma área plantada de 49% em todo país. Para explicar tal sucesso, foi necessário o investimento em tecnologias, o aprimoramento do manejo da leguminosa e a eficiência por parte dos produtores (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2016).

Contudo a capacidade da soja em fixar N<sub>2</sub> foi quem lhe conferiu tal êxito, principalmente quando a simbiose envolve *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (RBS, 2009). Vale ressaltar a grande relevância que a FBN vem proporcionando a agricultura assim como na silvicultura, sendo estudada e explorada por apresentar recursos que refletem na redução de custos, na diminuição dos impactos aos ecossistemas e no aumento de produtividade quando se trata de produção vegetal (HUNGRIA, 2015). Em áreas que passam pelo processo de sucessão ecológica a escolha de rizóbios endêmicos e que estejam adaptados tende a acelerar tal processo. Diante disso é imprescindível continuar selecionando estirpes rizóbicas novas com o intuito de adquirir bactérias com maior desempenho e que seja mais competitiva para utilização em fins agronômicos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Hungria et al. 2000 estudando feijoeiro no Paraná, compararam a eficiência de novos isolados, inoculando estirpes de *Rhizobium tropici* e verificaram um acréscimo de aproximadamente 900kg ha<sup>-1</sup> do grão em comparação com o controle sem inoculação e sem adubação nitrogenada com alta população de rizóbio de feijão nativo, onde grande parte dos resultados alcançados pela técnica da inoculação incluem alta competitividade e tolerância altas temperaturas.

## **2.4 Consórcios entre gramíneas e leguminosas**

Entende-se por consórcio a prática de se cultivar duas ou mais colheitas de forma simultânea na mesma porção de terra durante o mesmo intervalo de tempo (GULERIA & KUMAR, 2016). Este método vem apresentando resultados significativos pois tira vantagens da FBN envolvendo o plantio em consórcio de gramíneas e leguminosas, que possuem a capacidade de viver em simbiose com rizóbios. Essa técnica tem por objetivo auxiliar eficientemente o aumento das quantidades de N no sistema, ou até mesmo reduzir a fertilização nitrogenada, como demonstrado por Santos et al. (2016), usando milho e feijão-caupi. Com o consórcio supracitado além da obtenção de uma maior fixação de N<sub>2</sub> pela leguminosa ainda oferece vantagens como, por exemplo, um aumento de matéria seca, quando se comparado ao cultivo individual para cada espécie, e uso eficiente tanto da água quanto do solo (KLUTHCOUSKI; STONE,2003).

É importante ressaltar o interesse na utilização de gramíneas para o processo de FBN, que envolve principalmente sua grande facilidade em aproveitar a água quando comparado a uma leguminosa, sobretudo também pelo seu potencial fotossintético e a arquitetura de suas raízes. Estas plantas apresentam um sistema radicular do tipo fasciculada, o que lhe confere vantagens na hora da extração de água e nutrientes do solo em relação às leguminosas, que possuem sistema pivotante. Diante disso, ainda que se somente uma parte do nitrogênio fosse cedido pela associação com as bactérias fixadoras, existiria ainda uma economia consideravelmente igual ou ainda superior à observada com leguminosas que venham a ser autônomas em nitrogênio (DÖBEREINER, 1992).

Ainda sobre o solo, quando utiliza-se consórcios como forma de cultivo, a macroporosidade assim como a porosidade total são aumentadas de acordo com Chioderoli et al. (2012), que demonstraram como as forrageiras são relevantes para permeabilização do solo, agregação e estrutura, facilitando ainda o crescimento radicular e conseqüentemente permitindo que o perfil do solo seja mais explorado em suas camadas mais internas até atingir uma porção onde encontram-se os nutrientes e a água aumentando assim sua absorção.

Quando se trata de eficiência de fixação, existe uma gama de variantes a serem analisadas, pois existem a influência de vários fatores, devido a particularidade hospedeira. Para que haja seleção de novas estirpes eficientes, antes, devem-se obedecer várias etapas como por exemplo verificar a capacidade de nodular da espécie, seguir os critérios de isolamento bacteriológico, executar a purificação das colônias e testar em vasos com solo estéril e não estéril o potencial de eficiência (FARIA & FRANCO, 2002).

Na região Nordeste as pesquisas envolvendo eficiência simbiótica de rizóbios nativos em *Leucaena leucocephala* mostraram que os isolados nativos apresentaram eficiência simbiótica e melhor desempenho, variando de 92 a 105%. Calheiros et al. (2015) estudando espécies de calopogônio no Nordeste, relataram a melhor performance utilizando isolados nativos em comparação com as cepas recomendadas e os inoculantes comerciais, variando de 84 a 131%.

Estudando eficiência Simbiótica de *Erythrina velutina* Willd, Menezes et al. (2016), demonstraram o poder de metabolização e tolerância dos isolados ESA 70 e ESA 75, pois confirmaram grande versatilidade metabólica e capacidade de metabolização de inúmeras fontes de carbono, demonstrando grande tolerância *in vitro* a estresses bióticos, crescendo sob altas temperaturas (39°C) e sob altas concentrações de NaCl. Por fim foi constatado que os isolados produziram ácido indol-acético, peculiaridades que provavelmente influenciam de forma positiva seu desempenho competitivo e diazotrófico. Também na região de semiárido e zona da mata os estudos com diversidade rizobiana foram desenvolvidos por Santos et al. (2007), permitindo inferir que a caracterização dos isolados demonstraram que nos locais trabalhados, há uma alta diversidade de rizóbios com capacidade para nodular gêneros de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, em contrapartida na Zona da Mata ocorre baixa riqueza de rizóbios capazes de nodular *Arachis*, e ausência de rizóbios com capacidade de nodular *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, deixando evidente que a seleção de estirpes adaptadas, competitivas e aptas promovem uma alta FBN. Além dos estudos envolvendo diversidade da microbiota de solo, estudos de eficiência rizobiana em diversos cultivos vem sendo estudado.

Trabalhando com feijão-caupi Junior et al, 2010 estudando eficiência rizobiana para o processo de fixação de  $N_2$  testaram estirpe que apresentaram grande eficiência para FBN, produzindo biomassa que chegaram aos 90%, ou mais, da biomassa produzida utilizando tratamento com N mineral. Porém seus resultados foram para três cultivares de feijão-caupi, tendo em vista a variabilidade que existe no reino vegetal é necessária a continuidade dos estudos e experimentos que visem aprimorar e extrair as melhores performances para que, o uso no N mineral torne-se obsoleto em cultivos desta natureza.

A inoculação com rizóbios efetivos fixadores de  $N_2$  vem sendo uma opção altamente rentável, seja pelo ponto de vista econômico quanto ecológico, promovendo N para plantas e reduzindo ou substituindo seja total ou parcialmente o uso dos fertilizantes minerais (FARIAS et al.2016). Porém, a capacidade de nodular com uma extensa rede de rizóbios, características atribuídas as leguminosas tropicais, acabam complicando a incorporação de inoculantes ricos em rizóbios eficientes, visto que em termos de competição e adaptação as bactérias nativas saem na frente, afastando de maneira rápida as estirpes dos inoculantes dos locais de infecção (SANTOS et al., 2007).

De fato, existem várias incógnitas que permeiam os horizontes do processo de seleção e aplicação de estirpes eficientes e potencialmente competitivas, contudo os avanços são insistentemente alcançados ao longo dos estudos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Localização, coleta e caracterização do solo

O solo a ser utilizado foi coletado na camada superficial (0-20 cm) de um Planossolo, localizado na cidade de Belo Jardim, Vale do Ipojuca, Agreste de Pernambuco no campus do IFPE (Instituto Federal de Pernambuco) 1 (08° 31' 99" S e 36° 41' 66" O, a 607 m de altitude) (Figura 1). Inserida do polígono das secas, porém próximo ao litoral, o que confere uma região com maiores índices pluviométricos. A classificação do clima da região é Aw, segundo Köppen-Geiger. Apresenta temperatura média anual de 22°C, o mês mais quente do ano é janeiro com temperatura média de 23.9 °C e julho tem a temperatura média mais baixa, 19.3 °C. A pluviosidade média anual é de 660 mm, outubro é o mês mais seco com precipitações médias de 12 mm e março o de maior precipitação, com média de 123 mm. (CLIMATE, 2018).

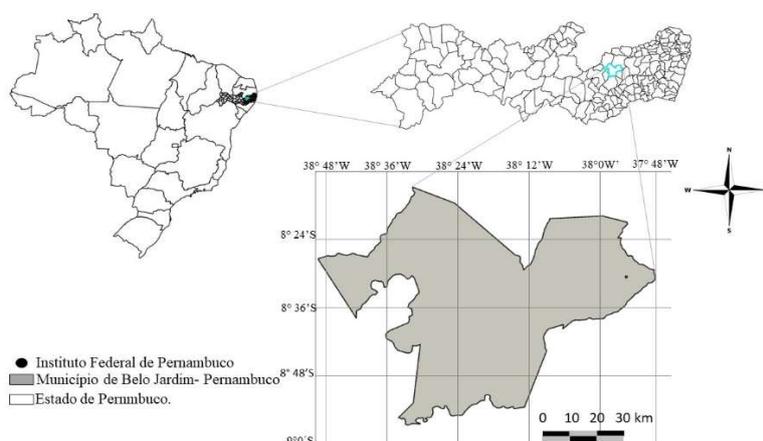


Figura 1: Local de coleta. Fonte: adaptado de Silva, 2018.

### 3.2 Isolamento bacteriano e caracterização de isolados de rizóbios

Foi conduzido um experimento em casa de vegetação utilizando amostras da camada superficial de um Planossolo coletado no município de Belo Jardim, Semiárido de Pernambuco, com as leguminosas, feijão-caupi (*V. unguiculata* L. Walp) e feijão-deporco (*C. ensiformis*), solteiras ou em consórcio com as gramíneas milho, (*Z. mays* L.); sorgo, (*S. bicolor* (L.) Moench.; e milheto, (*P. glaucum* (L.) R. Br)).

Aos 50 dias após o plantio, as plantas foram colhidas e os nódulos destacados e colocados em recipientes contendo sílica gel, para posterior isolamento. O isolamento das bactérias foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo na Universidade Federal Rural de Pernambuco(UFRPE). No isolamento, os nódulos foram previamente hidratados e desinfestados superficialmente com uma solução de álcool etílico a 70% por 1 minuto, quebrando a tensão superficial, e com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% por 5 minutos, em seguida, foram lavados por 10 vezes com água estéril retirando o excesso de hipoclorito. Cada nódulo foi levemente pressionado com uma pinça e a suspensão que fica sobre a pinça foi riscada sobre uma placa de Petri contendo meio YMA (extrato de levedura, manitol e ágar) contendo o corante vermelho do Congo.

As placas foram levadas para estufa bacteriológica BOD regulada a 28°C, por um período de uma a duas semanas até o aparecimento das colônias. As colônias isentas de contaminantes foram repicadas para placas de Petri contendo meio YMA (extrato de levedura, manitol e ágar) dessa vez com o corante azul de bromotimol e caracterizadas conforme descrito por Fred, Waksman., (1928) como demonstrado na figura 2.



Figura 2. Processo de isolamento bacteriológico

Em seguida foi feita a caracterização fenotípica dos isolados adaptada de Vicent., (1970) (Apêndice A), observando nos isolados as características das colônias: 1) tempo necessário em dias para o aparecimento de uma colônia, sendo considerado R: Crescimento rápido 3 dias, I: Intermediário de 3-5 dias e L:Lento 5-10 dias ; 2) pH do meio após o crescimento celular (determinado pela coloração do meio de cultura contendo azul de bromotimol, os isolados acidificantes tornam o meio amarelo e os alcalinizantes tornam o meio verde azulado e os neutros não modificam a coloração do meio de cultura.); 3) tamanho da colônia em mm, onde  $\leq 2$ mm considerou-se puntiforme,  $>2$ mm Não puntiforme; 4) forma (circular ou irregular da colônia ); 5) borda da colônia (regular ou irregular); 6) aparência da colônia (homogênea ou heterogênea); 7) transparência da colônia; 8) cor da colônia (branca, amarela, creme, rósea); 9) elevação da colônia) e características do muco produzido pelas células ;10)Presença ou ausência de muco; 11)quantidade de muco (pouco, médio, muito e sem); 12) tipo de muco (Viscoso, Butílico, floculoso); 13) aspecto (brilhante, úmida, seca e sem brilho). Após a caracterização, as colônias isoladas foram purificadas, repicadas em tubos de ensaio contendo meio YMA e devidamente identificadas. Feito isto, os dados foram codificados em um sistema binário e agrupados através do programa Past2.17c, utilizando o algoritmo *UPGMA* e a matriz de similaridade *Jaccard*. (Hammer et al., 2001).

Um dendrograma foi gerado com a finalidade de separar os grupos dos isolados com maiores similaridades (Rohlf, 1994). Foram calculados os índices de diversidade dos isolados dentro de cada tratamento utilizando o mesmo software.

A diversidade de isolados foi avaliada através do Índice de Shannon-Wiener

(H)definido por:

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

Onde:  $p_i$  é a proporção de indivíduos do  $i^{\text{ésimo}}$  isolado em relação ao total de indivíduos, e  $S$  é o número total de isolados. O valor máximo de  $H$  ocorre quando o mesmo número de indivíduos ocorre para cada isolado e é definido em termos de abundância de isolados.

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

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

A dominância foi calculada através do Índice de Simpson (C) como:

$$C = 1 - \frac{\sum n_1(n_1 - 1)}{N(N - 1)}$$

, a riqueza pelo Índice de Margalef (DMg) e a distribuição dos indivíduos entre as espécies (equitabilidade) através do índice de Pielou (Kanieski et al., 2010).

### 3.3 Autenticação em condições estéreis

Foi conduzido um experimento em casa de vegetação na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, (Lat. 9°01'S e Long. 34°08'W) para autenticar os isolados ou comprovar a capacidade de formar nódulos em feijão-caupi. Figura 3. Os isolados foram autenticados, através de plantio seguido por inoculação em feijão-caupi, cultivar IPA 206, obedecendo um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e 72 tratamentos (Hungria, Araújo.,1994).



Figura 3.a) Processo de Inoculação em feijão-caupi, cultivar IPA 206; b) Plantação das sementes desinfestadas; c) Isolados.

O substrato usado foi composto por areia e vermiculita na proporção 2:1 foi preparado e esterilizado em autoclave a 120°C por 60 minutos. Foram utilizados para o plantio copos de 500 mL, com três repetições por isolado.

As sementes foram primeiramente desinfestadas imersas em álcool (70%, 3 min), seguindo de imersão em hipoclorito de sódio (5%, 5 min) e posteriormente lavadas em água destilada e autoclavada (10 vezes).

Foi realizado o plantio de três sementes por copo, após 8 dias efetuou-se o desbaste ficando uma planta por copo. O fornecimento de nutrientes foi realizado a cada 7 dias, com a aplicação de 50 ml de solução de Norris (1964) até quando completou 1 litro, e após esse período foi adicionada apenas água destilada. Na preparação do inóculo utilizou-se 100 mL do meio YM (extrato de levedure manitol) o qual foi colocado em erlenmeyer de 125 mL, posteriormente adicionou-se os isolados, sendo um em cada erlenmeyer em triplicata, sob agitação orbital a 150 rpm. Após o plantio foram aplicados 2 mL do inóculo por planta, após 35 dias, no período de floração da cultivar, as plantas foram colhidas e analisadas as raízes para a verificação da existência de nódulos. Após a confirmação os nódulos foram coletados e posteriormente obteve-se a massa seca dos nódulos. Na tabela 1, dois isolados testados foram escolhidos para serem usados como inoculantes em condições de campo.

Tabela 1. Isolados: B1T12 (Feijão-caupi em consórcio com milho), B1T17 (Feijão-caupi solteiro); número de nódulos e massa seca dos nódulos.

	ISOLADOS	Nº Nódulos	MSN(g)
B1-T16	Feijão de porco	5	0,0079
B3-T7	Sorgo/Feijão caupi	2	0,0129
B4-T12	Milheto-Feijão caupi	17	0,0144
B3-T11	Milheto-Feijão de Porco	16	0,022
B1-T17	Feijão caupi	16	0,0289
B3-T12	Milheto-Feijão caupi	11	0,0326
B2-T7	Sorgo-Feijão caupi	14	0,0398
B1-T11B	Milheto Feijão de Porco	28	0,0405
B1-T12	Milheto- Feijão caupi	31	0,0585
B4-T6	Sorgo- Feijão de Porco	38	0,0587
B3-T6	Sorgo- Feijão de Porco	2	0,0664

Nº: Número, MSN: Massa seca dos nódulos

### 3.4 Experimento de campo

O experimento foi conduzido na Estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim PE(EAIP), (Lat. de 8° 5' 18,87" S, Longi. 39° 34' 23,70" O).

Antes da instalação dos experimentos, uma amostra composta de 10 amostras simples foram coletadas na camada de 0 a 20 cm de profundidade e analisada seguindo a metodologia recomendada pela Embrapa (2009).

As amostras foram utilizadas para determinação das características físicas e químicas do solo conforme Tabela 2. O solo coletado foi destorroado, homogeneizado e passado em peneira com malha de abertura de 2 mm. Quimicamente o solo foi caracterizado pelo pH (H<sub>2</sub>O), P, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, (H+Al), Fe, Cu, Zn e Mn. Os cátions Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Al<sup>3+</sup> foram extraídos por KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, sendo o Ca<sup>2+</sup> e o Mg<sup>2+</sup> dosados por espectrofotometria de absorção atômica e o Al<sup>3+</sup> por titulometria; o Fe, Cu, Zn, Mn e ainda P, K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> extraídos por Mehlich-1, sendo o P dosado por colorimetria, o K<sup>+</sup> e o Na<sup>+</sup> por fotometria de emissão de chama e os demais por espectrofotometria de absorção atômica; a acidez potencial (H+Al) extraída por acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup> e dosada por titulometria. Foram calculadas as somas de bases (SB) e CTC efetiva (t), todas conforme EMBRAPA (2009). As proporções de areia, silte e argila foram determinadas de acordo com metodologia descrita pela EMBRAPA (1997). Diante disso para o experimento foram utilizados cinco tratamentos e quatro repetições, destes, dois eram inoculantes, dois oriundos de isolados autenticados de nódulos com maior massa seca (B1T12: Milheto/Feijão-caupi; B1T17: Feijão caupi solteiro) com capacidade comprovada em nodular a leguminosa feijão-caupi, uma adubação nitrogenada equivalente a 100 kg ha<sup>-1</sup> de N, na forma de sulfato de amônio, um tratamento com a estirpe recomendada para feijão caupi (BR3267) e um tratamento sem inoculante (Controle), obedecendo um delineamento em blocos ao acaso. Os três inoculantes foram dissolvidos em 32L de água, sendo utilizado 50ml juntamente com quatro sementes por cova.

Tabela 2. Características químicas e granulometria do solo referente a estação de Agricultura Irrigada de Parnamirim PE (EAIP) Sertão de Pernambuco.

<b>Atributos</b>	<b>Valor</b>
pH (em água 1:2,5)	5,99
P (mg.dm <sup>-3</sup> )	184
Ca (cmolc.dm <sup>-3</sup> )	13,984
Mg (cmolc.dm <sup>-3</sup> )	9,74
K (cmolc.dm <sup>-3</sup> )	0,608
Na (cmolc.dm <sup>-3</sup> )	0,498
SB (cmolc.dm <sup>-3</sup> )	24,831
H+Al (cmolc.dm <sup>-3</sup> )	0,95
Al (cmolc.dm <sup>-3</sup> )	0
Areia (g.k <sup>-1</sup> )	62,6
Argila (g.k <sup>-1</sup> )	9,9
Silte (g.k <sup>-1</sup> )	27,5
Textura	Franco Arenosa

O sulfato de amônio foi colocado por cima da cova em 0,5g por cova. Foi utilizada a cultivar sempre verde, por ser a mais utilizada pelos agricultores locais. Colocou-se 4 sementes por cova, com espaçamento de 0,5 x 0,5m. A irrigação foi realizada por gotejamento duas vezes por semana, além disso, a água foi analisada e classificada como C3S1, como demonstrado na tabela. Após o período determinado para o experimento (90 dias) as plantas foram coletadas para avaliação da biomassa seca da parte aérea e produtividade de grãos.

Para avaliar a eficiência fixadora de N<sub>2</sub> em condições de campo, foram avaliados a produção de massa seca da parte aérea para a realização do cálculo da eficiência dos isolados, em relação a produção de matéria seca do controle sem inoculação com N-fertilizante, de acordo com a fórmula sugerida por Date et al, 1993:

$$\text{Eficiência} = \frac{100 \times \text{o acúmulo da matéria seca das plantas inoculadas}}{\text{acúmulo de matéria seca do controle com N- fertilizante}}$$

Foram considerados como ineficientes os isolados que apresentaram menos de 50% de produção de matéria seca em relação ao controle, pouco eficientes os que apresentaram de 50 a 80%, eficientes os que apresentaram de 80 a 100%.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa computacional Graphpad prism, versão 6.0, as variáveis foram submetidas à análise de variância pelo Teste F e para aquelas em que o F foi significativo, houve a comparação entre as médias pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.1 Características fenotípicas dos isolados.**

Na Figura 4, pode-se observar alguns aspectos do crescimento bacteriano em meio de cultura. O processo de isolamento proporcionou um total de 82 isolados como demonstrado na tabela 3.

Todos os isolados apresentaram crescimento rápido (100%) no período de até três dias, sessenta e sete isolados (81,7%) apresentaram forma circular e quinze (18,3%) forma não circular, com cinquenta e cinco isolados (67%) apresentando borda regular e vinte e sete (33%) com borda irregular. Grande parte das colônias foram homogêneas com setenta e três isolados (89%) e nove heterogênea (11%). Quanto ao tamanho ( $\leq 2\text{mm}$ ) sessenta e seis (80,4%) apresentaram característica puntiforme e dezesseis (19,5%) não puntiforme. Analisando o meio de cultura apenas 3 isolados (3,7%) não modificaram a cor do meio de cultura e nenhuma placa alcalinizou, todas as demais placas acidificaram o meio (96,3%). No tocante a coloração predominou as cores creme com 53 isolados (63,4%) e amarelo com vinte e sete (32,9%) respectivamente. Para a elevação setenta isolados foram contabilizados (85,3%), já para transparência apenas sete (8,5%). Das placas que apresentaram muco (85,3%), setenta e seis (92,6%) demonstraram tipo viscoso e sessenta e nove (84%) aspecto brilhante, oito com aspecto seco (9,7%) e cinco (6%) aspecto sem brilho.

De acordo com Norris (1965), estirpes que apresentam crescimento rápido são nativas de regiões temperadas, Xavier et al. (1998); Freitas et al. (2007); Santos et al.(2007) e Medeiros et al. (2009) alegam que em regiões semiáridas os rizóbios de crescimento rápido são mais frequentes, de forma que essa característica estariam fortemente relacionadas a estratégias de sobrevivência e adaptação tendo em vista o ambiente seco, vale salientar que bactérias de crescimento rápido tem capacidade de induzir a nodulação em caupi (MEDEIROS et al. 2009), conhecida por ser uma planta expressivamente promíscua ou de ampla faixa hospedeira .

Resultados estes semelhantes aos de Cassetari, (2010) que analisou a diversidade de bactérias que nodulam leguminosas, encontrando 90% de isolados de crescimento rápido e 82% de acidez. com o aparecimento de colônias amareladas, a coloração desenvolvida pelas colônias de rizóbios variam e podem apresentar cores como branco, amarelo e rósea (JORDAN, 1984). Santos et al. (2016) também demonstra esse achado ao avaliar bactérias de nódulos de Feijão - Caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) nativos de solo sob floresta atlântica, onde as colônias de modo geral apresentaram coloração amarelada.

Segundo Campelo, (1976) estirpes que crescem rapidamente, fabricam, no geral, mais muco se comparado às de crescimento lento. De acordo com Xavier et al. (1998) 2 tipos de mucos foram definidos: Um tipo que se adere ao meio de cultura, denominado de viscoso e classificado como tipo 1, geralmente associado a colônias planas, e aqueles que não se aderem e formam colônias bem definidas e elevadas, chamada de butírico e classificada como tipo II. Os isolados obtidos desenvolveram muco para ambos os tipos, no geral. O tipo mais comum foi o tipo I, produzidos por isolados que formaram colônias entre 1 e 3 dias com elevação presente, os isolados do tipo II apresentaram colônias sem elevação corroborando para os dois tipos com os trabalhos de Santos et al. (2007), porém não acorda com a definição para este tipo de muco (Xavier et al.,1998).

Tabela 3. Caracterização fenotípica dos isolados de nódulos oriundos de raízes de leguminosas solteiras e em consórcio com gramíneas de um planossolo.

Características		%
Tempo ( dias)	Cresci. rápido até 3 dias	100
Forma	Circular/N circular	81,7
Borda	Regular/Irregu	67
Aparência da colônia	Homogênea/ Hetero	89
Tamanho	Puntif, ( $\leq 2\text{mm}$ ); N punt	80,4
pH	Acidificaram / Neutro	96,3
Transparência	Presença/ Ausência	8,5
Cor	Creme, Amarela	63,4
Elevação	Com elevaç/ Sem elevação	85,3
Muco	Presença/ Ausência	85,3
Tipo de muco	Viscoso / Butílico	92,6
Aspecto	Brilhante/Sem brilho	84,1



Figura 4. Isolados com alteração de pH em processo de fabricação de muco.

#### 4.2 Agrupamentos dos isolados

Os resultados observados após o processo de caracterização fenotípica permitiram agrupar os isolados em um dendrograma (Figura 5) de quarenta e cinco grupos com 100% de similaridade.

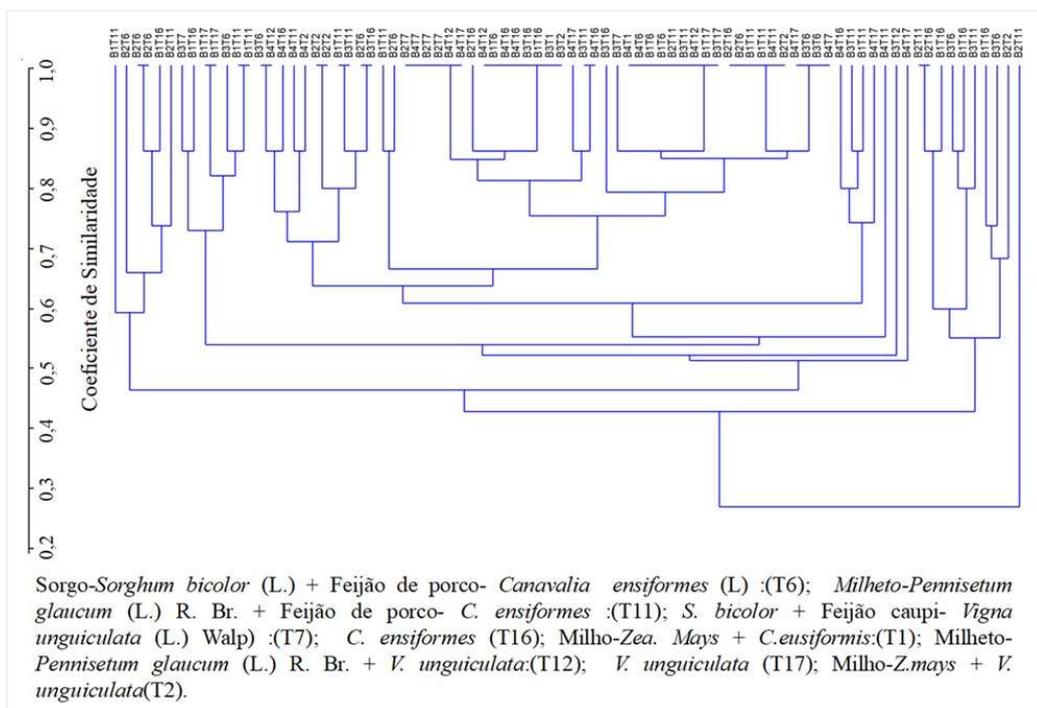
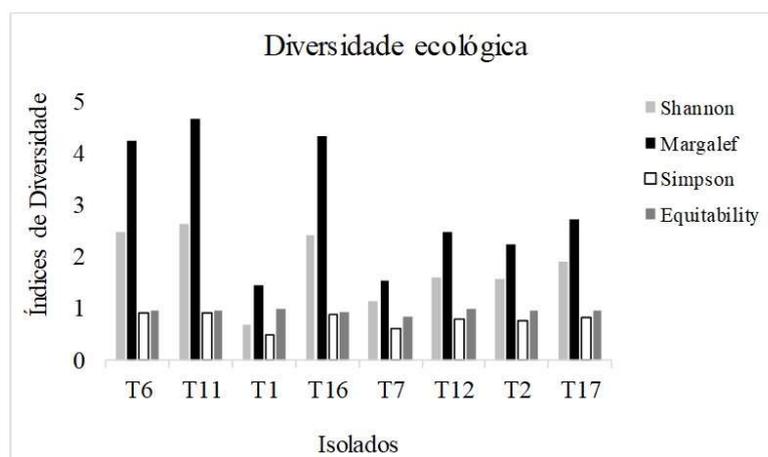


Figura 5. Dendrograma UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard de 82 isolados e 45 grupos com 8 representantes e similaridade de 100% após o processo de caracterização fenotípica.

Em uma comunidade ocorrem a combinação de dois atributos: a equabilidade e a riqueza de espécies (encontrada também como equitabilidade)(HURLBERT,1971;PEET, 1974). Grande parte dos índices de diversidade são considerados dados não-paramétricos pelo fato de independem de parâmetros de uma distribuição normal. Tais índices são utilizados há muito tempo por ecólogos distinguindo comunidades e sua estrutura matemática (Danilov & Ekelund 2000), são muito utilizados pela facilidade de interpretação e alta correlação em situações que envolvam riqueza e equitabilidade (Wilsey et al. 2005). Os índices de diversidade de Shannon - Weaver (H"), Riqueza de Margalef, Equitabilidade de Pielou(J) e Dominância de Simpson (Figura 6) no presente estudo foi verificado para todos os isolados pouca dominância e baixa uniformidade.

O índice de Simpson que leva em consideração a dominância mostrou -se reduzida para todos os tratamentos, (URAMOTO, 2005), semelhantes aos achados de Santos et al. (2007) em zona da mata obtendo maior riqueza e menor dominância de grupos morfológicos de rizóbios. O isolado T1 e T7 foram os que apresentaram os menores índices de diversidade ecológica, os isolados T6, T11, T16, T12, T2 e T17 apresentaram alta diversidade e riqueza. isolados oriundos de consórcios não afetaram

A diversidade foi alta se comparada aos trabalhos conduzidos em Pernambuco na zona da mata (Calheiros. 2012; Santos et al.2017). Ou seja, houve uma variação quanto a riqueza de espécies para todos os isolados.



T6(Sorgo+Feijão de Porco),T11 (Milheto+Feijão de Porco),T1( Milho+Feijão de Porco), T16 (Feijão de Porco),T7 (Sorgo +Feijão Caupi),T12 (Milheto+Feijão Caupi),T2(Milho+Feijão Caupi), T17(Feijão Caupi).

Figura 6. Índices de diversidade dos isolados.

A região do semiárido é dotada de características bem particulares, pois na maior parte do ano toda sua biodiversidade encontra-se sob estresse permanente, onde os mais comuns são os fatores abióticos como altas temperaturas e estiagens longas e severas.

Tais processos podem afetar a sobrevivência assim como a eficiência dos rizóbios, contudo as populações de rizóbios podem adaptar-se a tais condições, o que em partes explicaria a alta diversidade observada assim como um solo que se tornou estável ao longo do tempo e tolerante ao estresse.

Desta forma é possível que a probabilidade de os indivíduos não pertencerem a mesma espécie seja alta. Levando em consideração que os resultados para o isolado T17 foram positivos com relação a riqueza de espécies, esse comportamento para a leguminosa em questão foi observado nos trabalhos de Leite. (2015) onde diversos gêneros isolados de nódulos de feijão-caupi foram identificados, vários dos gêneros isolados dos nódulos de leguminosas nativas encontrados por De Meyer et al. (2015) foram identificados em amostras nos nódulos de caupi.

#### **4.3 Avaliação da eficiência fixadora**

A avaliação da eficiência média no processo de fixação de N<sub>2</sub> constatou que nenhum dos tratamentos foi considerado ineficiente, O isolado B1T12 apresentou eficiência de 100% em relação ao controle e a estirpe recomendada BR3267 mostrou-se eficiente com 83,18%. (Figura 7). Já o tratamento B1T17 apresentou um percentual de eficiência de 63,03% , valor esse semelhante ao controle sem inoculação.

Apesar do feijão caupi apresentar uma ampla faixa hospedeira quanto ao processo de nodulação com FBN, a condição de adaptação, à sazonalidade do semiárido e relação de alta competitividade de bactérias nativas pode estar diretamente relacionado a uma menor eficiência por parte de estirpes não nativas. Já o isolado T12, levando em consideração a premissa supracitada pode ser um competidor em potencial com bactérias nativas do semiárido.

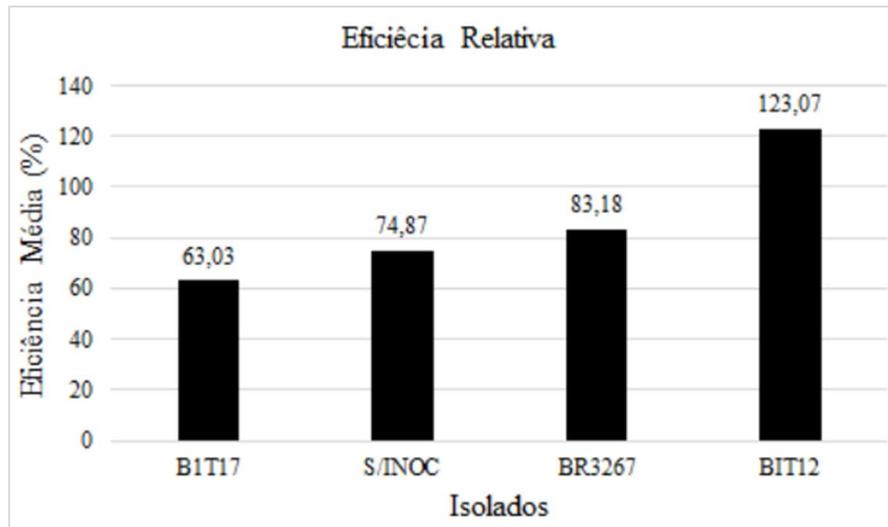


Figura 7. Avaliação da eficiência média no processo de fixação de nitrogênio em função dos isolados consorciados e solteiros. B1T17- Isolado de feijão-caupi; S/INOC- Tratamento sem inoculante; BR3267- Estirpe Recomendada para feijão-caupi; B1T12- Isolado de Milheto em consórcio com feijão-caupi.

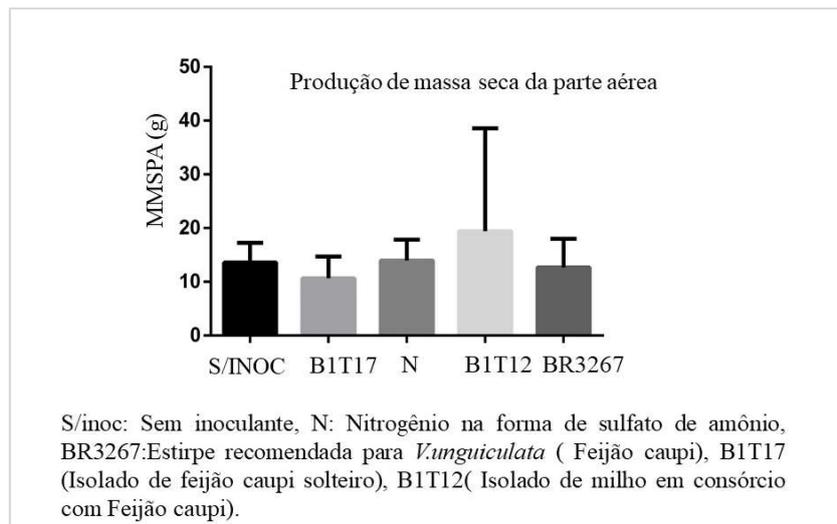


Figura 8. Média da massa seca da parte aérea, submetidos ANOVA e teste de Tukey a 95% de confiança não diferindo estatisticamente entre si.

Para os dados de massa seca da parte aérea (MSPA) não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 8), embora o isolado B1T12 apresente uma média maior. A quantidade acumulada de MSPA, é um indicativo de interação simbiótica entre a planta e os microrganismos nativos, propondo a necessidade de mais estudos de campo, com o objetivo de selecionar bactérias mais eficientes e competitivas. (XAVIER et al., 2006; SOUZA et al., 2008; ANTUNES et al., 2011). Com relação aos dados de produção de massa seca da raiz (MMSR) houve diferença estatística entre o tratamento B1T17 e o tratamento com N (Figura 9). Levando em consideração as mudanças bruscas que o

semiárido está submetido constantemente e as próprias mudanças locais dos organismos nativos do solo frente a tais alterações, algumas plantas de feijão caupi apresentaram raízes bem desenvolvidas e uma parte aérea desproporcional, sendo assim o sistema radicular se encontra em constante mudança alterando o ciclo vegetativo enriquecendo o solo com uma gama de compostos orgânicos que alteram fatores de grande relevância como pH (PEREIRA et al. 2000). Sendo assim o investimento nutricional que proporcionou momentaneamente a planta foi investir em sistema radicular, tendo em vista a chegada do período de chuvas e dias de grandes índices pluviométricos no final da experimentação.

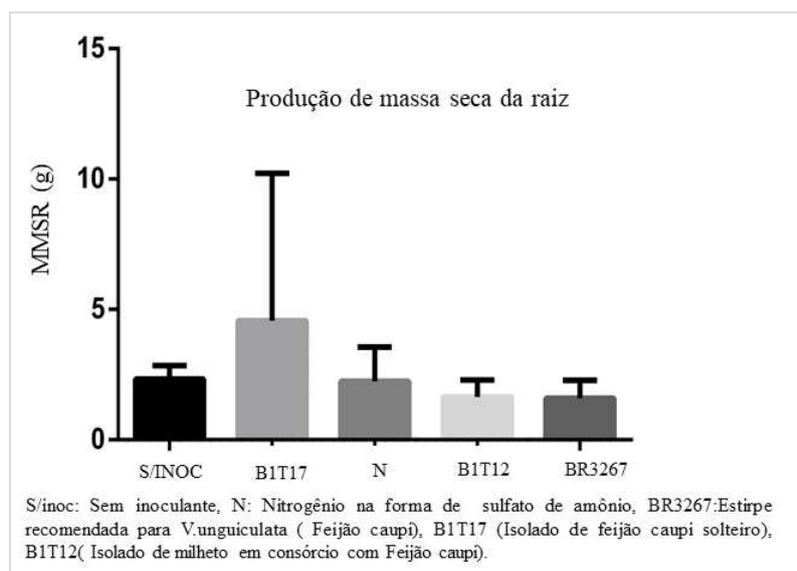
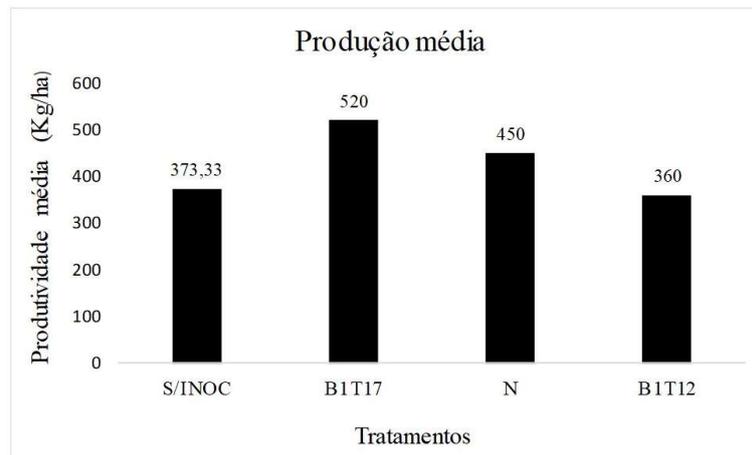


Figura 9. Média da massa seca da raiz, submetidos ANOVA e teste de Tukey a 95% de confiança diferindo estatisticamente entre si.

Para a produtividade média (Figura 10) o tratamento B1T17 seguido do tratamento N obtiveram as duas melhores médias em relação ao tratamento S/INOC com cerca de  $520 \text{ kg ha}^{-1}$  e  $450 \text{ kg ha}^{-1}$  modo consecutivo. Já o tratamento B1T12 apresentou valores próximos ao do tratamento S/INOC com  $360 \text{ ha}^{-1}$ , o que pode sugerir um ambiente com microrganismo altamente competitivos e adaptados.

A estirpe recomendada BR3267 apesar de demonstrar-se eficiente e resultar em maior biomassa se comparado com os isolados provenientes do feijão caupi solteiro, não foi capaz de gerar uma produtividade.

Comportamento relativamente semelhante ao que ocorreu com a estirpe BR3267 nos estudos de Vieira et al. (2010), onde a estirpe promoveu a maior nodulação média entre as cultivares estudadas, porém não apresentou a maior produtividade. Sendo assim o tratamento com a estirpe BR3267 demonstra ser um inoculante de grande relevância e alto potencial para feijão-caupi pela boa performance quanto ao processo de eficiência (ZILLI et al.2006).



Co : Controle sem inoculante, 100 kg/ha-1 de N: na forma de sulfato de amônio ;  
FCS: Feijão caupi solteiro; BR3267: Estirpe recomendada.

Figura 10. Produtividade média em quilogramas por hectare em função dos tratamentos.

#### 4. CONCLUSÃO

Isolados de leguminosas solteiras promoveram alta diversidade e riqueza, sem ocorrência de dominância e uniformidade para todos os demais isolados

Os isolados provenientes do consórcio B1T12 proporcionaram maior média de massa seca da parte aérea, o tratamento com isolados de B1T17 produziu tanto quanto as bactérias locais (S/INOC). A eficiência média de B1T12 foi a média mais alta, superando B1T17, demonstrando que o consórcio não afetou a eficiência. A produtividade média obtida com o tratamento B1T17 foi a maior, enquanto que o tratamento B1T12 ficou com a menor média, estando ainda sim acima da média nacional.

De uma maneira geral as produtividades de grãos foram baixas para cultivo irrigado, entretanto, como o período seco foi muito prolongado em 2019 e a qualidade da água ficou bastante comprometida. Entretanto, essa é a realidade do agricultor do sertão, quando tem acesso a água.

A utilização da semente local “sempre verde” utilizada pelo agricultor local, mesmo com o mínimo de irrigação e água com alto nível salinidade, foi obtido uma boa produtividade servindo como banco de germoplasma de rizóbios nativos para o feijão caupi de Parnamirim.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, Elaine Martins da et al. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013.

DA SILVA, Vinicius Santos Gomes et al. Symbiotic efficiency of native rhizobia in legume tree '*Leucaena leucocephala*' derived from several soil classes of Brazilian Northeast region. **Australian Journal of Crop Science**, v. 12, n. 3, p. 478, 2018.

DE ARAÚJO, Clicyane Lima; GUALTER, Régia Maria Reis. Caracterização morfofisiológica de bactérias nativas de solos do Cerrado isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Biotemas**, v. 30, n. 1, p. 25-35, 2017.

DE FREITAS, Ana Dolores Santiago et al. Nitrogen isotopic patterns in tropical forests along a rainfall gradient in Northeast Brazil. **Plant and soil**, v. 391, n. 1-2, p. 109-122, 2015.

DE FREITAS, Santiago et al. Systems of land use affecting nodulation and growth of tree legumes in different soils of the Brazilian semiarid area. 2016.

DE MEYER, Sofie E. et al. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p. 1-11, 2015.

FAGAN, Evandro Binotto et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja-Revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, 2007.

FARIA, SM de; FRANCO, A. A. Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas. **Embrapa Agrobiologia. Documentos**, 2002.

FRED, Edwin Broun et al. Laboratory manual of general microbiology. 1928.

FREITAS, Ana Dolores Santiago de et al. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino no Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.

GULERIA, G. e KUMAR, N. (2016). Sowing methods and different rates of cowpea seeds on the sorghum production potential, hybrid of Sudan grass and cowpea: A review. **Agricultural Reviews**, 37, 290-299.

HAMMER, Oyvind et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HUNGRIA, Marianagela; ARAUJO, Ricardo S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-Serviço de Produção e Informação, 1994.

HURLBERT, Stuart H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology**, v. 52, n. 4, p. 577-586, 1971.

KANIESKI, M. R.; ARAUJO, A. C. B.; LONGHI, S. J. Quantificação da diversidade em Floresta Ombrófila Mista por meio de diferentes Índices Alfa. **Scientia Forestalis**, v. 38, n. 88, p. 567-577, 2010.

LEITE, Jakson et al. Simbiose feijão-caupi e rizóbio: diversidade de bactérias associadas aos nódulos. 2015.

MARRA, L. M. **Solubilização de fosfato por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas**. 142f. 2012. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Ciência do solo). Universidade Federal de Lavras, Lavras–MG.

MEDEIROS, Erika Valente de et al. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.

MEDEIROS, Erika Valente de et al. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.

NGUYEN, Victoria Q. Symbiosis between *Chamaecrista fasciculata* and nitrogen-fixing bacteria: a review. 2019.

NORRIS, D. O.; MANNETJE, L.'t. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 29, n. 3, p. 214-235, 1964.

PEET, Robert K. The measurement of species diversity. **Annual review of ecology and systematics**, v. 5, n. 1, p. 285-307, 1974.

PIMENTEL, Márcio Sampaio et al. Atributos químicos do solo utilizando composto orgânico em consórcio de alface-cenoura. **Embrapa Agrobiologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.

ROHLF, F. J. Numeric taxonomy and multivariate analysis system. **NTSYS-pc**, 1993.

SANTOS, Carolina ERS et al. Faixa hospedeira de rizóbios isolados das espécies *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*. **Embrapa Agrobiologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2007.

DA SILVA, A. F. et al. Diversidade genética de rizóbios de feijão-caupi em Luvisolos do Sertão pernambucano. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA DE INTEGRAÇÃO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 3., 2018, Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2018., 2018.

SPRENT, Janet I.; ARDLEY, Julie; JAMES, Euan K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New Phytologist**, v. 215, n. 1, p. 40-56, 2017.

VESSEY, J. Kevin. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VINCENT, James Matthew et al. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.**, 1970.

XAVIER, G. R. et al. 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. et al. 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, Gustavo Ribeiro et al. Agronomic effectiveness of rhizobia strains on cowpea in two consecutive years. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 9, p. 1154, 2017.

YUAN, Zi-Qiang et al. Effects of legume species introduction on vegetation and soil nutrient development on abandoned croplands in a semi-arid environment on the Loess Plateau, China. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 692-700, 2016.

## APÊNDICE

### A. Isolados de leguminosas solteiras e consorciadas com gramíneas.

Isolados	TC	FO	BO	AP	TC	pH	EL	TR	CR	M	QM	TP	AS
1 B2T6	R	Ci	Re	Ho	>2	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Br
2 B2T11	R	Nc	Ir	Ho	<2	Ac	A	A	Cr	P	Po	Vi	S
3 B3T7	R	Ci	Re	He	>2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
4 B2T7	R	Ci	Re	He	<2	Ac	A	A	Cr	P	Po	Vi	Br
5 B2T7	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Am	P	Po	Vi	Br
6 B2T16	R	Ci	Re	He	<2	Ac	A	A	Am	A	Se	Vi	S
7 B3T7	R	Ci	Ir	He	>2	Ac	P	A	Cr	P	M	Vi	Br
8 B2T16	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Br
9 B2T11	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
10 B2T6	R	Ci	Ir	Ho	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
11 B3T2	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Br
12 B2T11	R	Ci	Ir	Ho	<2	Ne	A	A	Br	A	Se	Vi	S
13 B1T17	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
14 B4T12	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Am	P	Po	Vi	Br
15 B3T6	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	M	Vi	Br
16 B2T6	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Br
17 B3T16	R	Ci	Ir	Ho	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
18 B3T1	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Br
19 B3T16	R	Ci	Re	Ho	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
20 B4T7	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	M	Vi	Br
21 B4T16	R	Ci	Re	He	>2	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Br
22 B4T6	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
23 B4T2	R	Nc	Ir	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
24 B1T6	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Br
25 B1T6	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
26 B1T6	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
27 B1T11	R	Nc	Ir	He	<2	Ac	A	A	Cr	A	Se	Vi	S
28 B3T6	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	M	Vi	Br
29 B4T1	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
30 B4T12	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Br
31 B4T17	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Am	P	Po	Vi	Br
32 B4T17	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	M	Vi	Br
33 B1T11	R	Ci	Ir	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
34 B3T11	R	Ci	Re	He	>2	Ac	P	A	Cr	A	Se	Bu	Br
35 B2T2	R	Ci	Re	He	<2	Ac	A	P	Br	A	Se	Bu	Sb
36 B3T17	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Br
37 B1T11	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Br
38 B4T16	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Br
39 B1T11	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Br
40 B4T16	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Am	P	Me	Vi	Br
41 B4T11	R	Ci	Re	He	<2	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Br

42	B3T11	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Er
43	B4T17	R	Ci	Ra	Ho	<	Ac	P	A	Am	P	Me	Vi	Er
44	B3T6	R	Ci	Ra	He	>	Ac	P	A	Cr	A	Se	Vi	Er
45	B3T11	R	Ci	Ra	He	>	Ac	P	P	Cr	P	Me	Vi	Er
46	B3T12	R	Ci	Ir	He	<	Ne	P	A	Cr	A	Po	Vi	Er
47	B3T6	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	P	Cr	A	Se	Bu	S
48	B2T16	R	Ci	Ir	He	<	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Er
49	B4T7	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	A	Am	P	Po	Vi	Er
50	B3T16	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Er
51	B2T7	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	A	Am	P	Po	Vi	Er
52	BIT16	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	A	Cr	A	Se	Vi	Er
53	BIT16	R	Nc	Ir	He	>	Ac	P	A	Cr	P	M	Vi	Er
54	BIT16	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Er
55	BIT16	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	A	Am	A	Se	Vi	S
56	BIT16	R	Ci	Ra	He	<	Ac	A	P	Am	A	Se	Bu	S
57	B2T6	R	Ci	Ra	He	<	Ac	A	A	Cr	P	Po	Vi	Sb
58	B2T6	R	Nc	Ir	He	<	Ac	A	A	Cr	P	Po	Vi	Sb
59	B2T6	R	Nc	Ir	He	<	Ac	A	A	Cr	P	Po	Vi	Sb
60	BIT16	R	Nc	Ir	He	<	Ac	A	A	Cr	P	Po	Vi	Er
61	B3T11	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	A	Am	P	Me	Vi	Er
62	B3T11	R	Ci	Ir	He	<	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Er
63	B3T6	R	Nc	Ir	He	<	Ac	P	A	Am	P	Po	Vi	Er
64	B3T6	R	Nc	Ir	He	<	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Er
65	B2T2	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Er
66	B2T2	R	Ci	Ir	He	<	Ac	P	P	Cr	P	Po	Vi	Er
67	B2T2	R	Ci	Ir	He	<	Ac	P	P	Cr	P	Po	Vi	Er
68	B4T11	R	Ci	Ra	He	>	Ne	P	A	Bg	P	Po	Vi	Er
69	B4T11	R	Nc	Ir	He	>	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Er
70	BIT11	R	Ci	Ra	He	>	Ac	P	A	Am	P	M	Vi	Er
71	BIT11	R	Nc	Ir	He	>	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Er
72	BIT11	R	Nc	Ir	He	>	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Er
73	BIT11	R	Ci	Ra	He	>	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Er
74	B4T16	R	Ci	Ra	He	>	Ac	P	P	Cr	P	M	Vi	Er
75	B4T16	R	Ci	Ir	He	<	Ac	P	A	Am	P	Po	Vi	Er
76	B4T17	R	Ci	Ra	Ho	>	Ac	P	A	Cr	P	Me	Vi	Er
77	B4T17	R	Ci	Ir	Ho	<	Ac	P	A	Am	P	Po	Vi	Er
78	B4T12	R	Nc	Ir	He	<	Ac	P	A	Am	P	Po	Vi	Er
79	B4T12	R	Ci	Ra	He	<	Ac	P	A	Cr	P	Po	Vi	Er
80	BIT17	R	Nc	Ir	He	>	Ac	P	A	Cr	P	Me	Fl	Er
81	BIT17	R	Nc	Ir	He	>	Ac	P	A	Cr	P	Me	Fl	Er
82	B2T11	R	Ci	Ra	He	<	Ac	A	A	Am	A	Se	Vi	S

1)TC: tempo necessário em dias para o aparecimento de uma colônia, (R: Crescimento rápido até 3 dias, I: Intermediário de 3 à 5 dias e L:Lento até 5 dias) ; 2) FO: forma (Ci:circular, Nc: Não Circular); 3) BO: borda da colônia (Re:regular/Ir: irregular),4)AP: aparência da colônia (Ho:homogênea/ He:heterogênea),5)TC:Tamanho da colônia em mm, (<2mm considerou-se puntiforme, >2mm :Não puntiforme);6)pH do meio após o crescimento celular (Ac: Acidificou, Ne: Neutralizou, Al:alcalinizou.); 7) EL: elevação da colônia,(P: Presença, A: Ausência);8) TR: Transparência da Colônia,( P:Presença, A:Ausência.); 9)CR: cor da colônia (Br:Branca, Am: Amarela,Cr: Creme, R: Rósea,Bg: Bege); 10)M: Muco ( P:Presença/A: Ausência); 11)QM:quantidade de muco (Po:pouco,Mé: médico M:muito, Se: sem); 12)IP: tipo de muco (Vi:Viscoso, Bu:Butílico,Fl: floculoso); 13) AS:aspecto (Br:brilhante,Úm: úmida, S: seca , Sb: sem brilho)