



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL
(AGRONOMIA)



CARLOS HENRIQUE DE FARIAS TERTO

Nodulação de *Vigna unguiculata* (L.)Walp. (Fabaceae) inoculada com isolados obtidos de raízes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae) nativas de diferentes solos da Caatinga

Rio Largo - AL
2021

CARLOS HENRIQUE DE FARIAS TERTO

Nodulação de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae) inoculada com isolados obtidos de raízes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae) nativas de diferentes solos da Caatinga

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal (Agronomia) da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula do Nascimento Prata

Coorientadora: Profa. Dra. Flávia de Barros Prado Moura

Rio Largo - AL
2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Campus de Engenharias e Ciências Agrárias – CECA
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana
CRB - 1512

T332n Terto, Carlos Henrique de Farias.

Nodulação de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae) inoculada com isolados obtidos de raízes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae) nativas de diferentes solos da Caatinga. / Carlos Henrique de Farias Terto. – 2021.

31 f.: il.

Orientadora: Ana Paula do Nascimento Prata.

Coorientadora: Flávia de Barros Prado Moura

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2021.

Inclui Bibliografia

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Caatinga. 3. Rizóbio.

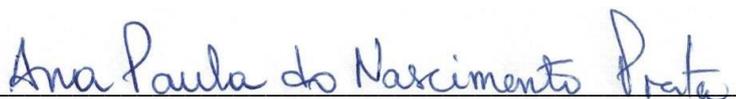
CDU:631.95

FOLHA DE APROVAÇÃO
CARLOS HENRIQUE DE FARIAS TERTO

Nodulação de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae) inoculada com isolados obtidos de raízes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae) nativas de diferentes solos da Caatinga

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Aprovada em 27 de Agosto de 2021



Prof^a. Dr^a. Ana Paula do Nascimento Prata – Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)

Banca Examinadora:



(Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida, UFAL) (Examinador Externo)



(Dr. Gilberto Costa Justino, ICBS, UFAL) (Examinador Interno)



(Dra. Maria Gabriela López, UNNE, Argentina) (Examinador Externo)

TERTO, CARLOS HENRIQUE, FARIAS. **Nodulação de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae) inoculada com isolados obtidos de raízes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae) nativas de diferentes solos da Caatinga.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Federal de Alagoas. Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Maceió, 2021. 32p.

RESUMO

A fixação biológica (FBN) é um processo de grande relevância para o desenvolvimento das plantas, sendo que de forma simbiótica torna-se um dos fenômenos naturais, biológico, sustentável e seguro para a planta. Contudo, é importante ressaltar que esta atividade tem grandes resultados quando a simbiose acontece com a família Fabaceae, tendo em vista que, são vegetais com um potencial simbiótico bem elevado quando nos referimos a sua relação com rizóbios. Pesquisas desenvolvidas com leguminosas e bactérias de solos da Caatinga torna-se um fator referencial para o melhor conhecimento e compreensão deste conteúdo que ainda é algo desconhecido, no que diz respeito à ecologia da Caatinga. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de nodulação de bactérias de solos da caatinga associadas aos nódulos de *Vigna unguiculata*. A pesquisa foi desenvolvida em duas etapas as quais foram nomeadas de experimento 1 (experimento de autenticação) e experimento 2 (experimento de eficiência em campo). As bactérias utilizadas foram obtidas anteriormente a esta pesquisa, e encontram-se depositadas na coleção de cultura de microrganismo do Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD-AL), localizado na Universidade Federal de Alagoas (UFAL-Campus Maceió). Os isolados foram submetidos à avaliação quanto a sua capacidade de formar simbiose com *Vigna unguiculata*, onde das 28 amostras da coleção utilizou-se 12 amostras. As bactérias foram selecionadas de acordo com suas características fenotípicas. As 12 amostras de bactérias foram oriundas de Pão de Açúcar, Traipu, Delmiro Gouveia e Olho D'Água do Casado. As sementes foram submetidas à desinfestação com álcool (70%) por um minuto, hipoclorito de sódio (2%) por três minutos e cinco lavagens sucessivas em água destilada estéril. Após este processo foi realizado o plantio tendo sido adicionado 100g de solo. O mesmo foi armazenado em vasos desinfestados com capacidade de 300 ml, onde foram adicionadas quatro sementes contendo areia autoclavada e vermiculita na proporção de 2:1. 45 dias após a emergência houve a coleta das plantas e na ocasião foi determinada a presença e ausência de nódulos e número de nódulos por plantas. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições. Houve uma variação significativa na nodulação de *Vigna unguiculata*, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Os solos de Pão de Açúcar e Olho D'Água do Casado proporcionaram maior nodulação comparada às bactérias oriundas de Delmiro Gouveia e Traipu. Para o experimento dois foram utilizadas sete amostras de bactérias. A escolha destas bactérias se deu após o resultado do experimento um, que permitiu detectar quais bactérias tiveram melhor desempenho. Sendo assim após os resultados do experimento um, foi possível utilizar as bactérias: uma de Pão de Açúcar, duas de Traipu, uma de Delmiro Gouveia, duas de Olho D'Água do Casado, um inoculante comercial BR3267 e um controle não inoculado. O experimento foi conduzido em uma área delimitada na própria Universidade Federal de Alagoas, UFAL- Campus Maceió. O delineamento adotado foi em blocos casualizados com treze parcelas e trezes repetições para cada inoculante. Após as avaliações citadas acima, a biomassa vegetal, raiz e nódulos, foram colocados para secar em estufa a 65°C por 72 horas para a obtenção da massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e massa seca dos nódulos (MSN). Após a coleta dos dados foi possível perceber que toda as bactérias nodularam, sendo as de pão de açúcar, Delmiro Gouveia e Olho D'Água do Casado tendo melhor desempenho, mesmo com a nodulação do controle.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, Caatinga, Rizóbio.

TERTO, CARLOS HENRIQUE, FARIAS. Nodulation of *Vigna unguiculata* (L.)Walp (Fabaceae) inoculated with isolates obtained from roots of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae) native to different soils of the Caatinga. Dissertation (Masters in Plant Production). Federal University of Alagoas. Engineering and Agricultural Sciences Campus. Maceió, 2021. 32p.

ABSTRACT

The biological fixation FBN is a process of great relevance for the development of plants, and symbiotic it becomes one of the natural, biological, sustainable and safe phenomena for the plant, however it is important to emphasize that this activity has great results when the symbiosis happens with the Fabaceae family, considering that they are plants with a very high symbiotic potential when we refer to their relationship with rhizobia. Research carried out with legumes and bacteria from caatinga soils becomes a reference factor for better knowledge and understanding of this content, which is still something unknown, in that it disrespects the ecology of the caatinga. This study aimed to evaluate the nodulation potential of bacteria from caatinga soils associated with *vigna unguiculata* nodules. The research was developed in two stages which were named experiment 1 (authentication experiment) and experiment 2 (field efficiency experiment). The bacteria used were obtained prior to this research, and are deposited in the microorganism culture collection of the Reference Center for Recovery of Degraded Areas CRAD-AL, located at the Federal University of Alagoas (UFAL-Campus Maceió). The isolates were evaluated for their ability to form symbiosis with *Vigna unguiculata*, where 12 samples were used from the 28 samples of the collection. Bacteria were selected according to their phenotypic characteristics. The 12 bacterial samples were from Pão de Açúcar, Traipu, Delmiro Gouveia, and Olho D'Água do Casado. The seeds were subjected to disinfestation with alcohol (70%) for one minute, sodium hypochlorite (2%) for three minutes and five successive washings in sterile distilled water. After this process, planting was carried out, with 100g of soil added. It was stored in disinfested vases with a capacity of 300 ml, where four seeds containing autoclaved sand and vermiculite in a 2:1 ratio were added. 45 days after emergence, plants were collected, at which time the presence and absence of nodules and number of nodules per plant was determined. The experimental design was in randomized blocks with four replications. There was a significant variation in the nodulation of *Vigna Unguiculata*, at the level of 5% probability by Tukey's test. The soils of Pão de Açúcar and Olho D'Água do Casado provided greater nodulation compared to bacteria from Delmiro Gouveia and Traipu. In experiment two, seven bacterial samples were used. The choice of these bacteria took place after the result of experiment one, which allowed us to detect which bacteria had the best performance. Thus, after the results of experiment one, it was possible to use the bacteria: one from Pão de Açúcar, two from Traipu, one from Delmiro Gouveia, two from Olho D'Água do Casado and a commercial inoculant BR3267 and a non-inoculated control. The experiment was conducted in a delimited area at the Federal University of Alagoas, UFAL-Campus Maceió. The design adopted was a randomized block with thirteen plots and thirteen repetitions for each inoculant. After the evaluations mentioned above, the plant biomass, root and nodules were placed to dry in an oven at 65°C for 72 hours to obtain the dry mass of the aerial part (MSPA), of the root (MSR) and dry mass of the nodules (MSN) . After collecting the data, it was possible to notice that all the bacteria nodulated, being the ones from Sugar Loaf, Delmiro Gouveia and Olho D Casa da Casa having better performance, even with the nodulation of the control.

Keywords: Biological nitrogen fixation, Caatinga, Rhizobia.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Cultura do Feijão–Caupi	9
2.2 Nutrição do Feijão-Caupi e simbiose com rizóbios	11
2.3 Eficiência simbiótica.....	13
2.4 Fixação biológica de Nitrogênio (FBN)	14
2.5 Características da microbiota do solo da Caatinga	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
Experimento 1: Autenticação dos isolados em <i>Vigna unguiculata</i> (L.)Walp.....	17
3.1 Caracterização da coleção dos isolados bacterianos	17
Experimento 2: Teste de eficiência nodulação natural a partir do feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.)	20
4 RESULTADOS	23
4.1 - Teste 1: Autenticações dos isolados em <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.....	23
4.2 - Teste 2: Teste de eficiência da nodulação natural a partir da planta isca.....	24
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
6. REFERÊNCIAS	28
7. APÊNDICE	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

O processo de simbiose se tornou um campo de estudos de grande relevância para a ciência, isso porque as atividades simbióticas realizadas por meios das relações ente dois microorganismos onde ambos serão beneficiados se tornou algo “indispensável” aos vegetais (GILLER, 1996; MIRANSARI, 2013).

No entanto, nem todos os vegetais realizam este processo com tanta facilidade ou eficácia ocasionando alguns fatores visíveis ao desenvolvimento dos vegetais, como coloração das folhas, produção da parte foliar, tamanho da raiz entre outros parâmetros que deveriam ter um bom desenvolvimento no vegetal, mas que devido a deficiência em realizar simbiose tem resultado na baixa quantidade de nitrogênio na planta afetando de forma direta em seu desenvolvimento (REIS; TEIXEIRA, 2005).

Contudo, sabe-se que entre os vegetais, as leguminosas têm um grande potencial em realizar o processo de simbiose com bactérias diazotróficas, bactérias que realizam processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Processo natural em que as bactérias fixam nitrogênio da atmosfera e que é crucial para o melhor desenvolvimento dessas leguminosas, tendo em vista que, é através deste processo que a planta consegue o nitrogênio necessário para seu desenvolvimento, pois o nitrogênio se torna um dos nutrientes de grande importância para o desenvolvimento vegetal, sendo ele de perfil “móvel” na planta buscando atingir as áreas mais novas que conseqüentemente demandam uma quantidade maior de nitrogênio (GILLER, 1996; MIRANSARI, 2013).

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para os organismos vivos, constituinte de moléculas como aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos, bases nitrogenadas e clorofila. A família botânica Leguminosae (Fabaceae) compõe um grupo numeroso de espécies de importância econômica e ecológica e é a terceira maior família de plantas com flores, somente sendo superada pelas Orchidaceae e Asteraceae (CARDOSO E ANDROETE 2016).

Assim podemos destacar dentre as leguminosas a *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (o feijão caupi), uma leguminosa que tem um alto potencial quanto ao processo de simbiose com bactérias como rizóbio que são bactérias fixadoras de nitrogênio, além disto podemos destacar sua facilidade quanto a adaptação a diferentes tipos de solo, rica em nutrientes como fibras, vitaminas além de ser uma grande fonte de proteínas.

Sendo assim o feijão caupi tornou-se no Brasil uma leguminosa muito cultivada por pequenos e grandes agricultores principalmente no Nordeste, tendo em vista que, é uma cultura de baixo custo, capacidade de adaptação quanto aos fatores climáticos, e estresse hídricos. Em virtudes dos fatores mencionados acima aposta-se no feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.)Walp) como uma cultura de subsistência, levando em consideração sua importância econômica e ecológica, pois em alguns casos esta cultura chega a dispensar a adubação nitrogenada, o que a torna uma cultura de baixo custo e “sustentável” (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa com potencial de nodular com uma diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio as quais são denominados de rizóbios, muitas vezes encontrados em diversos tipos de solos exercendo importantes funções para o desenvolvimento da planta e manutenção do solo. A proposta de estudos desenvolvidos nestas perspectivas, voltado a área de fixação biológica de nitrogênio no processo e simbiose é buscar uma menor utilização dos adubos nitrogenados, sendo ele substituído pelos inoculante naturais, além disso com um potencial simbiótico elevado, ou seja, bactérias eficientes (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

Contudo é importante destacar a relevância dos microorganismos que realizam o processo de simbiose com essas leguminosas. Compreendendo que o solo é um grande acervo de microrganismos e que os mesmos desempenham um grande papel na composição do solo. Pode-se enumerar dentre as mais diferentes funções atribuídas a estes, algumas amplamente conhecidas, como a degradação de compostos orgânicos e, por conseguinte, ciclagem de nutrientes. Além dessas atribuições podemos destacar a fixação biológica de nitrogênio, por meio de simbiose com as plantas, sendo as leguminosas uma família com alto potencial simbiótico (CARDOSOSO E ANDROETE 2016).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a ocorrência de nodulação natural em plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e avaliar a eficiência simbiótica dos rizóbios isolados de áreas da Caatinga para promover a produção vegetal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do Feijão–Caupi

O feijão-caupi é uma cultura de grande importância no território brasileiro, no entanto o cultivo do feijão se restringe as regiões norte e nordeste do país, se expandido para outras regiões. É importante ressaltar que a sua predominância é mais eficaz nas regiões norte e nordeste pelo fato do feijão-caupi ser um tipo de leguminosa com fácil adaptação a diversos tipos de solo, potencial simbiótico e capacidade de resistência a diversos fatores bióticos e abióticos. Quanto ao índice de produção, o Brasil tornou-se um dos maiores produtores do feijão-caupi e este crescimento produtivo tem sido resultado da grande demanda do mercado além da sua importância nutricional (FREIRE FILHO, QUEIROZ RIBEIRO; FERNANDES RODRIGUES, JORGE VIEIRA 2011).

Quanto ao processo histórico sabe-se que o feijão-caupi é de origem africana, sendo lá a priori o centro de produção desta cultura, tendo seu mercado muito intenso e eficaz neste período. Só em meados do século XVI que a cultura do feijão-caupi começou se expandir no Brasil trazida por colonizadores portugueses, tendo como centro de produção inicial o estado da Bahia (FREIRE FILHO 2011).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) tornou-se uma cultura importante de forma econômica e social, sendo considerada uma cultura de subsistência devido a sua riqueza nutricional, sendo uma grande fonte de nutrientes principalmente fonte proteica e de carboidratos. Sendo assim o feijão caupi tornou-se um grande aliado de pequenos e grandes agricultores, pois além do alto teor nutricional é uma cultura de baixo custo (FREIRE FILHO 2011).

Atualmente o feijão- caupi tem se tornado uma cultura de subsistência, estando presente na dieta alimentar de muitos brasileiros, principalmente em parte das famílias de classes baixa, localizadas principalmente na região nordeste do Brasil, tendo em vista que, é uma cultura de baixa exigência hídrica, vegetal de ciclo curto e conseqüentemente de baixo custo, o que tem favorecido a pequenos e grandes agricultores. Além disto uma característica marcante desta leguminosa é seu potencial simbiótico com bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas como rizóbios (EMBRAPA MEIO NORTE, 2003).

Sendo assim o feijão-caupi (*vigna unguiculata*), tem sido de grande importância para a população e para todos, tornando-se uma cultura importante no setor agrícola, o que tem impulsionado para o avanço de pesquisas, objetivando o melhoramento da cultura, podemos destacar a busca por técnicas de cultivo sustentável para manutenção da cultura do feijão-caupi, o

que a torna mais acessível a população garantindo seu cultivo por diversas famílias brasileiras (EMBRAPA MEIO NORTE, 2003).

É importante ressaltar que o território brasileiro é composto por uma grande diversidade de solos e vegetação e que muitas vezes tem sofrido de forma direta e indireta por variação de temperatura, umidade entre outros fatores ambientais, no entanto, algumas espécies de vegetais e animais tem sido privilegiado por estas razões, pois a medida que toda a questão climática é modificada essas espécies buscam meios de adaptações para sua permanência e sobrevivência naquele ambiente, ou seja, esta diversidade existente no Brasil tem proporcionado a diversos seres vivos o processo de adaptação as diversidades de clima, temperatura e solo que são constantemente modificados, em sua maioria por diversos fatores abióticos (ROCHA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Isto pode explicar como diversas espécies especificamente o feijão-caupi tem sido cultivado em diversas regiões do Brasil, sendo mais cultivada na região Norte e Nordeste.

A produção mundial de feijão-caupi tem apresentado um grande aumento o que tem sido importante para economia e para diversas famílias brasileiras principalmente as que tem a cultura como um fator de subsistência. De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) a produção mundial do feijão-caupi chegou a 7 milhões de toneladas no período de 2016 a 2018 (FAO 2020).

Contudo é de grande importância ressaltar as características desta cultura quanto a suas características taxonômicas. O feijão-caupi pertence à família botânica Leguminosae (Fabaceae), sendo este um dos maiores grupos de plantas com flores. Sua maior característica está em sua potencialidade em realizar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. Além disto a família das leguminosas tem tido um grande valor econômico e ecológico. O feijão-caupi é uma leguminosa que destaca-se pela sua capacidade de adaptação a diversos tipos de solo e a fatores e biótico e abióticos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Quanto a simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, o feijão-caupi desenvolve esta atividade com muita eficiência, auxiliando no processo de captura de nitrogênio em simbiose com bactérias, resultando em nódulos nas raízes, que servem de “abrigo” (RODRIGUES *et al*, 2012).

Com isso é importante citar que a morfologia dos nódulos vai variar, dependendo do tipo de leguminosa analisada, o que não interfere na fixação de nitrogênio, mas fica evidente a importância da formação dos nódulos, para que o processo de simbiose seja eficaz, pois os nódulos tornam-se uma estrutura específica nas raízes das plantas resultante do processo de simbiose, para que no interior dos nódulos as bactérias possam se “desenvolver”, recebendo das plantas o nutrientes e conseqüentemente capturando nitrogênio da atmosfera (KAHINDI et al., 1997).

2.2 Nutrição do Feijão-Caupi e simbiose com rizóbios

Sabe-se da importância nutritiva para todos os vegetais, para que possam ter melhor desenvolvimento, quanto a sua produtividade especificamente em números de grãos, folhas e raiz. Características primordiais para analisar o desenvolvimento na planta, que nos permite analisar quanto a presença ou ausência de determinado nutriente, como o próprio nitrogênio em que a ausência deste nutriente pode ser notada nas folhas (Zilli 2008).

O feijão-caupi é um tipo de leguminosa que demanda um alto nível de nitrogênio para o seu desenvolvimento, assim como muitos outros vegetais, sendo o caso desta leguminosa a necessidade de uma concentração maior para seu melhor desempenho, o feijão-caupi é capaz de realizar simbiose, além de nodular com diversas bactérias de rizóbios o que favorece esta leguminosa durante seu desenvolvimento (Zilli 2008).

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

Quanto a nutrição desta cultura, podemos mencionar sobre um dos nutrientes mais importante para o desenvolvimento desta leguminosa, o nitrogênio (N) que é um nutriente que possui mobilidade dentro planta, ou seja, um nutriente que tem potencial para atingir outra parte mais nova da planta de forma que as auxiliem quanto a sua produção foliar e radicular, pois sua eficiência é nítida na parte foliar da planta. Porém, o feijão-caupi pertence a uma família com alta capacidade simbiótica e produção de nódulos, resultando em algumas situações a dispensa da adubação nitrogenada onde as bactérias fixadoras de N, como os rizóbios ficaram encarregadas de fornecer o nitrogênio capturado para a planta por meio da simbiose (MARTINS, 2003).

É importante ressaltar que durante o processo simbiótico a presença de nódulos no processo de simbiose entre leguminosas e o rizóbio, torna-se um “habitat” para a bactéria (MARTINS, 2010). Sendo que, em um determinado momento em que os nódulos passam a fazer parte estrutural da planta, ele se expõe a diversos fatores ambientais que podem de forma direta ou indireta influenciar no vigor da planta.

Diante disto, alguns fatores podem afetar o processo de simbiose, dentre eles podemos citar o momento em 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 como deficiências nutricionais, condições ambientais fazem com que aumente a necessidade de absorção de nutriente pela planta (MARTINS, 2003).

As rizobactérias são inúmeras, exercendo atividade de grande relevância para o desenvolvimento da planta, contribuindo para uma alta produção e adaptação. Dentre os benefícios podem ser destacados alguns mais importantes: seu melhor desempenho quanto o aumento na germinação de sementes, o bom desenvolvimento da raiz, quanto ao seu crescimento, além de influenciar nos colmos e caules. Além disso podem também contribuir quanto ao número de folhas, flores e área foliar. Esses fatores citados acima geram um melhor desempenho quanto a produtividade da cultura, sendo parâmetros em casa de vegetação ou em condição de campo (RODRIGUES 2012).

Assim esta associação é reconhecida como uma das simbioses mais eficaz, levando em consideração toda a evolução deste grupo bacteriano, sendo considerado por alguns pesquisadores o grupo que tem o maior potencial quanto a fixação biológica de nitrogênio, gerando um grande fluxo deste nutrientes nestas leguminosas (KAHINDI et al., 1997).

No entanto é importante ressaltar a existência de alguns fatores limitantes na realização do processo de simbiose das leguminosas com os rizóbios. Dentre os parâmetros que limitam ou impendem que a simbiose seja realizada de maneira regular e eficaz são as condições tropicais, variantes existentes no solo, como mudança de temperatura, tendo em vista que, o aumento de temperaturas comprometem a sobrevivência e o desenvolvimento dos rizobios no solo, além de afetar o processo de infecção, formação dos nódulos o principal processo que realizado pela simbiose que seria a atividade de fixação biológica e a presença de diversos outros microorganismos presentes no solo que atuam na competição por nutrientes que por hora estimulam a bactéria a se adaptar, mas podem também impedir sua atuação no processo simbiótico. As temperaturas elevadas afetam a sobrevivência do rizóbio no solo, o processo de infecção, formação dos nódulos e ainda a atividade de fixação biológica (STRALIOTTO, R., et al, 1999).

Fatores biológicos, químicos e físicos podem interferir nos diversos passos que levam a simbiose mutualista. Assim, a ausência de nodulação ou nodulação ineficiente em determinada espécie sob determinadas condições edáficas e ambientes é decorrente dos fatores limitantes ao estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento da simbiose. Tanto os fatores bióticos como os abióticos podem atuar sobre a bactéria ou sobre o hospedeiro (MOREIRA; SIQUERA, 2006).

2.3 Eficiência simbiótica

Inúmeras pesquisas são desenvolvidas sobre a diversidade de bactérias capazes de nodular leguminosas das quais podemos destacar: (GROSS, 2010, COATTI, G.C.; ANDRADE, D.S.; CARDOSO, J.D.; MATOS, M.A, 2012), tendo como objetivo produzir conhecimento acerca das populações de rizóbios quanto as suas especificidades e grau de eficiência simbiótica.

Além disso, as pesquisas visam resultados baseados em características genotípicas a fim de descobrir os mais adaptados aos diversos tipos de solos, variações climáticas e estresses a que são submetidos (MOREIRA; SIQUERA, 2006).

Levando em consideração o potencial simbiótico existente entre as leguminosas e bactérias o presente trabalho busca relatar a eficácia deste fenômeno natural entre o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e bactérias coletadas de solo da Caatinga.

As leguminosas tem como umas de suas características o processo de fixação biológica de nitrogênio, de forma simbiótica com bactérias fixadoras de N₂ as quais são nomeadas de maneira geral, ou seja, coletivamente, de rizóbio. No entanto, a eficiência da fixação está sempre sujeita a sofrer variações sendo influenciada, dentre outros fatores, pela especificidade hospedeira.

Sendo assim ao buscar determinar a eficiência de uma estirpe verifica-se a capacidade de nodulação da espécie, o isolamento das bactérias, a purificação das colônias e a avaliação da eficiência em vasos com substratos esterilizados e solo não esterilizado (FARIA & FRANCO, 2002).

Quanto aos fatores específicos, podemos destacar o número de massa, biomassa e o tamanho dos nódulos, atuando como indicadores. Alguns fatores específicos são determinantes neste processo de eficiência como o número, a biomassa e o tamanho dos nódulos que são indicadores usuais de nodulação (FERREIRA & CASTRO, 1995).

São esses indicadores que formam os critérios utilizados para a avaliação da simbiose rizóbio-leguminosas, onde em sua maioria, fazem parte, inclusive do protocolo para a avaliação da eficiência agrônômica de estirpes no Brasil pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) (XAVIER et al., 2006). Desta forma, é indispensável para a seleção de uma estirpe o processo de teste de eficiência, tendo em vista que, para que a fixação de nitrogênio seja eficaz no sistema rizóbio-leguminosa é essencial à seleção de rizóbios eficientes, ou seja, que tenham a

capacidade de nodular bem, capacidade de competição e sobrevivência no ambiente (PELCZAR 2001).

Além disso, é importante ter o conhecimento da diversidade e eficiência das bactérias estabelecidas no solo. Sendo assim, justifica-se a necessidade de estudos voltados ao conhecimento da diversidade, seleção e caracterização, associado ao estudo de estratégias para avaliar a composição e a contribuição de bactérias nativas do solo onde se pretende introduzir o inoculante (FERREIRA, 2011).

2.4 Fixação biológica de Nitrogênio (FBN)

A FBN é um processo natural no qual bactérias conhecidas como rizóbios, além de outros micro-organismos procariotos, são capazes de captar nitrogênio do ar transformando-o em amônia, uma forma prontamente assimilável quando associados a plantas de Leguminosae e capaz de contribuir para o desenvolvimento de espécies cultivadas desta família (RUMJANEK et al., 2006; TAIZ e ZEIGER, 2004).

Quando mencionamos o processo de FBN é importante destacar o importante papel dos diversos microorganismos responsáveis por esta transformação, que são conhecidos como diazotróficos, que são todas as bactérias que atuam no processo de captura de nitrogênio da atmosfera, são seres vivos que pertencem aos domínios Bacteria e Archaea. São bactéria com uma grande diversidade e com grande capacidade de adaptação a vários tipos de solos e temperatura, com isso devido a sua grande diversidade, são encontrados nos mais diferentes tipos de habitats, tendo como características gerais, em maioria são espécies de vida livre com ocorrência em todos os tipos de solo, rizosfera e filosfera, águas doces e salgadas (CARDOSO E ANDREOTE 2016).

As bactérias fixadoras de nitrogênio que são capazes de formar os nódulos fazem associação com leguminosas e são popularmente conhecidas como rizóbios. Estes microrganismos pertencem à classe Alphaproteobacteria (ordem Rhizobiales, gêneros Allorhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium e Sinorhizobium) (CARDOSO E ANDREOTE 2006).

O processo de fixação em leguminosas ocorre com a infestação do rizóbio na raiz provocando a formação de nódulos que originarão colônias de bactérias, as quais por meio de processos bioquímicos fixam nitrogênio (N) na planta. Os nódulos possuem uma hemeproteína, a leg-hemoglobina, que se liga ao oxigênio impedindo que este reaja com a nitrogenase (TAIZ e ZEIGER, 2004).

A fixação biológica de nitrogênio consiste na utilização do nitrogênio gasoso (N₂) 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 conseqüentemente, por meio de processos metabólicos, convertem nitrogênio atmosférico em amônia a qual é a forma em que a planta consegue absorver e assimilar para formar elementos essenciais como proteínas (SILVA et al., 2006).

O N₂ é um tipo de nutriente que pode ser fixado naturalmente mediante descargas elétricas na atmosfera e, de forma artificial, através de processo industrial para a produção de fertilizantes conhecido como processo Haber-Bosch, considerado uma das principais invenções no século XX (CARDOSO E ANDREOTE 2016), sendo o processo relatado acima importante, portanto menos ecológico, mais artificial, o que foge da proposta de fixação biológica de forma natural realizado pelo processo simbiótico. Contudo, para a concretização deste processo, o gasto de energia é muito alto diferentemente da fixação biológica que contribui com a maior parte do nitrogênio fixado atualmente no planeta, sendo que a quebra da tripla ligação ocorre a pressões e temperaturas ambientes por meio de atividade enzimática (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Este processo é promovido biologicamente por meio de uma pequena parcela de procariotos que possuem a enzima nitrogenase, capaz de reduzir o N-atmosférico à amônia no processo que é conhecido como fixação biológica do nitrogênio FBN (ANDROETE; CARDOSO; 2016).

Quanto aos benefícios da FBN na cultura do feijão-caupi podemos citar o suprimento de nitrogênio para o desenvolvimento das plantas, o fornecimento de nitrogênio na forma de proteína à alimentação humana através do consumo de grãos que podem ser verdes ou secos e o aporte de quantidade significativa de N (nitrogênio) ao solo (URQUIAGA e ZAPATA, 2000).

A FBN possui grande importância no aspecto econômico e ecológico tanto em sistemas agrícolas como florestais (REIS; TEIXEIRA, 2005), além de possuir um papel fundamental na sustentabilidade dos ecossistemas, já que o nitrogênio de origem biológica está prontamente disponível para as plantas e é, portanto, menos susceptível a perdas por lixiviação, volatilização ou desnitrificação (ANDROETE; CARDOSO, 2016).

É de grande relevância mencionar que a implantação de leguminosas capazes de realizar FBN em área da Caatinga pode contribuir para o enriquecimento de diversas culturas além de auxiliar no processo de fertilização do solo tendo em vista que essas leguminosas são ricas em proteínas capazes de auxiliar no desenvolvimento da planta, pois, em geral, as regiões semiáridas

são pobres em nitrogênio e, como um agravante para esta realidade, o uso de fertilizantes químicos torna-se inacessível pelo alto custo, sendo a FBN um mecanismo eficiente para agricultores.

Diante das afirmações acima conclui-se que a FBN é um mecanismo de grande relevância e eficácia para o desenvolvimento das plantas. No entanto, alguns fatores são limitantes para que este processo aconteça fortalecendo e motivando pesquisas voltadas para a temática aqui abordada. Com o intuito de buscar a efetivação da FBN no setor agrícola de maneira econômica e sustentável além de fortalecer propostas de trabalhos em áreas da Caatinga.

2.5 Características da microbiota do solo da Caatinga

Poucas pesquisas foram desenvolvidas acerca da microbiota da Caatinga, consequentemente uma “escassez” de dados acerca de microrganismos presente em solos dessa região, mas ainda assim podemos destacar alguns estudos vinculados a esta temática, Gorlach-Lira & Coutinho (2007), que desenvolveram um trabalho acerca da dinâmica populacional de bactérias presentes na rizosfera, Isolamento de Bactérias Associadas a Plantas do Bioma Caatinga no Semiárido Nordeste, CADETE, L. L. (2011) que observou a prevalência de bactérias mesofílicas heterotróficas com potencial em formação de esporos e actinobactérias em *Aristida adscensionis* (Poaceae).

Diante desta perspectiva buscou-se conceituar microbiota de forma que *albergasse* os microrganismos no solo da Caatinga, assim Boon (2014) propôs que a melhor definição de microbiota seria aquela relacionada ao conjunto de genes encontrados de maneira associada aos organismos que colonizam um determinado ambiente.

O bioma da Caatinga é caracterizado por uma irregularidade em sua distribuição pluviométrica, além de possuir uma vegetação estacional tendo como característica predominante o endemismo. Junto a rica vegetação deste bioma e sua capacidade de adaptação às condições intrínsecas desta região, podemos destacar a sua microbiota.

A fração viva do solo é essencial para o seu funcionamento sendo a ela atribuída a muitos processos que regem a manutenção e a funcionalidade dos solos. Sendo que a maneira como desempenham suas funções similares em solos com diversas variantes, inclusive temperatura, pode ser realizado pelo mesmo grupo de organismos ou por organismos diferentes, o que leva à necessidade de compreender a composição e o funcionamento metabólico do microbioma dos solos que sustentam os biomas brasileiros, ou seja, é importante entender a dinâmica do solo, quanto a sua composição, presença de micro-organismo, Ph entre outros fatores que permeiam esse local de habita para diversos microorganismo e vegetais (ANDROETE; CARDOSO, 2016).

Considerando as áreas naturais, temos ainda pouco conhecimento sobre a microbiologia dos solos dos principais biomas brasileiros, principalmente devido à extensão do território nacional, o que gera a necessidade de grandes esforços amostrais o que por vezes é limitado ao acesso restrito a áreas mais remotas de nossa nação (ANDROETE; CARDOSO, 2016).

Botanicamente, a Caatinga constitui-se de um complexo vegetal muito rico em espécies lenhosas e herbáceas, sendo as primeiras caducifólias e as últimas anuais, em sua grande maioria. Numerosas famílias estão representadas, destacando-se as leguminosas, as euforbiáceas e as cactáceas. Nota-se que a Caatinga tem uma grande diversidade vegetal que nos leva a entender que o solo desta região apresenta uma microbiota vasta e rica, no que diz respeito ao processo de desenvolvimento das plantas e absorção de nutrientes (ARAÚJO; CARVALHO, 1997).

Os microrganismos no solo são fortemente influenciados por vários fatores químicos e físicos incluindo disponibilidade de nutrientes, matéria orgânica, umidade e temperatura do solo. Contudo, o processo de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio com as leguminosas podem contribuir de forma efetiva para a melhoria da qualidade do solo e crescimento vegetal (CASSETARI, SILVA, CARDOSO, 2016).

As leguminosas apresentam teores de nitrogênio elevados em seus tecidos, resultando então em um aumento de nutrientes e matéria orgânica no solo em que se desenvolvem (FRANCO et al., 1995). Além disso, os microrganismos desempenham funções ecológicas importantes como a ciclagem de nutrientes, absorção de nutrientes, assim como auxiliam no processo de FBN (HWAH et al., 2002). Nos trópicos semiáridos, as bactérias termofílicas e termocontrolantes podem desempenhar papel significativo no solo. No entanto, existem poucos relatos desses grupos microbianos em relação à abundância e diversidade no solo (GORLACH-LIRA, COUTINHO, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Experimento 1: Autenticação dos isolados em *Vigna unguiculata* (L.)Walp.

3.1 Caracterização da coleção dos isolados bacterianos

Todas as bactérias foram obtidas anteriormente a esta pesquisa, onde se realizou o teste de eficiência, que teve como planta isca o *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong uma espécie pertencente à família Fabaceae, conhecida popularmente como timbaúva, orelha-de-negro, tamboril,

orelha-de-macaco, entre outros, com ocorrência desde a Colômbia e Peru, até Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Brasil (Pará, Goiás, Mato Grosso até o Rio Grande do Sul) (BACKES; IRGANG, 2009). As bactérias encontram-se depositadas na coleção de cultura de microrganismo do Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD-AL), localizado na Universidade Federal de Alagoas (UFAL-Campus Maceió).

Os isolados estudados foram submetidos à avaliação da capacidade de formar simbiose com *Vigna unguiculata*, em um experimento de autenticação. Foram avaliados quanto à capacidade da formação de nódulos, onde das 28 amostras da coleção utilizou-se 12 amostras para o experimento de autenticação. As bactérias foram selecionadas de acordo com suas características fenotípicas que levam em consideração tempo de crescimento e pH, crescimento rápido e pH ácido (RA), rápido e neutro (RN), intermediário e alcalino (IAI), lento e neutro (LN) e lento e alcalino (LAI) (Tabela da coleção com as características fenotípicas - apêndice). É importante salientar que este processo de caracterização fenotípica foi realizado com o intuito de analisar quais bactérias podem ser consideradas rizóbios, tendo em vista que, para isto a caracterização fenotípica leva em consideração as bactérias de crescimento rápido, Ph neutro e produção de muco em grande quantidade. Sendo estes os critérios fenotípicos para considerar a bactéria como “rizóbios”, sendo este processo importante para realizar testes posteriores como eficiência e caracterização genotípica.

As 12 amostras de bactérias foram oriundas de ambientes da Caatinga do estado de Alagoas sendo quatro de Pão de Açúcar -PA (A), três de Traipu-TR (B), dois de Delmiro Gouveia -DG (C), três de Olho D'Água do Casado – OC (D) e quatro inoculantes comerciais. Utilizou-se o Feijão Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Figura 1).





Fonte: Acervo pessoal do autor

Figura 1. Bactérias em placas das quatro áreas da Caatinga Pão de Açúcar -PA (A), Traipu-TR (B), Delmiro Gouveia -DG (C) e D'Água do Casado – OC (D).

O experimento foi conduzido em uma sala do Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD) na Universidade Federal de Alagoas, UFAL- *Campus* Maceió. A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. foi escolhida por ser uma leguminosa com ampla capacidade de estabelecer simbiose com diversos grupos de rizóbios, além de ser uma planta utilizada com frequência em experimentos de autenticação.

As sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (feijão-caupi) foram submetidas à desinfestação com álcool (70%) por um minuto, hipoclorito de sódio (2%) por três minutos e cinco lavagens sucessivas em água destilada estéril, após este processo foi realizado o plantio tendo sido adicionado 100g de solo. O mesmo foi armazenado em vasos desinfestados com 70% e hipoclorito 2%. Os vasos tinham capacidade de 300 ml e utilizou-se sementes comerciais presentes no próprio laboratório (Figura 2).

Em cada copo foram adicionadas quatro sementes contendo areia autoclavada e vermiculita sendo plantadas quatro sementes por vasos. O processo de inoculação foi realizado por meio de raspagem em placa utilizando o maior número de células puras. As sementes ficaram três minutos imersas na placa de forma que garantisse o maior número de células. Dez dias após a emergência foi realizado o desbaste deixando duas plantas por vaso. Uma vez por semana as plantas foram regadas com 50 ml de solução nutritiva Norris (VICENTE, 1970) e água autoclavada quando

necessário. A coleta das plantas foi realizada 45 dias após a emergência (figura F). Na ocasião foram determinadas a presença e ausência de nódulos e número de nódulos por plantas.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições. Posteriormente foi realizada a média de nodulação por vaso e verificada a sua distribuição pelo teste de Tukey e posteriormente aplicada a análise de variância por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 2. Sementes de feijão-caupi submetidas à desinfestação com álcool (70%), hipoclorito de sódio (2%) e lavagens em água destilada estéril (E). Plantas de *Vigna unguiculata* (L.)Walp. (F).

Experimento 2: Teste de eficiência nodulação natural a partir do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Para a realização do experimento dois foram utilizadas sete amostras de bactérias oriundas de ambientes da Caatinga do estado de Alagoas. A escolha destas bactérias se deu após o resultado do experimento um, que permitiu detectar quais bactérias tiveram o melhor desempenho quanto ao número de nódulos.

Sendo assim, após os resultados do experimento um foi possível utilizar as seguintes bactérias: duas de Pão de Açúcar, duas de Traipu, uma de Delmiro Gouveia, duas de Olho D'Água do Casado e um inoculante comercial BR3267 e um controle não inoculado. Utilizou-se como planta isca o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) por ser uma leguminosa com ampla capacidade

de estabelecer simbiose com diversos grupos de rizóbios, com grande importância agrícola no semiárido.

O experimento foi conduzido em uma área delimitada na própria Universidade Federal de Alagoas, UFAL- Campus Maceió, em uma área restabelecida no Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD-AL) em condições de céu aberto.

O delineamento adotado foi em bloco casualizados com treze parcelas e trezes repetições para cada inoculante (Figura 3) . Para o plantio foram utilizadas semente de feijão-caupi que foram submetidas aos seguintes procedimentos: desinfestação com álcool (70%) por um minuto, hipoclorito de sódio (2%) por três minutos e cinco lavagens sucessivas em água destilada estéril.

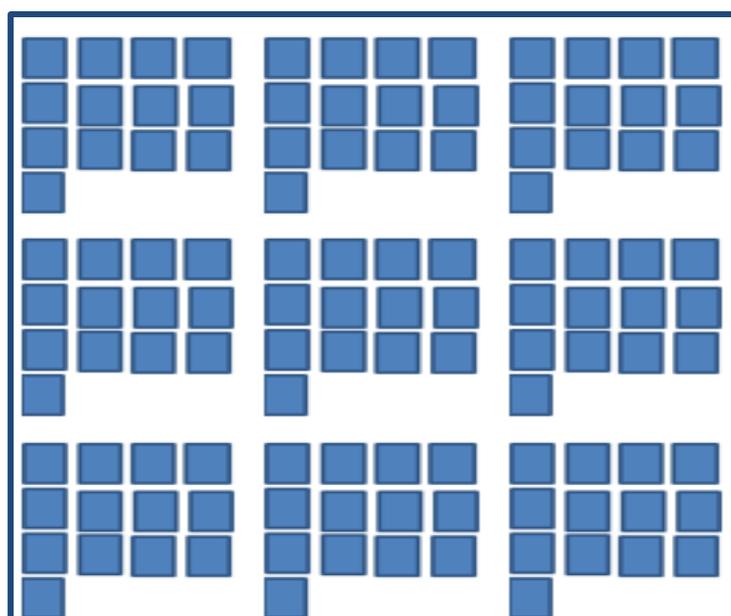


Figura 3. Croqui do experimento do teste de eficiência em *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

A inoculação foi realizada 30 minutos antes da semeadura, através da mistura das sementes com o inoculante, por meio do processo de raspagem na placa aproveitando o maior número de células puras. Quanto ao solo utilizado para o plantio foi adicionado 6 kg de solo do próprio campus solo não estéril, utilizando solo do próprio campus com intuito de testar as bactérias em condições de campo. O mesmo foi armazenado em garrações de 20L e em cada garrafão foram plantadas quatro sementes (Figura 4).



Fonte: Acervo pessoal do autor

Figura 4. Experimento: teste de eficiência em *Vigna unguiculata* (L.)Walp.

Quinze dias após a emergência foi realizado o desbaste deixando duas sementes por vaso e quanto a irrigação era realizada três vezes por semana em dias alternados. As plantas foram coletadas separando as raízes da parte aérea na base do caule para que se pudesse destacar e realizar a contagem dos nódulos presentes nas raízes.

Após as avaliações citadas acima, a biomassa vegetal, raiz e nódulos, foram colocados para secar em estufa a 65°C por 72 horas para obtenção da massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e massa seca dos nódulos (MSN). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey, análise de regressão a 5% de probabilidade, com auxílio do software Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011).

Esses dados tornam-se cruciais para a melhor definição acerca da eficiência simbiótica entre os rizóbios e as leguminosas. Reforçando esta proposta, Souza (2008) define um conjunto mínimo de dados para avaliação da FBN, como a massa dos nódulos e da parte aérea e o total de N acumulado pela planta.

O número de nódulos é um indicador usual de nodulação (FERREIRA E CASTRO, 1995) e constitui critérios utilizados para a avaliação da simbiose rizóbio-leguminosas, fazendo parte, inclusive, do protocolo para avaliação da eficiência agrônômica de estirpes no Brasil pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos (XAVIER, 2006).

4 RESULTADOS

4.1 - Teste 1: Autenticações dos isolados em *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Diante dos resultados obtidos foi possível perceber que *Vigna unguiculata* (L.) Walp. demonstrou potencial em nodular com as populações de rizóbios de todas as amostras utilizadas. É importante ressaltar que a partir de 32 dias após a germinação já foi observada a presença de nódulos. No entanto, o processo de coleta só foi realizado 45 dias após a germinação, tempo ideal para o melhor desenvolvimento dos nódulos referente ao isolado de Pão de Açúcar (Figura 5).



Fonte: Acervo pessoal do autor

Figura 5. Nódulos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. na raiz principal da amostra de Pão de Açúcar.

Observando os resultados obtidos, nota-se que houve variação significativa na nodulação de *Vigna unguiculata*, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. As bactérias de Pão de Açúcar e Olho D'Água do Casado proporcionaram maior nodulação comparada às bactérias oriundas de Delmiro Gouveia e Traipu, tendo uma quantidade de nódulos considerada baixa (Figura 6).

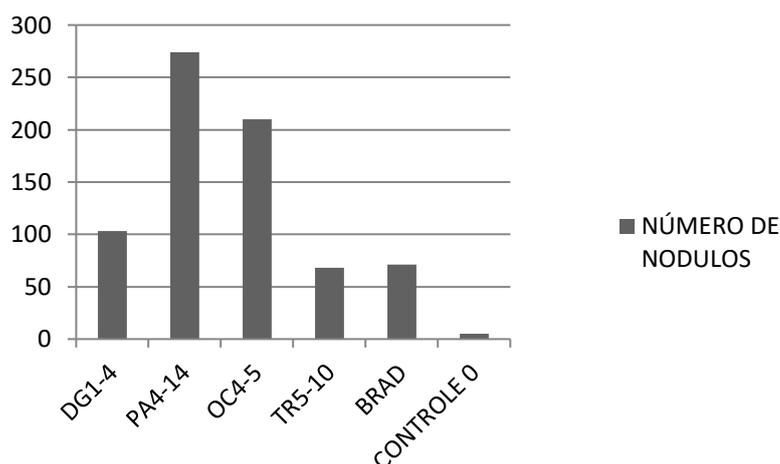


Figura 6. Número de nódulos por áreas, obtido por meio do teste de autenticação. Fonte: Farias (2021)

Levando em consideração que o teste de autenticação permite avaliar quais bactérias teriam um maior potencial de nodulação, os resultados aqui obtidos foram de grande relevância para os testes de eficiência, tendo parte das bactérias condições favoráveis para o segundo teste.

Os dados apresentados no gráfico acima (figura 6) mostram que houve diferenças entre os tratamentos inoculados com as estirpes BR 3267 e os tratamentos de Pão de Açúcar (PA4-14), Delmiro Gouveia (DF1-4) e Olho D'Água do Casado (OC4- 5), sendo superiores aos demais tratamentos, sendo que PA4-14, OC4 -5 tiveram maior número de nodulação.

Quanto aos menores valores entre os tratamentos inoculados, podemos destacar o tratamento com a estirpe BR 3267 sobressaindo-se em comparação apenas aos tratamentos de Traipu .

Todos os isolados nodularam *Vigna unguiculata*. Dos 28 isolados que nodularam *V. unguiculata*, 10 são de crescimento lento e pH alcalino, 17 são rápidos variando quanto ao seu Ph em neutro, alcalino e ácido.

Assim, a confirmação da presença de rizóbios nos diferentes tipos fenotípicos de bactérias obtidas neste estudo anterior conforme nos indica a tabela de características fenotípica (apêndice 1).

4.2 - Teste 2: Teste de eficiência da nodulação natural a partir da planta isca

Houve nodulação com as bactérias de todas as áreas, sendo o maior número de nodulação com as bactérias de Olho D'Água do Casado, Pão de Açúcar e Delmiro Gouveia (Figura 6), resultado que reflete sobre os dados obtidos no Teste um, teste de autenticação.

Assim os resultados obtidos estabelecem a interação significativa entre as mesmas de acordo com teste de Tukey, p 0,05% (Tabela 2). Quanto à matéria seca de nódulos, houve diferença significativa entre os tratamentos DG1-4, OC1-1 (Figura 7). Resumo da análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de nodulação natural a partir da planta reforça o bom desempenho das bactérias DG1-4 EOC1-1 (Tabela 1).

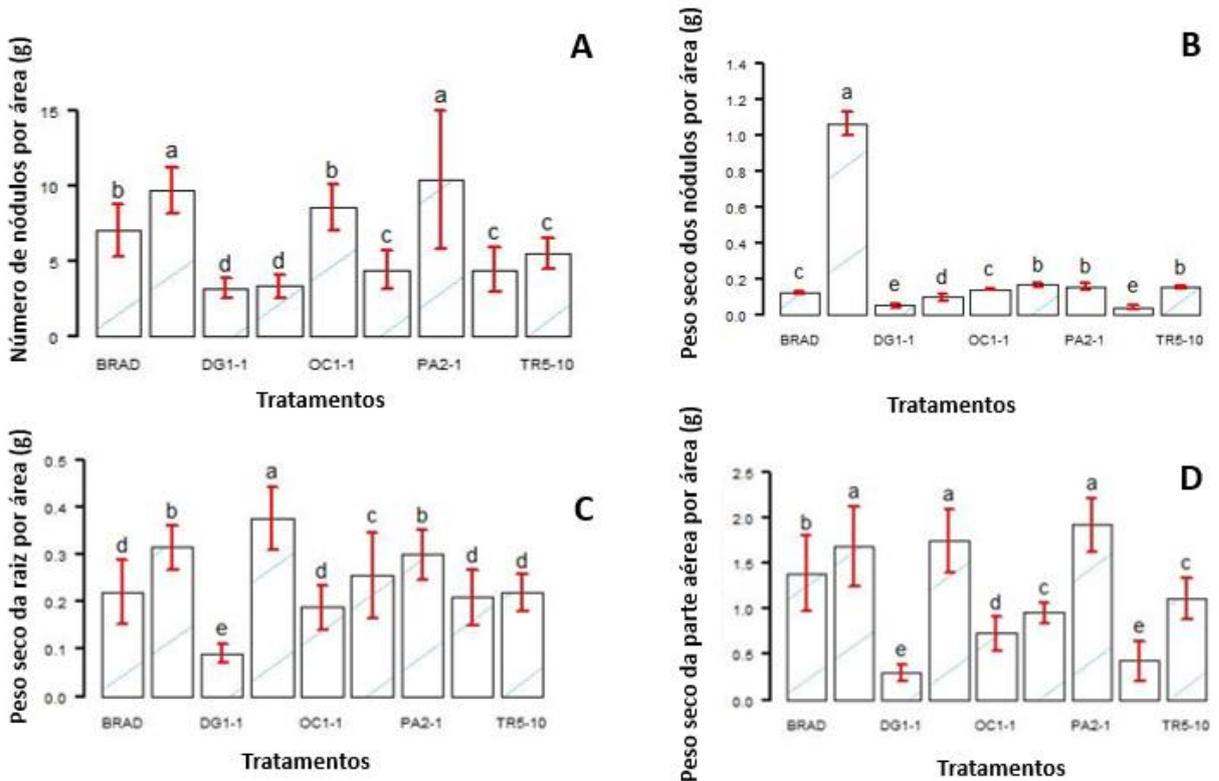


Figura 7. (A) Número de nódulos, (B) Peso seco dos nódulos, (C) Peso seco da raiz e (D) peso seco da parte aérea, Fonte: Farias (2021).

Tabela 1. Resumo da análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de nodulação natural a partir da planta isca.

Parâmetros de nodulação	Variáveis	FV	GL	QM	CV
NM	Bactérias	8	87,5221**	31,36	
	Blocos	8	4,0812 ^{ns}		
	Média geral	6,2564			
PSN	Bactérias	8	1,1885**	12,03	
	Blocos	8	0,0007 ^{ns}		
	Média geral	0,2161			

PSR	Bactérias	8	0,0791**	24,56
	Blocos	8	0,0018 ^{ns}	
Média geral		0,2414		
PSA	Bactérias	8	3,7627**	26,85
	Blocos	8	0,0552 ^{ns}	
Média geral		1,1140		

FV: fontes de variação; GL: Graus de liberdade do erro; QM: quadrados médios; CV: coeficientes de variação. ** e ^{ns} significativo a $p < 0,01$ e não significativo, respectivamente Fonte: Farias (2021).

Em relação ao número de nódulos, dentre os tratamentos citados, apenas o PA1-1 apresentou maiores valores médios, sobressaindo inclusive o BRAD (Tabela 2).

Tabela 2. Nodulação natural a partir da planta isca.

Bactérias	NM**	PSN**	PSR**	PSA**
Controle	9,692 ^a	1,062 ^a	0,314 ^{ab}	0,314 ^{ab}
TR1-8	4,384 ^{cde}	0,038 ^d	0,209 ^{bcd}	0,209 ^{bcd}
TR5-10	5,461 ^{bcde}	0,151 ^b	0,218 ^{bcd}	0,218 ^{bcd}
OC1-1	8,583 ^{ab}	0,135 ^b	0,187 ^{de}	0,187 ^{de}
OC2-1	4,384 ^{cde}	0,162 ^b	0,256 ^{bcd}	0,256 ^{bcd}
DG1-1	3,153 ^e	0,050 ^d	0,090 ^e	0,090 ^e
DG1-4	3,307 ^{de}	0,072 ^{cd}	0,376 ^a	0,376 ^a
CO1-1	8,00 ^{abc}	0,140 ^b	0,190 ^{cde}	0,190 ^{cde}
BRAD	7,00 ^{abcd}	0,118 ^{bc}	0,220 ^{bcd}	0,220 ^{bcd}
PA2-1	10,384 ^a	0,152 ^b	0,299 ^{abc}	0,299 ^{abc}

** significativo a $p < 0,01$.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre a nodulação natural de bactérias (ANOVA, teste de Tukey, $p < 0,05$) Fonte: Farias (2021).

Diante dos dados apresentados, quanto a eficiência relativa, ou seja, em alguns casos os resultados oscilam o que nos permite frisar essa eficiência relativa ente os tratamentos (DG1-4, PA1-1, OC2-1,) apresentaram os maiores valores médios.

Ao que se refere à matéria seca de raízes (MSR) houve diferença significativa entre os tratamentos uma vez os resultados mostrou que três isolados (DG1-4, PA1-1, OC2-1) obtiveram valores médios que diferiram do controle e do BRAD (BR 3267), sendo superiores não somente ao

inoculante BR 3267 bem como ao controle e aos demais tratamentos. Quanto à matéria seca da raiz, podemos destacar os tratamentos (DG1-4, PA1-1), tendo em vista que, promoveram uma maior produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), as informações relatadas acima, só foram possíveis concretiza-las devido os valores médios que diferiram do controle.

No experimento dois conduzido em condição de campo, submetido aos fatores biótico, abióticos e competição com bactérias do próprio campus além de outros microorganismos que possivelmente habitam no solo do campus o qual foi utilizado para a montagem do experimento, possivelmente são fatores que influenciam no desenvolvimento da planta, tivemos os tratamentos PA1-1, DG1-4 que se destacaram quanto a massa seca, entretanto nenhum dos tratamentos tiveram uma expressividade eficaz com potencial para diferir totalmente do controle.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora as bactérias de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (tamboril) tenham nodulado o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), com base nos resultados obtidos como números de nódulos, peso seco dos nódulos, peso seco da raiz e peso seco da parte aérea nenhuma delas apresentou eficiência quando testada no solo do Campus A. C. Simões nas condições naturais. Possivelmente as bactérias testadas não estavam tão adaptadas ao solo e as condições ambientais. Isso se verificou, inclusive para o rizóbio comercial. É possível que se verifique um comportamento diferente para testes feitos na Caatinga. Sugere-se a repetição do experimento em outras condições climáticas ou em casa de vegetação com controle de temperatura e umidade.

6. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2nd ed. New York, John Wiley, 1977. 472 p.
- ANDROETE, F. D.; CARDOSO, J. B. N. **Microbiologia do solo**: 2° ed. Piracicaba - SP: ESALQ, 2016.
- ARAÚJO FILHO, J. A. de; CARVALHO, F. C. de. **Desenvolvimento sustentado da Caatinga**. Sobral: EMBRAPA - CNPC, 1997. P. 19 (EMBRAPA - CNPC. Circular Técnica, 13).
- 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**. Santa Maria, Ciência Rural, v.40, n.5, p.1075-1082, 2010.
- BOON, E. **Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes**. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 38, p. 90–118, 2014.
- CADETE, L. L.; FARIAS, A. R. B. de; SILVA, M. C. de B.; ANDRADE, P. A. M.; MELO, I. S. de; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. **Bactérias associadas a plantas da Caatinga: isolamento, fixação de nitrogênio e produção molécula**. Embrapa Meio Ambiente 2012.
- CASSETARI, A., S ; SILVA, M., C. P, S; CARDOSO, E.; JBN. **Microbiologia do solo: fixação biológica de nitrogênio simbiótica**. 2.ed. Piracicaba, São Paulo: Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso Fernando Dini Andreote 2016. Disponível em https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia_solo.pdf. Acesso em: 27 de mar. 2020.
- COATTI, G.C.; ANDRADE, D.S.; CARDOSO, J.D.; MATOS, M.A. **Produção de AIA e Diversidade Fenotípica de Estirpes Elite de Rizóbio Isoladas de Feijoeiro**. Journal of Health Sciences, v.12, n.1, p. 49-53, 2012.
- CORBY, H.D.L. The systematic value of leguminous root nodules. In: INTERNATIONAL LEGUME CONFERENCE, 1981, London. **Advances in legume systematics: proceedings...** London: Royal Botanical Gardens, 1981. pt. 2, p. 657-670.
- 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 MEIO-NORTE. Cultivo de feijão caupi. Jul/2003. Disponível em: Acesso em: 04 mar. 2020.

FAO, 2015. **Produção mundial de Feijão-caupi.** Disponível em <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em junho de 2019.

FERREIRA, E.M. & CASTRO, I.V. Nodulation and growth of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in soils previously treated with sewage sludge. Soil Biol. Biochem., 27:177-1183, 1995.

FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C. & TSAI, S.M. **Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano.** Pesq. Agropec. Bras., 37:1145-1150, 2002.

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. (Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, 04).

L'TAIEF, B.; SIFI, B.; ZAMAN-ALLAH, M.; HORRES, R.; MOLINA, C.; BEEBE, S.; WINTER, P.; KAHL, G.; DREVON, J.; LACHAÂL, M. **Genotypic variability for tolerance to salinity and phosphorus deficiency among N₂-dependent recombinant inbred lines of common bean (*Phaseolus vulgaris*).** African Journal of Microbiology Research, v. 6, n. 22, p. 4205-4213, 2012.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H.D.M. population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi – arid soil of northeastern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 38: 135, 2007.

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.

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.

MARTINS, A.F.; VARGAS, L.K.; ZANIN, J.G. **Resistência à salinidade de rizóbios noduladores de Lotus spp**. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v.16, n.1, p.73-79, 2010.

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.

MARTINS, L.M.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMJANEK, N.G. **Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil**. *Biology and Fertility of Soils*, v.38, p.333-339, 2003.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª ed. Lavras: Editora EDUFLA. P. 501-529. 2006.

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.

PATIL, S. M.; PATIL, D. B.; PATIL, M. S.; GAIKWAD, P. V.; BHAMBUDEKAR, S. B.; PATIL, P. J. **Isolation, characterization and salt tolerance activity of Rhizobium sp. from root nodules of some legumes**. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 3, n. 5, p.1005-1008, 2014.

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.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. **Fixação biológica de nitrogênio-estado da arte**. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. **Processos biológicos no sistema solo planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. p.151-180.

RODRIGUES, A.C.; et al.; Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. *Bioscience Journal*, V.28, Supplement 1, p. 196-203, 2012.

SHARMA, S.R.; RAO, N. K.; GOKHALE, T. S.; ISMAIL, S. **Isolation and characterization of salt-tolerant rhizobia native to the desert soils of United Arab Emirates.** *Emirates Journal of Food and Agriculture*, v. 25, n. 2, p. 102-108, 2013.

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.

SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; MACIEL, C.D.; CAMPO, R.J. & ZAIA, D.A.M. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43:83-91, 2008.

STRALIOTTO, R., et al. **Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose.** Embrapa, documento n.º 95, 1999.

URQUIAGA, S.; ZAPATA, F. **Manejo eficiente de la fertilizacion nitrogenada de cultivos anuales em America Latina y el Caribe.** Porto Alegre: Gênese, 2000. P. 110.

VENTORINO, V.; CAPUTO, R.; DE PASCALE, S.; FAGNANO, M.; PEPE, O.; MOSCHETTI, G. **Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the presence of different legume host plants.** *Annals of Microbiology*, 2011.

7. APÊNDICE

ISOLADO	TEMP. DE CRES	pH	PROD. DE MUCO	COR DA COLÔNIA	TIPO DE GOMA
DG1-1	LENTO	Alcalino	Muito	Branca	aquosa
DG5-1	LENTO	Alcalino	pouco	branca	consistente
DG1-4	LENTO	alcalino	pouco	branca	aquosa
TR5-9	LENTO	alcalino	pouco	branca	consistente
DG5-16	LENTO	neutro	muito	creme	aquosa
PA5-3	LENTO	neutro	muito	branca	aquosa
PA5-1	LENTO	alcalino	muito	branca	aquosa
PA5-2	LENTO	alcalino	muito	branca	aquosa
DG4-6	LENTO	alcalino	pouco	branca	aquosa
DG1-3	LENTO	alcalino	pouco	branca	aquosa
TR5-8	LENTO	alcalino	pouco	branca	aquosa
OC2-1	LENTO	alcalino	pouco	branca	aquosa
TR5-10	LENTO	alcalino	muito	branca	aquosa
TR5-5	LENTO	alcalino	pouco	branca	aquosa
PA4-14	LENTO	alcalino	pouco	branca	consistente
PA5-6	LENTO	alcalino	pouco	branca	consistente
DG1-2	LENTO	alcalino	pouca	branca	aquosa
OC4-5	RÁPIDO	neutro	pouco	amarela	consistente
DG5-9	RÁPIDO	alcalino	pouco	amarela	consistente
DG5-12	RÁPIDO	neutro	pouco	amarela	consistente
PA4-48	RÁPIDO	ácido	muito	amarela	aquosa
PA2-1	RÁPIDO	alcalino	muito	branca	aquosa
PA5-4	RÁPIDO	neutro	muito	creme	aquosa
TR1-8	RÁPIDO	neutro	pouco	amarela	consistente
PA2-21	RÁPIDO	neutro	pouco	amarela	consistente
PA2-23	RÁPIDO	neutro	pouco	amarela	consistente
OC4-7	RÁPIDO	neutro	pouco	amarela	consistente
DG3-4	RÁPIDO	neutro	pouco	amarela	consistente
DG5-10	RÁPIDO	alcalino	pouco	amarela	Consistente

Fonte: COSTA (2020)