

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Ensino de Pós-Graduação (PPG)**  
**Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS)**  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada (PPGHI)**

**PÂMELLA THALITA SOUZA SENA**

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE  
FEIJÃO-CAUPI EM SOLOS SOB DIFERENTES USOS AGRÍCOLAS DO  
SEMIÁRIDO BAIANO**

**JUAZEIRO-BA**

**2018**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Ensino de Pós-Graduação (PPG)**  
**Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS)**  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada (PPGHI)**

**PÂMELLA THALITA SOUZA SENA**

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE  
NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI EM SOLOS SOB DIFERENTES USOS AGRÍCOLAS  
DO SEMIÁRIDO BAIANO**

Defesa apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada da Universidade do Estado da Bahia (PPGHI -UNEB/DTCS), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, Proteção de Plantas: Agronomia - Horticultura Irrigada.

**Orientador:** Dr<sup>a</sup>. Lindete Míria Vieira Martins

**Co-orientador:** Dr. Paulo Ivan Fernandes Junior

JUAZEIRO-BA

2018

---

Sena, Pâmela Thalita Souza

S474 Caracterização polifásica de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos sob diferentes usos agrícolas do semiárido baiano. / Pâmela Thalita Souza Sena. -- Juazeiro, 2018.

73 f. il.

Orientadora: Lindete Mária Vieira Martins

Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada) - Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais. Campus III, 2018.

#### Bibliografia

1. Feijão-de-corda 2. Rizóbios 3. Bactérias 4. Semiárido I. Martins, Lindete Mária Vieira II. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais

CDD 635.652

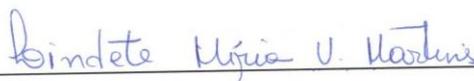
---

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)  
Pró-Reitora de Pesquisa e Ensino de Pós-Graduação (PPG)  
Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS)  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada (PPGHI)

PÂMELLA THALITA SOUZA SENA

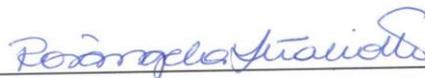
**“CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS  
DE FEIJÃO-CAUPI EM SOLOS SOB DIFERENTES USOS AGRÍCOLAS DO  
SEMIÁRIDO BAIANO**

Aprovada em: 16/05/2018



Dr.<sup>a</sup> Lindete Míria Vieira Martins

Universidade do Estado da Bahia - UNEB/DTCS III



Dr.<sup>a</sup> Rosângela Stralotto

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Solos



Dr.<sup>a</sup> Paula Rose de Almeida Ribeiro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada PPGHI/UNEB

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, pai misericordioso que sempre está ao nosso lado, por ter me concedido a vida;

A minha mãe, Júlia Custódia, que me ensinou o que é o amor incondicional e pelo apoio de todos os dias;

As minhas irmãs maravilhosas, Palloma e Priscilla, por todo suporte, amor, ajuda, brigas, ensinamentos e cumplicidade em todos os momentos da minha vida, sem vocês eu não seria quem eu sou;

A “my little princess”, Laura, que chegou em nossas vidas para nos mostrar o quanto Deus é maravilhoso. Auntie loves you!

A minha família, pelo apoio e dedicação em todas as fases da minha vida;

Ao meu querido namorado, Adheilton Rogers, por todo carinho, paciência, apoio e incentivo em todos os momentos;

A CAPES pela concessão da bolsa e apoio ao programa;

A minha orientadora, professora Lindete Martins, por ter acreditado em minha capacidade como aluna e bolsista e pela paciência em me ensinar sempre que foi preciso;

Ao meu co-orientador, Dr Paulo Ivan, pela paciência e ensinamentos;

Ao Instituto Regional da Pequena Agropecuária Apropriada (IRPAA), pelo apoio e colaboração;

Ao Sr. Vanderlan Quezado, gerente executivo do perímetro irrigado Mandacaru, pelo apoio e colaboração na coleta das amostras de solos;

Ao Sr. Arquimedes Santos, do IRPAA pelo apoio e colaboração na coleta da amostra de solo;

A Embrapa Semiárido, pela estrutura e suporte durante toda a pesquisa;

Aos professores do programa de Pós-Graduação Agronomia Horticultura-Irrigada, por todo ensinamento acadêmico e para vida.

Aos colegas de laboratório da UNEB, pela ajuda e companheirismo em todos os dias de trabalho;

Aos amigos que fiz na EMBRAPA, obrigada por terem feito essa parte da minha jornada tão especial;

Aos amigos do mestrado por todo carinho, risadas, conselhos e ajudinhas voluntárias (risos).

# CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI EM SOLOS SOB DIFERENTES USOS AGRÍCOLAS DO SEMIÁRIDO BAIANO

## RESUMO

A agricultura é um dos setores mais importantes da economia no Brasil, e tem grande destaque no semiárido baiano, mais precisamente na região integrada de desenvolvimento de Juazeiro (BA) - Petrolina (PE). Os variados usos da terra para a agricultura nessa região têm efeito direto na microbiota do solo. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar a diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam feijão-caupi em solos agrícolas com diferentes usos e área de Caatinga do município de Juazeiro, Bahia. Para isso, foram coletadas amostras de solo de seis áreas cultivadas e uma da Caatinga. Posteriormente, com estes solos um experimento para captura de rizóbios com três genótipos de feijão-caupi como planta-isca em casa de vegetação do Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS) da Universidade do Estado da Bahia, UNEB. As bactérias foram isoladas, caracterizadas em meio YMA, estocadas e, em seguida, submetidos a agrupamentos para análise de similaridade. Aquelas com características típicas de *Bradyrhizobium* foram amplificadas para o gene simbiótico nodC e para a região intergênica IGS (16S-23S rRNA Intergenic space region). O fragmento do IGS de cada isolado foi digerido por três enzimas de restrição e os perfis formados, agrupados pelo coeficiente de Dice. Dos grupos do IGS-RFLP, 27 isolados foram selecionados para sequenciamento e também foram avaliados com relação a eficiência simbiótica e diferentes mecanismos de produção de crescimento vegetal e tolerância a diferentes concentrações de NaCl e pH. Cerca de 60% dos 460 isolados caracterizados apresentaram crescimento lento com reação alcalina ou neutra de pH do meio YMA e produção de muito muco. Dos 251 isolados de Canapu ligeiro e BRS Pujante, 161 amplificaram o fragmento do gene nodC. Os isolados positivos para amplificação do nodC tiveram o fragmento da região intergênica (IGS) amplificado e, em seguida, esse fragmento foi digerido pelas enzimas *HaeIII*, *AluI* e *HindIII*. Considerando a similaridade de 85%, 33 grupos foram formados pelos perfis de IGS. A análise das sequências parciais do IGS agruparam os isolados em dois gêneros *Bradyrhizobium* e *Microvirga*, sendo 26 e 1 representantes, respectivamente. As melhores correspondências dos isolados foram identificadas como dos clados *B. japonicum* e *B. elkanii*, havendo o predomínio do clado *B.*

*japonicum*. Os isolados não apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio ou de produzir sideróforos, no entanto, foram capazes de tolerar diferentes concentrações de NaCl e pH ácido e alcalino. Além disso, foi possível constatar a produção de biofilme sob condições de estresse. Dos mecanismos de crescimento foi possível constatar a produção de compostos indólicos e eficiência na fixação de nitrogênio. Os isolados testados em casa de vegetação sob condições assépticas em associação com feijão-caupi apresentaram resultados satisfatórios, semelhantes aos encontrados pela estirpe referência recomendada como inoculante para feijão-caupi. Desse modo, isolados oriundos de áreas agrícolas e Caatinga de Juazeiro-BA apresentaram grande diversidade, similaridade com estirpes de *Bradyrhizobium*, eficiência simbiótica e características que podem conferir vantagens competitivas sob condições de estresse abiótico.

**Palavras-chave:** Fixação Biológica de Nitrogênio; Rizóbios; *Bradyrhizobium*; Submédio do Vale do São Francisco

# **POLYPHASE CHARACTERIZATION OF ISOLATED BACTERIA OF COWPEA NODULES IN SOILS UNDER DIFFERENT AGRICULTURAL USES OF BAHIA SEMI-ÁRID**

## **ABSTRACT**

Agriculture is one of the most important sectors of the economy in Brazil, and it has great prominence in the semi-arid Bahia, more precisely in the integrated development region of Juazeiro (BA) - Petrolina (PE). The varied uses of land for agriculture in this region have a direct effect on the soil microbiota. Thus, this work had the objective of investigating the diversity of diazotrophic bacteria that nodulate cowpea in agricultural soils with different uses and Caatinga area of the municipality of Juazeiro, Bahia. For this, soil samples were collected from six cultivated areas and one from Caatinga. Later, with these soils an experiment to capture rhizobia with three cowpea genotypes as a host plant in a greenhouse of the Department of Technology and Social Sciences (DTCS) of the State University of Bahia, UNEB. The bacteria were isolated, characterized in YMA medium, stored and then subjected to clusters for similarity analysis. Those with typical *Bradyrhizobium* characteristics were amplified for the symbiont *nodC* gene and for the IGS (16S-23S rRNA Intergenic space region) intergenic region. The IGS fragment from each isolate was digested by three restriction enzymes and the profiles formed, grouped by the Dice coefficient. From the IGS-RFLP groups, 27 isolates were selected for sequencing and were also evaluated for symbiotic efficiency, different mechanisms of plant growth, and tolerance to different concentrations of NaCl and pH rate. About 60% of the 460 isolates showed slow growth with alkaline or neutral reaction in the YMA medium, and very mucus production. Of the 251 isolates from Canapu Ligieiro and BRS Pujante, 161 amplified the *nodC* gene fragment. Positive isolates for *nodC* amplification had the IGS fragment amplified, and then the enzymes *HaeIII*, *AluI*, and *HindIII* digested this fragment. Considering the similarity of 85%, 33 groups were formed by the IGS profiles. The analysis of the partial sequences of the IGS grouped the isolates into two genera *Bradyrhizobium* and *Microvirga*, being 26 and 1 representatives, respectively. The best correspondences of the isolates were identified as the clades *B. japonicum* and *B. elkanii*, with the predominance of the clade *B. japonicum*. The isolates were not able to solubilize calcium phosphate or to produce siderophores, however, they were able to tolerate different concentrations of NaCl and acidic and alkaline pH. In addition, it was possible to verify

biofilm production under stress conditions. From the mechanisms of growth, it was possible to verify the production of indole compounds and efficiency in nitrogen fixation. The isolates tested under greenhouse and aseptic conditions in association with cowpea presented satisfactory results, similar to those found by the reference strain recommended as inoculant for cowpea. Thus, isolates from the agricultural and Caatinga area of Juazeiro-BA presented great diversity, similarity with *Bradyrhizobium* strains, symbiotic efficiency and characteristics that can confer competitive advantages under conditions of abiotic stress.

**Keywords:** Biological Nitrogen Fixation; Rhizobia; *Bradyrhizobium*; Submedium of the São Francisco Valley

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
2.1 Sistemas agrícolas predominantes no semiárido brasileiro	14
2.2 Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas	15
2.3 A cultura do feijão-caupi	16
2.4 Diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em diferentes usos de terra	17
2.5 Fatores que afetam a fixação biológica de nitrogênio	19
2.6 Formação de biofilme	20
2.7 Caracterização genética com base em técnicas moleculares	21
<b>3. MATERIAL e MÉTODOS</b>	23
3.1 Amostragem e descrição das áreas	23
3.2 Experimento para obtenção de rizóbios utilizando três genótipos de feijão-caupi com planta-isca	24
3.3 Isolamento, purificação e caracterização cultural dos isolados bacterianos	26
3.4 Extração de DNA	26
3.5 Amplificação nodC e IGS (Intergenic space region)	26
3.6 Sequenciamento parcial da região IGS 16S-23S rRNA	27
3.7 Mecanismos de Promoção do Crescimento	28
3.7.1 Produção de compostos indólicos	28
3.7.2 Solubilização de fosfato de cálcio	29
3.7.3 Produção de sideróforos	29
3.8 Tolerância a NaCl e pH e formação de biofilme	29
3.9 Experimento de autenticação e eficiência simbiótica	31
<b>4. RESULTADOS e DISCUSSÃO</b>	33
<b>5. CONCLUSÕES</b>	64
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	65

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Áreas de coleta das amostras de solo no município Juazeiro Bahia para estudo de diversidade sob diferentes usos de terra. (a) MC; (b) C-ceb; (c) AGROE; (d) UNEB; (e) SEQ-N; (f) SEQ; e (g) CAAT.

**Figura 2:** Metodologia para avaliação de formação de biofilme de isolados de solos de Juazeiro-BA sob condições de estresse *in vitro*. Bactérias crescidas em meio YM com diferentes concentrações de NaCl e pH em (a) placas de ELISA após a primeira série de lavagem; (b) adição de violeta genciana a 0,25%; (c) segunda série de lavagens para retirada da violeta genciana; (d) e (e) adição da solução álcool-acetona para quantificação da formação de biofilme em (f) espectrofotômetro.

**Figura 3:** Crescimento em meio de cultivo YMA de isolados de rizóbios oriundos de nódulos de feijão-caupi, cultivado em sete amostras de solos de áreas agrícolas do município de Juazeiro-BA. Manga com feijão-caupi na entrelinha (área 1), Rotação de cultura feijão-caupi com cebola (área 2), cultivo agroecológico - IRPPA (área 3), área experimental UNEB (área 4), cultivo de feijão-caupi com adubação mineral de N (área 5), cultivo de feijão-caupi sem adubação mineral de N (área 6) e Caatinga (área 7).

**Figura 4:** Alteração do pH em meio de cultivo YMA de isolados de rizóbio de nódulos de Feijão-Caupi, cultivado em sete amostras de solos agrícolas do município de Juazeiro-BA. Manga com feijão-caupi na entrelinha (área 1), Rotação de cultura feijão-caupi com cebola (área 2), cultivo agroecológico - IRPPA (área 3), área experimental UNEB (área 4), cultivo de feijão-caupi com adubação mineral de N (área 5), cultivo de feijão-caupi sem adubação mineral de N (área 6) e Caatinga (área 7).

**Figura 5:** Produção de muco produzido pelos isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi cultivado em sete amostras de solos de áreas agrícolas do município de Juazeiro-BA. Manga com feijão-caupi na entrelinha (área 1), Rotação de cultura feijão-caupi com cebola (área 2), cultivo agroecológico - IRPPA (área 3), área experimental UNEB (área 4), cultivo de feijão-caupi com adubação mineral de N (área 5), cultivo de feijão-caupi sem adubação mineral de N (área 6) e Caatinga (área 7).

**Figura 6:** Tamanho de colônia formadas por isolados obtidos de nódulos de BRS Acauã, Canapu ligeiro e BRS Pujante cultivado em sete amostras de solos de áreas agrícolas do município de Juazeiro-BA. Manga com feijão-caupi na entrelinha (área 1), Rotação de cultura feijão-caupi com cebola (área 2), cultivo agroecológico - IRPPA (área 3), área experimental UNEB (área 4), cultivo de feijão-caupi com adubação mineral de N (área 5), cultivo de feijão-caupi sem adubação mineral de N (área 6) e Caatinga (área 7).

**Figura 7:** Dendrograma de similaridade de características fenotípicas (tempo de crescimento, reação de pH e produção de exopolissacarídeos) dos isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi cultivado em 4 diferentes usos de terra sob irrigação de Juazeiro-BA, 2017. Área de manga com feijão na entrelinha (A), área de rotação de cultivo com feijão-caupi e cebola (B), área agroecológica do IRPPA (C), e área experimental da UNEB (D).

**Figura 8:** Dendrograma de similaridade de características fenotípicas (tempo de crescimento, reação de pH e produção de exopolissacarídeos) dos isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi cultivado em 3 usos de terra em sistemas dependente de chuva de Juazeiro-BA, 2017. Área de sequeiro com adubação nitrogenada (A), área de sequeiro sem adubação nitrogenada (B), e área de Caatinga (C).

**Figura 9:** Amplificação do fragmento de gene *NodC* com os primers *nodCF* e *nodCR* de representantes de isolados de Canapu ligeiro. O marcador molecular 100pb DNA ladder (MM), duas referências BR1436 (R+), (R-) e 15 isolados.

**Figura 10:** Amplificação do fragmento IGS (região intergênica do 16S-23S rRNA) de representantes de isolados de nódulos de BRS Pujante, Marcador molecular 100pb DNA ladder (MM) e reação controle. (B).

**Figura 11:** Imagem de gel de agarose à 1 % após eletroforese de amostras da análise PCR-RFLP de representantes de isolados de nódulos de Canapu ligeiro e BRS Pujante das sete diferentes áreas estudadas de Juazeiro-Ba. *AluI* (A), *HaeIII* (B), *HindIII* (C), marcador DNA ladder de 100pb.

**Figura 12:** Dendrograma gerado a partir do padrão de bandas da restrição de IGS (16S-23S rRNA) RFLP digerido com as enzimas de restrição *HaeIII*, *HindIII* e *AluI* de isolados de BRS Pujante e Canapu Ligeiro, obtidos de áreas com diferentes usos da terra em Juazeiro-BA. Os isolados destacados com a linha tracejada foram os selecionados para as demais análises.

**Figura 13.** Árvore filogenética de sequências do IGS de isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* Walp.), usando como método de agrupamento o Neighbour-Joining e bootstrap ajustado para 1000 réplicas com valores maiores que 50% apresentados.

**Figura 14:** Produção de ácido indolacético na presença de triptofano por isolados de nódulos de feijão-caupi em Juazeiro-BA.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Áreas de coleta das amostras de solo de Juazeiro Bahia para experimento de captura de bactérias diazotróficas de nódulos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) cultivar Acauã, Canapu ligeiro e BRS Pujante.

**Tabela 2:** Caracterização química de áreas sob diferentes usos em Juazeiro-BA.

**Tabela 3:** Valores médios de números de nódulos obtidos de três cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) sob diferentes sistemas de uso do solo.

**Tabela 4:** Identificação de 27 isolados bacterianos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* Walp) isolados de áreas com diferentes usos terra de Juazeiro BA por meio de comparações de sequências da região intergênica 16S-23S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados da NCBI GenBank.

**Tabela 5:** Tolerância de isolados de nódulos de feijão-caupi sob diferentes concentrações de NaCl e pH ácido e alcalino *in vitro*.

**Tabela 6:** Valores médio de produção de biofime por isolados de nódulos de feijão-caupi sob diferentes concentrações de NaCl e pH ácido e alcalino *in vitro*.

**Tabela 7:** Valores médios de massa total seca (MST), massa da parte aérea seca (MPAS), massa da raiz seca (MRS), massa de nódulos secos (MNS), número de nódulos (NN), teor de nitrogênio na parte aérea seca (TNPAS), acúmulo de nitrogênio na parte aérea seca (ANPAS) e eficiência nodular (EN) de experimento de eficiência simbiótica de isolados de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* Walp).

## 1- INTRODUÇÃO

O Submédio do Vale do São Francisco se destaca nacionalmente pelo seu potencial agrícola. As características climáticas da região aliadas ao uso da irrigação o tornaram, ao longo dos anos, referência na fruticultura nacional.

As altas temperaturas e incidência da radiação solar, características do clima semiárido, permitem o cultivo de uma vasta gama de culturas de interesse econômico, no Brasil e no exterior. Com sistemas de produção que requerem uso intensivo de conhecimentos e recursos tecnológicos, seja na viticultura ou em culturas mais rústicas, como o feijão-caupi, a possibilidade de produzir durante todo ano tem atraído cada vez mais produtores e empresários e, assim, aumentado as áreas plantadas. Atualmente, cerca de 120 mil hectares são irrigados e a região tem potencial para mais que dobrar essa área e chegar à marca de 360 mil hectares (Leão, Moutinho, 2014), além das áreas de agricultura familiar, com cultivo dependente de chuva e áreas de Caatinga.

A intensificação e ampliação das áreas de cultivos impactam diretamente nas características do solo, com consequentes modificações na sua microbiota. Os impactos atingem a diversidade das populações microbianas presentes na região rizosférica, bem como no papel desempenhado por essas populações (Moreira *et al.*, 2010). Associado à modificação da vegetação natural, os tipos de usos dos solos podem influenciar fortemente micro-organismos nativos com grande potencial tecnológico, como as bactérias fixadoras de nitrogênio coletivamente conhecidas como rizóbios.

Em leguminosas, esses micro-organismos são capazes de fixar nitrogênio atmosférico e transformar em formas prontamente disponíveis para as plantas. A relação de simbiose mutualística é estabelecida tanto em condições naturais quanto em sistemas de cultivo, havendo ou não uma relação de especificidade. Dada a contribuição dessas bactérias para o desenvolvimento e produção das leguminosas, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) atmosférico é tida como um dos processos de maior importância mediado por micro-organismos do solo.

A família das leguminosas está presente nos mais diversos sistemas e é considerada a terceira maior família ocupando o segundo lugar em importância econômica. Dentre os seus representantes está o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Esta cultura ganha destaque em regiões secas por ser alternativa ao plantio de culturas com maior demanda hídrica, por tolerar condições de altas temperaturas e de baixa disponibilidade de água. A capacidade de se associar com uma vasta gama de bactérias fixadoras de nitrogênio é outra característica de

grande importância para essa cultura. A adaptação do feijão-caupi a condições climáticas mais rigorosas e a baixa especificidade na associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico destacam a importância e o potencial tecnológico dessa cultura.

Muitos estudos têm buscado conhecer a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio nativas de regiões secas, a exemplo dos estudos realizados na região do Submédio do Vale do São Francisco. No entanto, esses estudos não têm contemplado os solos do estado da Bahia, mais especificamente do município de Juazeiro e, além disso, têm relatado a predominância de bactérias com características fenotípicas de um grupo com baixa eficiência simbiótica ou com incapacidade de renodular a hospedeira.

Dessa forma, considerando a influência dos diferentes usos de terra e o impacto desses sobre a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas (BFNL), esse trabalho visa conhecer a diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam feijão-caupi em solos agrícolas com diferentes usos e área de Caatinga do município de Juazeiro, Bahia.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Sistemas agrícolas predominantes no semiárido brasileiro

O semiárido brasileiro é caracterizado por apresentar precipitação pluviométrica média anual menor que 800 mm e risco de seca mais alto que 60% (Pereira Junior, 2007), ocupando uma área de aproximadamente 980.000 km<sup>2</sup> do território nacional, abrange municípios dos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Piauí, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais. Nessa região existe uma alta variabilidade de precipitação pluviométrica e de números de dias chuvosos (Da Silva *et al.*, 2011), tornando a água um fator limitante para o desenvolvimento dessa parte do Brasil.

A agricultura é o setor da economia que mais consome água no mundo, sendo, aproximadamente, 70% da água doce usada na irrigação (Connor *et al.*, 2017). A agricultura irrigada ganhou destaque no semiárido, na década de 60, com a chegada de projetos públicos desenvolvidos com intuito de levar desenvolvimento econômico e social para essa região (Oliveira, Souza, 2014).

A criação dos perímetros irrigados ficou sob responsabilidade do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), da Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco (CODEVASF) e da Superintendência para o Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE). Hoje, esses perímetros irrigam cerca de 220 mil hectares distribuídos em 79 projetos em 88 municípios segundo dados da CODEVASF.

Com a criação dos polos irrigados, a situação de pobreza e escassez de água e recursos antes associada à região semiárida do Brasil foi modificada, trazendo para o semiárido um quadro socioeconômico completamente novo (Buainain, Garcia, 2013). Estima-se que a cada 100 hectares de perímetro irrigado sob supervisão da Codevasf cerca de 120 empregos diretos e 170 indiretos são gerados e, de modo geral, os polos sob responsabilidade do DNOCS geraram, em 2012, 110.673 empregos diretos e indiretos (Buainain, Garcia, 2013).

Segundo Lima e Miranda (2001) a Região Integrada de Desenvolvimento (RIDE) Petrolina-Juazeiro é um dos exemplos mais relevantes do sucesso do uso da irrigação no semiárido. Nesse polo mais de 90% do que é produzido é exportado para Europa, Estados Unidos e Japão (Araújo, Silva, 2013). Além de ter reflexo no âmbito econômico, o uso ou a ausência da irrigação pode impactar o solo e, conseqüentemente, interferir nos processos biológicos e na comunidade microbiana do solo.

Grande parte da agricultura realizada no semiárido é familiar e, a princípio, os perímetros irrigados buscavam beneficiar tecnologicamente essas famílias. No entanto, ainda é muito comum encontrar famílias que vivem do cultivo de sequeiro com culturas tidas como

de subsistência, onde o mínimo de tecnologia é empregado. Para que possam produzir essas famílias utilizam de culturas com características de tolerância a seca e, como no caso das leguminosas, culturas que conseguem se associar a micro-organismos do solo.

## 2.2- Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas

Dos processos que ocorrem no solo, a fixação biológica de nitrogênio é um dos mais importantes e mais bem estudado (Freitas *et al.*, 2015). Realizado a partir da associação de micro-organismos procariotos, conhecidos comumente como rizóbios e plantas da família das leguminosas, esse processo é responsável pela fixação de aproximadamente  $21 \times 10^9$  Kg de nitrogênio anualmente (Herridge *et al.*, 2008).

O nitrogênio está distribuído em grandes proporções na atmosfera, mas em uma forma indisponível. O aporte desse nitrogênio é feito por bactérias diazotróficas, sendo possível graças à presença de uma enzima chamada nitrogenase. Essa enzima é capaz de fixar o nitrogênio atmosférico e reduzi-lo a formas amoniacais assimiláveis pelas plantas.

Nos nódulos radiculares formados com a infecção das bactérias nas raízes das leguminosas, a nitrogenase pode reduzir o nitrogênio não reativo, devido à regulação do  $O_2$ . Essa regulação é feita pela leghemoglobina, que confere uma coloração avermelhada ao interior dos nódulos, sinal indicativo de que há a fixação do nitrogênio pelas bactérias.

Atualmente, diversos trabalhos são realizados visando conhecer a diversidade dessas bactérias (Leite *et al.*, 2009, Elboutahiri *et al.*, 2015, Wielbo *et al.*, 2015) e selecionar estirpes que sejam competitivas e eficientes como inoculantes (Soares, 2004), principalmente para serem usadas em leguminosas produtoras de grãos.

No Brasil, algumas leguminosas produtoras de grãos têm grande destaque quanto à eficiência dessa associação. A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é o maior exemplo de sucesso da associação simbiótica entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. Em estudo sobre a influência da fixação biológica de nitrogênio no balanço do nitrogênio em soja, Alves *et al.*, (2006) constataram, utilizando o método de plantio direto e inoculação de *Bradyrhizobium ssp*, que as porcentagens de nitrogênio nas plantas de soja foram superiores a 80% de N, variando de 176 a 193 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio nos dois anos de safra 2000/2001 e 2001/2002. Mais recentemente, Santos Neto *et al.*, (2013), estudando o efeito de tratamentos com ou sem inoculação na produtividade de soja nas safras de 2007/2008, relataram que houve uma maior produtividade quando a soja foi inoculada do que quando não houve inoculação, sendo 2.843,2 e 2.563,8 kg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

O efeito da inoculação de rizóbios sobre a produtividade de grãos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) tem um grande destaque na literatura e é objeto de estudo de

muitos trabalhos (Martins *et al.*, 2003; Zilli *et al.*, 2006, Almeida *et al.*, 2010, Alcantara *et al.*, 2014; Marinho *et al.*, 2014).

Avaliando o comportamento de duas cultivares de feijão-caupi inoculados com estirpes de rizóbios pré-selecionadas, Costa *et al.* (2014) identificaram que as cultivares de feijão-caupi respondem diferentemente dependendo do inoculante usado e que cada cultivar possui diferentes respostas à associação com as bactérias fixadoras de N. A nodulação é uma característica que também pode variar de cultivar a cultivar de feijão-caupi. Leite *et al.*, (2009) verificaram grande variação na nodulação das cultivares BRS Pujante e Sempre Verde, sendo em média 96 e 41 nódulos, respectivamente. Já avaliando o desempenho de estirpes recomendadas de rizóbios como inoculantes de feijão-caupi em solos de Roraima, Zilli *et al.*, (2009) constataram que as estirpes BR3267 e BR3262 apresentam respostas mais significativas à FBN na variável produção de matéria seca do que em outro parâmetro.

### **2.3- A cultura do feijão-caupi**

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também conhecido como feijão-de-corda ou feijão macassar, de provável origem africana, é uma leguminosa comestível dotada de alto conteúdo proteico, com boa adaptabilidade e com boa capacidade de fixar nitrogênio, sendo, ainda, pouco exigente em fertilidade do solo. É uma espécie vegetal que se destaca como cultura adaptada e de importância socioeconômica para pequenos e médios agricultores (Freire Filho *et al.*, 2011). Esta cultura possui atributos desejáveis como alto poder energético, conteúdo de fibras alimentares e de minerais, tais como: ferro, zinco, potássio, fósforo e magnésio.

No Brasil, feijão-caupi está se expandindo das regiões Norte, Nordeste e Centro oeste para a região dos cerrados, seja como cultura principal ou como safrinha após as culturas de soja e arroz. (Freire filho *et al.*, 2011). Devido a sua rusticidade e alta variabilidade genética adapta-se bem a diferentes condições ambientais, apresentando desenvolvimento satisfatório em condições de baixa fertilidade do solo e conseguindo produzir, em anos secos, mais do que outras espécies vegetais como o sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e o milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), culturas consideradas resistentes à seca (Fortaleza e Leite, 2004). Esta cultura é produzida principalmente por pequenos agricultores com baixo aparato tecnológico.

O período crítico da cultura do feijão-caupi, provocado pelo estresse hídrico, restringe-se a uma fase relativamente curta entre a época de floração e o início da maturação (enchimento dos grãos). Mesmo em condições de baixa disponibilidade hídrica no solo e

intensa demanda evaporativa, a cultura é capaz de tolerar a seca por meio de mecanismos que evitam a perda de água. Essa característica faz do feijão-caupi uma das leguminosas mais importantes para regiões com escassez ou ausência de chuvas (Carvalho *et al.*, 2017).

Uma outra característica bem marcante dessa leguminosa é a capacidade de se associar com bactérias fixadoras de nitrogênio. O feijão-caupi nodula e estabelece simbiose com diversas espécies de bactérias nodulíferas de leguminosas (BNL) através do processo de FBN (Costa *et al.*, 2011). E é uma cultura muito usada em pesquisas realizadas com inoculação devido a sua baixa especificidade (Moreira; Siqueira, 2006).

Apesar da baixa especificidade, essa associação é relatada, preferencialmente, com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Zhang *et al.*, 2008; Pule-Meulenberg *et al.*, 2010). Podendo, também, ocorrer com o gênero *Rhizobium*, demonstrando a grande diversidade e adaptabilidade de bactérias passíveis de estabelecer simbiose (Chidebe; Jaiswal; Dakota, 2017).

Lacerda *et al.* (2004) relatam que o feijão-caupi quando em associação com as cepas de BDS, INPA 03-11 b (BR 3301) e UFLA 03-84 (BR 3302) contribuem de forma significativa para o aumento no rendimento de grãos do feijão-caupi cv BR14 Mulato em relação às plantas não inoculadas, sem N mineral e inoculada com inoculante recomendado (BR 2001). No entanto, o efeito da inoculação do feijão-caupi com bactérias fixadoras de N pode variar com a cultivar usada (Marinho *et al.*, 2014).

#### **2.4- Diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em diferentes usos de terra**

O uso da agricultura intensiva tem acarretado inúmeros danos ao ambiente e apresentado impactos na fauna e flora nativas, água e solo. Esses impactos associados aos diferentes tipos de manejo, elevam o nível de estresse sobre as plantas, o que terá influência direta na microbiota do solo, característica que a torna um indicador sensível da perda de qualidade dos ecossistemas (Xavier *et al.*, 2006).

O solo é considerado um organismo vivo e complexo, sendo o meio com maior diversidade microbiológica entre os habitats terrestres (Moreira; Siqueira, 2006). Os efeitos do tipo de uso, manejo e características físico-químicas do solo têm influência direta na diversidade da microbiota da área explorada, o que pode ser expresso nas características e diversidade das populações microbianas presente na região rizosférica, bem como, no papel desempenhado por essas populações no solo.

A composição das comunidades microbianas de solos da Amazônia está sob influência do tipo de uso das terras. Suas áreas agrícolas e pastos apresentam grande diversidade taxonômica e funcional, além de apresentarem maior riqueza de gêneros capazes

de realizar funções específicas do que solos de florestas. Ademais, o histórico de cultivos desses solos tem relação direta com a diversidade da comunidade bacteriana encontrada (Mendes *et al.*, 2015).

A exemplo do dito anteriormente, Ormeño-Orrillo *et al.* (2012) estudando a diversidade da comunidade de *Bradyrhizobium* na floresta tropical Los Tuxtlas, relacionaram a maior diversidade de *Bradyrhizobium* em florestas secundárias a áreas de cultivos de leguminosas e de pastagem.

Solos do Cerrado com plantio direto e área de vegetação nativa apresentam maior diversidade microbiológica, sendo a comunidade bacteriana dos solos estudados modificada sob influência do uso do solo, indicando que os sistemas agrícolas podem interferir nas mudanças dentro dos nichos de micro-organismos (Peixoto *et al.*, 2010).

Estudo da relação entre os fatores do solo e a comunidade bacteriana do solo dos seis mais representativos usos da terra na Holanda, mostrou maior abundância bacteriana em solos da floresta temperada quando comparada a solos da floresta de pinus de pH baixo e alta relação C/N, o que permite admitir que, além do tipo de solo, características dos solos podem também influenciar a comunidade microbiológica dos mesmos (Kunamae *et al.*, 2011).

As características do solo apresentam respostas sobre a comunidade bacteriana quando há a alteração da matéria orgânica e da concentração de H+Al nos solos sem intervenção antropogênica (Mendes *et al.*, 2015). Já em solos que apresentam distúrbios provocados pela intervenção humana, segundo os mesmos autores, as comunidades de bactérias estão diretamente relacionadas ao pH, quantidade de cobre e saturação de bases. A concentração de matéria orgânica, umidade e alto teor de cobertura do solo oferecem aos micro-organismos condições favoráveis para o estabelecimento dos mesmos, o que foi relatado por Paz-Lima *et al.* (2016) em solos de diferentes usos.

Ainda quanto a condições favoráveis, sistemas de cultivo (convencional ou orgânico) podem influenciar a diversidade dos micro-organismos mais do que a cultura usada. A diversidade bacteriana e fúngica são, em média, 10 e 13% diferentes quanto ao sistema de cultivo avaliado, respectivamente, enquanto que para a influência dos diferentes tipos de culturas usadas bactérias e fungos foram 4 e 11% diferentes, respectivamente (Hartmann *et al.*, 2015).

Faoro *et al.* (2010), estudando a diversidade de solos da floresta Atlântica no Paraná, Brasil, sobre diferentes altitudes, relataram a existência da maior diversidade de microrganismos em áreas a 900-800 m acima do mar. Segundo esses autores, a maior diversidade encontrada, ainda, pode ser relacionada com a relação  $Ca^+/Mg^+$  que tem efeito

positivo sobre o indicador de diversidade de até 13%, enquanto que altos níveis de  $Al^{3+}$ , fósforo e argila estão associados a menor diversidade, tendo efeito de redução no indicador de diversidade de 22, 20 e 17%, respectivamente.

A estrutura da comunidade bacteriana é, principalmente, influenciada pelo pH, relação C/N, fósforo e textura arenosa dos solos. O conteúdo de fósforo encontrado em solos da floresta de pinus tem mais influência na estrutura da comunidade bacteriana do que o tipo de uso do solo (Kunamae *et al.*, 2011).

Assim como Kunamae *et al.* (2011), Chau *et al.* (2011) também relataram uma relação positiva entre a diversidade bacteriana e a textura mais grossa do solo. Para Chau *et al.* (2011), a maior proporção de macroporos em solos arenosos pode favorecer a existência de microhabitats com diferentes concentrações de água nos filmes de água do solo. Segundo os autores, a variação no potencial matricial desses microhabitats permite uma maior riqueza de espécies bacterianas, uma vez que o conteúdo de água disponível pode ser um fator limitante ao desenvolvimento bacteriano.

## **2.5- Fatores que afetam a fixação biológica de nitrogênio**

Diversos fatores podem limitar a vida e eficiência dos micro-organismo no solo e com os rizóbios não seria diferente. Fatores edafoclimáticos, planta hospedeira, uso de fertilizantes nitrogenados entre outros, podem limitar o estabelecimento da simbiose e a fixação de nitrogênio por rizóbios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A relação entre micro-organismo e plantas tem um papel fundamental no tocante a resistências a fatores abióticos, aqui representados pelo pH e estresse salino (tolerância a NaCl).

Características do solo como o pH podem limitar ou favorecer o desenvolvimento dos micro-organismos. Esse parâmetro pode ter efeito na diversidade de espécies de um mesmo gênero como relatado por Htwe *et al.* (2015) ao estudarem a distribuição de rizóbios do gênero *Bradyrhizobium* em diferentes áreas de cultivo de soja no Myanmar (Asia). Os autores relataram que houve o predomínio de *B. elkanii* sobre *B. japonicum* e *B. liaoningense* em solos com pH 5,1 e 5,9, respectivamente. Além disso, constataram que o aumento do pH em 0,8 favoreceu de tal maneira que essas espécies foram capazes de crescer igualmente.

A distribuição de rizóbios em solos da China, segundo Cao *et al.*, (2014) em estudo avaliando a distribuição e diversidade de rizóbios, está diretamente relacionada ao pH das áreas estudadas. Os autores encontraram maior diversidade de rizóbios na ecorregião II, onde o pH variava de 4,97-7,22.

Algumas estratégias de sobrevivência podem estar relacionadas ao desenvolvimento dos rizóbios sob condições ácidas. Barberi *et al.* (2004) estudando o efeito do pH inicial no

crescimento de *Bradyrhizobium elkanii*, relataram que a produção de exopolissacarídeos pela estirpe estudada pode ser uma resposta aos efeitos da acidez sobre esse rizóbio. Nesse trabalho, a produção de exopolissacarídeos favoreceu o desenvolvimento das bactérias sob a condição de estresse inicial (pH 5,5).

Entretanto, para Ferreira *et al.* (2012) a capacidade dos rizóbios tolerarem pH ácido não está ligada a produção de compostos alcalinos como exopolissacarídeos, mas sim a fatores que protegem as células contra grandes concentrações extracelulares de prótons.

A presença de sais no solo pode ser por causas antropogênicas ou naturais. Em ambas as situações o efeito da salinidade nos solos será intensificado pelas condições ambientais, no caso de solos tropicais, onde a evapotranspiração é maior que a precipitação, é muito comum os relatos de solos salinos.

A salinidade dos solos pode afetar tanto as plantas quanto os micro-organismos a exemplo dos rizóbios. De acordo com Estévez *et al.* (2009), avaliando o comportamento dos fatores Nod produzidos pela estirpe CIAT899 (*R. tropici*) sob o aumento das concentrações de NaCl, a estirpe CIAT899 produz fatores Nod diferentes quando submetidas a condições de estresse salino ou condições controladas (sem NaCl). Ainda, a resposta a presença de sais está diretamente relacionada ao sódio e não ao cloro.

A concentração de 25 mM de NaCl provocou redução na fixação de nitrogênio em feijão comum quando inoculado com *R. tropici* (CIAT899) ou com duas estirpes nativas de solos salinos, *Rhizobium gallicum* (RhM11) e *Rhizobium tropici* (RhM14) (FAGHIRE *et al.*, 2011). Sharma *et al.* (2013) estudando a tolerância de rizóbios de *Lablab purpureus*, *Sesbania sesban* e *Cajanus cajan* de solos de Dubai ao estresse salino, relataram que as estirpes que apresentam maior tolerância ao estresse tinham sua origem em solos desérticos.

Fatores abióticos podem ter efeito tanto sobre a planta hospedeira quanto sobre os rizóbios. Dessa forma, o estudo da tolerância da simbiose rizóbio-leguminosa aos estresses ambientais é a melhor seleção de espécies adaptadas a essas condições (NISTE *et al.*, 2013).

## **2.6- Formação biofilme**

Biofilme é, de modo geral, uma matriz extracelular composta de polissacarídeos produzida por bactérias que pode estar aderido a superfícies bióticas ou abiótica (Rinaudi; Giordano, 2009). Esse complexo de polímeros secretados possui nutrientes e metabólitos absorvidos, produtos de lises celulares e, além disso, podem conter substâncias diretamente ligadas ao ambiente que os cerca (Sutherland, 2001). A formação e manutenção dos biofilmes

dependem diretamente da produção e qualidade dos exopolissacarídeos (Flemming; Wingender, 2010).

A formação de biofilme é um mecanismo adaptativo que contribui para a manutenção dos micro-organismos em condições adversas (Magdanova; Golyasnaya, 2013), fornecendo aos micro-organismos uma grande variedade de microambientes que facilitam o estabelecimento nas condições hostis (Sutherland, 2001).

A produção de biofilme pode ser encontrada em diversos tipos de micro-organismos, nas bactérias, quando de vida livre, eles protegem a população e regulam o número de indivíduos para manter uma quantidade mínima desses indivíduos para que as interações entre eles e as plantas ocorram (Danhorn; Fuqua, 2007). Para as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (rizóbios), a formação de biofilme tem interferências em uma das etapas mais críticas da simbiose, a formação de nódulos, influenciando na motilidade e na ligação das bactérias aos pelos radiculares (Taw *et al.*, 2015).

Lima *et al.* (2015) estudaram a formação de biofilmes por rizóbios em três meios de cultivos diferentes e relataram que a formação de biofilme é uma resposta ao meio de crescimento, indicando que a formação desse complexo multicelular pode variar de acordo com as condições impostas, no caso, o meio de cultivo. Além disso, a presença de biofilme possibilita a melhor adaptação dos rizóbios a condições de estresse bióticos a abióticos (Rinaudi; Giordano, 2009).

## **2.7- Caracterização genética com base em técnicas moleculares**

A identificação de um micro-organismo, geralmente, se inicia com a caracterização fenotípica dos indivíduos por fornecer informações básicas capazes de associar o micro-organismo de interesse a um indivíduo já conhecido. No entanto, diante de um cenário com tantas espécies novas, estudos de diversidade com apenas características morfo-culturais não são suficientes para reconhecer as diferenças entre as espécies.

Assim, a alternativa mais eficiente para estudos de diversidade é o uso de técnicas da biologia molecular, estas são usadas para a caracterização da diversidade e identificação de espécies de bactérias em simbiose com leguminosas.

A PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma técnica de alta precisão que visa multiplicar em milhares de cópias uma sequência específica de DNA (Garibyan, Avashia, 2013), esta ferramenta tem possibilitado mudanças drásticas desde o campo da ciência básica até diagnósticos na medicina (Ishmael, Stellato 2008). A partir da PCR surgiram outras técnicas de *fingerprint* para identificação de linhagens de bactérias em estudo são elas SSR (Simple

Sequence Repeats), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e outras.

Os marcadores gerados pela análise de Polimorfismos de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism), baseiam-se na amplificação de subconjuntos de fragmentos de restrição genômica usando PCR. O DNA é cortado por enzimas de restrição e adaptadores de dupla-hélice são ligados às extremidades dos fragmentos do DNA para gerar o DNA molde para a amplificação. Uma variação a essa técnica é o Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP – restriction fragment length polymorphism) que indica a diferença no tamanho dos fragmentos de restrição gerados (Jarcho, 2001).

A escolha do produto da PCR usado para proceder o RFLP deve ser feita de modo a considerar a coleção bacteriana em estudo. Para avaliar a diversidade entre um grupo muito semelhante o ideal é usar a região do espaço intergênico (IGS) 16S-23S rDNA, que por apresentar alta variabilidade pode fornecer informações capazes de diferenciar os indivíduos. Segundo Jaiswal *et al.*, (2017), o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição gerado do espaço intergênico (RFLP-IGS) fornece características suficientes para diferenciar filogeneticamente os rizóbios.

Outra abordagem frequentemente usada em estudos de diversidade é o uso de iniciadores específicos para a amplificação de genes identificar bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas como o gene simbiótico *nodC*, que está presente em todos os rizóbios (Laguerre *et al.*, 2001). Além disso, é considerado como o gene de nodulação com características mais conservadas (Sarita *et al.*, 2005). O gene *nodC* atua na biossíntese dos fatores de nodulação (Laguerre *et al.*, 2001) que são determinantes para a simbiose rizóbios-leguminosas. A amplificação desse gene é usada para confirmar a capacidade de nodular e de selecionar isolados obtidos em estudos de diversidade (Mothapo; Grosman; Maul, 2013).

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em seis áreas agrícolas e uma da Caatinga no município de Juazeiro- Bahia (Tabela 1). Essa região é de clima semiárido, caracterizado como do tipo Bswb segundo Koppen. O experimento de planta-isca e isolamento foram realizados no Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS) da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), campus III, Juazeiro-BA

**Tabela 1:** Áreas de coleta das amostras de solo de áreas agrícolas e Caatinga em Juazeiro Bahia para experimento de obtenção de bactérias de nódulos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) genótipos BRS Acauã, Canapu ligeiro e BRS Pujante.

Amostras	Localização	Características	Coordenadas
Amostra de solo 1	Área de perímetro irrigado Mandacaru, Juazeiro -Bahia	Feijão- caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) irrigado e cultivado na entrelinha de Manga ( <i>Mangifera indica</i> L.) em sistema usado por mais de 10 anos. Classificação textural: Franco- Argilo- Arenoso	S 09°23'12.7" W 040°24'39.3" Elevação: 381 m
Amostra de solo 2	Área de perímetro irrigado Mandacaru Juazeiro-Bahia	Feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) irrigado e cultivado em rotação de cultura com Melão ( <i>Cucumis melo</i> L.) e Cebola ( <i>Allium cepa</i> L.) há 20 anos. Classificação textural: Argila	S 09°23'40.2" W 040°25'16.1" Elevação: 377 m
Amostra de solo 3	Área do Instituto Regional da Pequena Agropecuária Apropriada (IRPAA), Juazeiro- BA	Mucuna ( <i>Mucuna pruriens</i> L.) irrigada e cultivada em rotação com Crotalaria ( <i>Crotalaria juncea</i> L.), havendo a incorporação de ambos os cultivos na área. Uso de irrigação por aspersão. Classificação textural: Franco-Argilo- Arenoso	S 09°26'43.6" W 040°25'28.2" Elevação: 369 m
Amostra de solo 4	Área de cultivo experimental do Departamento de Ciências Sociais (DTCS), campus III da Universidade do Estado da Bahia (UNEB)	Feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) cultivado em área experimental da Universidade do Estado da Bahia. Uso de irrigação por gotejamento. Classificação textural: Areia-Franca.	S 09°25'4,75" W 40°29'6,68" Elevação: 365 m
Amostra de solo 5	Área de sequeiro de agricultura familiar, Juazeiro- Bahia	Feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) cultivado em área de sequeiro adubado com ureia. Classificação textural: Franco-Arenoso	S 09°29'40.9" W 040°28'53.9" Elevação: 393 m
Amostra de solo 6	Área de sequeiro de agricultura familiar, Juazeiro- Bahia	Feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) cultivado em área de sequeiro sem adubação. Classificação textural: Franco-Arenoso	S 09°30'19.3" W 040°29'34.4" Elevação: 390 m
Amostra de solo 7	Área de vegetação nativa da Caatinga, Juazeiro- Bahia	Área de Caatinga com predomínio de cactos (Cactaceae), jurema-preta ( <i>Mimosa tenuiflora</i> ) e caruá ( <i>Neoglasiovia variegata</i> ). Classificação textural: Franco-Arenoso	S 09°33'05.0" W 040°26'30.3" Elevação: 402 m

#### 3.1- Amostragem e descrição das áreas

As coletas foram realizadas em sete áreas com diferentes usos e todas sob cultivo de leguminosas como descrito na Tabela 1, sendo a amostra de solo 1 de área com cultivo de feijão-caupi na entrelinha de manga (MC); amostra de solo 2 com feijão-caupi em rotação de cultivo com cebola (C-ceb); amostra 3 de cultivo agroecológico do IRPAA (AGROE); com cultivo de mucuna, amostra 4 de área experimental da UNEB (UNEB) cultivada com feijão-



**Figura 1:** Áreas de coleta das amostras de solo no município Juazeiro Bahia para estudo de diversidade sob diferentes usos de terra. (a) MC; (b) C-ceb; (c) AGROE; (d) UNEB; (e) SEQ-N; (f) SEQ; e (g) CAAT.

caupi por no mínimo quadro anos; amostra 5 de feijão-caupi cultivado em sequeiro com adubação nitrogenada (SEQ-N); amostra 6 de feijão-caupi cultivado em sequeiro sem adubação nitrogenada (SEQ) e amostra 7 de vegetação nativa de caatinga (CAAT). Figura 1

Na coleta, para cada área estudada, foram coletadas 10 amostras simples dos solos próximos ao feijão-caupi, ou das espécies nativas, no caso da área de Caatinga, na profundidade de 0-20 cm. As 10 amostras simples foram misturadas para compor uma única amostra composta de cada área. As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos de ráfia com capacidade para 50 kg e transportados para o Laboratório de Microbiologia do Solo do DTCS/UNEB.

### **3.2- Experimento para obtenção de rizóbios utilizando três genótipos de feijão-caupi com planta-isca**

O experimento de obtenção de rizóbio foi realizado em condição de casa de vegetação com sombreamento de 50% no Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS) da UNEB. Juazeiro-BA.

As amostras de solos foram destorroadas manualmente, quando necessário, e, então, distribuídas em vasos com capacidade para 3 kg. A leguminosa escolhida como planta-isca foram três genótipos de Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) das variedades BRS Pujante e BRS Acauã, que foram melhoradas pela Embrapa para as condições de cultivo do Semiárido (Santos, 2011), além da “landrace” Canapu ligeiro, amplamente utilizada pelos pequenos produtores da região Nordeste. O experimento de plantas-isca foi implantado com três repetições para cada combinação genótipo (3) x solo (7), totalizando 63 vasos. Antes da semeadura, as sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool (70% por 30 segundos) e hipoclorito de sódio comercial (2,5 % v/v por 2 minutos) e, seguida, por 10 lavagens sucessivas com água destilada estéril (ADE) (Vincent, 1970).

Foram semeadas cinco sementes por vaso e quatro dias após a emergência as plântulas foram desbastadas, permanecendo apenas duas por vaso. Os vasos foram distribuídos em arranjo experimental inteiramente casualizado sobre uma mesa de aproximadamente 5 metros. As plantas foram irrigadas com água estéril de acordo com a necessidade, até duas vezes por dia.

A coleta foi realizada aos 35 dias após emergência, as raízes foram cuidadosamente separadas do solo rizosférico, lavadas em água corrente e os nódulos foram destacados, isolados e armazenados em potes de vidro contendo sílica gel para posterior reidratação, desinfestação superficial e isolamento.

Para análise da fertilidade do solo, uma amostra homogênea de terra fina seca ao ar (TFSA), aproximadamente 200 g de cada amostra de solo, foi analisada no Laboratório de Solos e Tecidos Vegetais da Embrapa Semiárido (Claessen, 1997). Os resultados desta análise estão apresentados na tabela 2. Para este experimento inicial, a variável analisada foi número de nódulos. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, usando o programa estatístico SISVAR,

**Tabela 2:** Caracterização química de amostras de solos de áreas sob diferentes usos e Caatinga em Juazeiro-BA

	C.E.	pH	C	N	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	
Amostras de solo	mS.cm <sup>-1</sup>	-	g.kg <sup>-1</sup>		mg.dm <sup>-3</sup>	-----Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> -----									%
1- Manga-feijão-caupi	0,48	5,7	8,0	0,85	80,50	0,41	0,09	6,8	2,8	0,00	3,6	10,1	13,7	73,7	

2- Rotação feijão-caupi – cebola	1,12	7,7	9,0	0,78	130,84	0,58	0,31	21,9	3,3	0,00	0,0	26,1	26,1	100,0
3- Cultivo agroecológico IRPPA	0,58	7,9	15,4	1,11	120,61	1,21	0,31	13,1	5,3	0,00	0,0	19,9	19,9	100,0
4- UNEB área experimental	0,92	7,1	3,7	0,40	88,49	0,47	0,06	3,0	3,1	0,00	0,0	6,6	6,6	100,0
5 - Sequeiro com Fertilizante (N)	0,33	6,9	4,0	0,86	15,47	0,25	0,02	1,9	2,1	0,00	0,2	4,3	4,5	94,7
6 - Sequeiro sem fertilizante (N)	1,98	5,4	4,1	0,26	10,14	0,28	0,02	2,0	2,5	0,05	1,0	4,8	5,8	83,3
7 - Caatinga	0,56	5,3	7,2	0,6	7,48	0,31	0,05	3,1	1,9	0,05	2,9	5,4	8,2	65,1

### 3.3- Isolamento, purificação e caracterização cultural dos isolados bacterianos

O isolamento foi realizado em 10 dos nódulos coletados em cada vaso, totalizando 630 nódulos inoculados em meio de cultura. Os nódulos foram reidratados em ADE e desinfestados superficialmente [30 segundos em álcool 70%, 5 minutos em hipoclorito de sódio analítico (4-6% v/v) ] e lavados 10 vezes em ADE. Com o auxílio de uma pinça esterilizada por flambagem, os nódulos foram macerados em placas de Petri contendo meio YMA (manitol, extrato de levedura e agar) com vermelho congo como indicador (Vincent, 1970). Após o aparecimento das colônias, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura YMA com azul de bromotimol como indicador de reação de pH e repicados sucessivamente até obtenção de culturas puras.

Com a obtenção das colônias puras, os isolados foram caracterizados com base no tempo de crescimento de colônias isoladas (rápida: até 3 dias; intermediária: 4 a 5 dias; e lenta: acima de 6 dias), tamanho (menor que 1 mm; ou puntiforme, 1 a 2 mm; e maior que 2 mm), cor (branca, creme ou amarela), forma (circular e irregular) e aparência das colônias (homogênea ou heterogênea), alteração da reação de pH no meio de cultura YMA contendo azul de bromotimol (ácido, neutro ou alcalino), quantidade de muco (pouco, médio ou muito), tipo de muco (viscoso, floculoso ou butírico) e elasticidade (elástico ou não elástico).

Após a caracterização, os isolados foram preservados em microtubos tipo Eppendorffs contendo 1 mL de meio de cultura YM suplementado com 25% (v/v) de glicerol em ultrafreezer a -80°C, e depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA).

Devido à grande similaridade morfo-cultural dos isolados obtidos das variedades BRS Acaua e BRS Pujante, para as demais análises, a BRS Acaua não foi considerada. Apenas os isolados obtidos dos genótipos BRS Pujante e Canapu Ligeiro foram avaliados.

### 3.4- Extração de DNA

As bactérias estocadas foram crescidas em meio de cultivo YMA contendo corante azul de bromotimol, para confirmar a caracterização e, em seguida, as colônias formadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultivo YM e submetidas a agitação em mesa de agitação constante a 120 rotações por minuto (rpm) até turvação do meio. O DNA foi extraído usando o kit de extração de DNA genômico bacteriano Wizard® Genomic DNA Purification da Promega, seguindo as instruções do fabricante.

### 3.5- Amplificação *nodC* e IGS (Intergenic space region)

Para amplificação do gene *nodC* para 251 isolados com características típicas de *Bradyrhizobium*, foi realizada reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) com volume final de 10 µL, contendo 1X buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 0,75 uM dos seguintes primers NodCF 5'-AYGTHGTYGAYGACGGTTC-3' e NodCI(R) 5'-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3' (Laguerre *et al.*, 2001), 1 U taq DNA polimerase. As amostras de DNA foram adicionadas ao mix e, então levadas ao termociclador. O produto da PCR foi corado com GelRed (Biotium) na proporção de 1:2 e aplicado ao gel de agarose a 1% na presença de TBE 0,5X em eletroforese com voltagem de 150 V por 40 minutos.

A amplificação da região intergênica 16S-23S rRNA (16S-23S rRNA intergenic spacer region - IGS) foi realizada em 146 isolados seguindo a metodologia de Tampakaki *et al.*, (2017) com adaptações, com volume final de 26 µL, contendo 1X buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM dNTP, 0,20 uM de cada primer IGS-F1-T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCG-3' (forward) e IGSbrd-R1-SP6 5'-GATTTAGGTGACACTATAGGCTTCTTCGCAGCTCCCCACG-3' (reverse) e 1 U taq DNA polimerase. As amostras de DNA foram acrescidas ao mix e, então, levadas ao termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems). As condições da reação consistiram de uma desnaturação inicial (5 minutos a 95 °C), 30 ciclos de desnaturação (1 minuto 95 °C), anelamento (1 minuto 55 °C) e extensão (2,0 minutos 72 °C) mais um ciclo de extensão final 10 minutos 72 °C. Após a PCR, 2 µL da reação foi corado com GelRed (Biotium) e aplicada ao gel de agarose a 1% (p/v) em tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) 0,5X em eletroforese horizontal com voltagem de 120 V por 1 h.

O produto da PCR do IGS foi submetido à digestão com endonucleases para a aplicação da técnica de RFLP (Restriction Length Fragment Polymorphism) com o uso de três enzimas de restrição *HaeIII*, *AluI* e *HindIII* (Bioron), a reação final foi ajustada para 16 µL, contendo 0,5 µL de endonucleases, 0,1 µL BSA (10 µg mL<sup>-1</sup>), 1,6 µL do tampão 10 X, 5,8 µL

de água ultra pura e 8 µL do produto do de amplificação. Os fragmentos digeridos foram corados e separados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5X em eletroforese horizontal com voltagem de 80 V por 3 h. As imagens de todos os géis com os genes amplificados foram visualizadas sob luz UV em fotodocumentador modelo L-Pix (Loccus Biotecnologia).

As imagens dos géis do IGS-RFLP foram importadas pelo programa BioNumerics v. 7.5 (Applied Maths), para padronização das imagens e construção dos dendrogramas de similaridade pelo método de agrupamento UPGMA, usando o coeficiente de Dice. A partir desse agrupamento foram selecionados 27 isolados para as avaliações seguintes.

### **3.6- Sequenciamento parcial da região IGS 16S-23S rRNA**

Todos os vinte e sete isolados selecionados pela técnica IGS-RFLP foram amplificados para sequenciamento da região intergênica (16S-23S rRNA). Para amplificação foram usados os mesmos iniciadores utilizado para o ensaio de IGS-RFLP como descrito no item anterior e com o ajuste do volume de reação para 20 µL. Os produtos da PCR foram purificados com o kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) e, em seguida, enviados para sequenciamento na empresa coreana Macrogen.

A qualidade das sequências obtidas foi avaliada com o programa SeqScanner v 2.0. Por meio deste programa, sequencias contínuas de alta confiabilidade (QV>20) foram extraídas e utilizadas para a comparação nos bancos de dados. A similaridade das sequencias obtidas foi comparada com aquelas depositadas no banco de dados GenBank do National Center for Biorecnoology Information (NCBI), usando o programa BLASTn. As sequências das estirpes tipo e de estirpes não-tipo com maior similaridade foram baixadas e alinhadas com as dos isolados obtidos, usando o algoritmo MUSCLE. As árvores filogenéticas foram construídas pelo método Neighbour-Joining e o modelo Jukes-Cantor. Tanto o alinhamento das sequências quanto a construção da árvore filogenética foram feitas com o auxílio do programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

### **3.7- Mecanismos de Promoção do Crescimento *in vitro***

Os testes para avaliar os mecanismos de promoção de crescimento descritos a seguir foram realizados em 27 isolados selecionados a partir da restrição da região intergênica 16S-23S rRNA (IGS) mais a estirpe referência BR 3267 de *Bradyrhizobium yuammingense*.

#### **3.7.1 Produção de compostos indólicos**

A produção de compostos indólicos foi quantificada adotando como base o método colorimétrico desenvolvido por Sarwar e Kremer (1995). Para isso, foi preparado um pré-inóculo para cada uma das 27 bactérias selecionadas, além da estirpe de referência, a partir de

colônias crescida em meio YMA. Com o auxílio de uma alça de platina uma pequena quantidade da cultura bacteriana foi transferida para tubos de ensaios contendo 5 mL de meio líquido Dygs (Dextrose Yeast Glucose Sucrose), com adição de 5g de manitol e incubadas sob agitação durante 48 horas. Um volume de 1 mL de cada pré-inóculo foi transferido para tubos de ensaio com meio Dygs suplementado com triptofano, em triplicata, e incubadas sob agitação constante (100 rpm) por sete dias. Após esse período, foi avaliado a densidade ótica (DO) das culturas (540 nm), ajustando-se a concentração para 0,5.

Com inóculo ajustado, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas durante 3 min a 10.000 rpm. Cem microlitros de reagente de Salkowski (2% de  $\text{FeCl}_3$  0,5 M em 35% de ácido perclórico) foi adicionado a 150  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e incubados no escuro durante 30 minutos e, em seguida, lidos em espectrofotômetro UV-Vis (Multiskan GO, Thermo-Scientific) a 530 nm. Para a estimativa da produção de compostos indólicos, uma curva padrão foi usada. Esta foi previamente obtida com concentrações conhecidas de AIA sintético: 0, 50, 100, 150, 200 e 250  $\text{mg.L}^{-1}$ .

### **3.7.2- Solubilização de fosfato de cálcio.**

A avaliação da capacidade das bactérias em solubilizar fosfato inorgânico (fosfato de cálcio) foi realizada segundo a metodologia descrita por Sylvester-Bradley *et al.* (1982). As bactérias foram crescidas em YM sem corante por quatro dias. O meio utilizado para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato foi o meio de cultivo com glicose 10  $\text{g.L}^{-1}$ , extrato de levedura 0,5  $\text{g.L}^{-1}$  e agar 15  $\text{g.L}^{-1}$  com a adição de cloreto de cálcio (10%) 100  $\text{mL.L}^{-1}$  e fosfato de sódio bibásico (10%) 50  $\text{mL.L}^{-1}$ , ambos acrescidos antes do meio ser vertido nas placas. Em seguida, uma alíquota de 10  $\mu\text{l}$  foi inoculada em triplicata no meio sólido. O crescimento das colônias e/ou a formação de halo foram avaliados de acordo com o tempo de crescimento de cada isolados testado.

### **3.7.3- Produção de sideróforos**

Para avaliação da produção de sideróforos, foi adaptado o método quantitativo proposto por Ribeiro e Cardoso (2012), brevemente descrito a seguir. As bactérias foram crescidas em meio YM líquido por 48 h a 28°C sob agitação constante. Uma alíquota de 1,5 mL do inóculo foi centrifugado, e 1 mL do sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de sideróforos. O volume de 150  $\mu\text{L}$  do sobrenadante amostrado foi colocado em poços de placas de microtitulação com 96 poços (placas de ELISA) contendo 150  $\mu\text{L}$  do CAS (6 mL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio–HDTMA; 1,5 mL solução de  $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ ; 4,307g piperazina anidra;  $\text{HCl}$  6,25  $\text{mol L}^{-1}$ ) (Schwyn e Neilands, 1987).

A placa foi coberta e colocada no escuro por 30 minutos, tempo necessário para a mudança da coloração. Os poços que apresentaram mudança de cor do azul para amarelo ou laranja, foram considerados como positivos para a produção de sideróforos.

### **3.8- Tolerância a NaCl, pH e formação de biofilme**

As bactérias foram crescidas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio YM por 5 dias sob agitação constante. Após do crescimento do inóculo a OD<sub>540</sub> foi ajustada para 0,1.

A tolerância a diferentes concentrações de NaCl, pH foram testadas separadamente e formação de biofilme sob condições de diferentes concentrações de NaCl, pH condições ideais para o crescimento de rizóbios. Para os testes os isolados foram crescidos em meio YM modificado sob condições de pH neutro, ácido e alcalino (pH 7,0, 4,0 e 10,0) e concentração de NaCl de 1, 2 e 3% (p/v). Cada 48 poços de uma microplaca de ELISA constituíam um teste com quatro repetições para cada bactéria. Um tratamento controle foi adicionado com meio YM padrão, sem alteração do pH ou da concentração de NaCl, além de outro controle sem bactéria para cada teste. O volume de 100 µL dos meios YM (modificados pela adição de NaCl ou alteração do pH) foi adicionado em poços das placas de ELISA e, em seguida, 10 µL do inóculo contendo as 28 bactérias testadas.

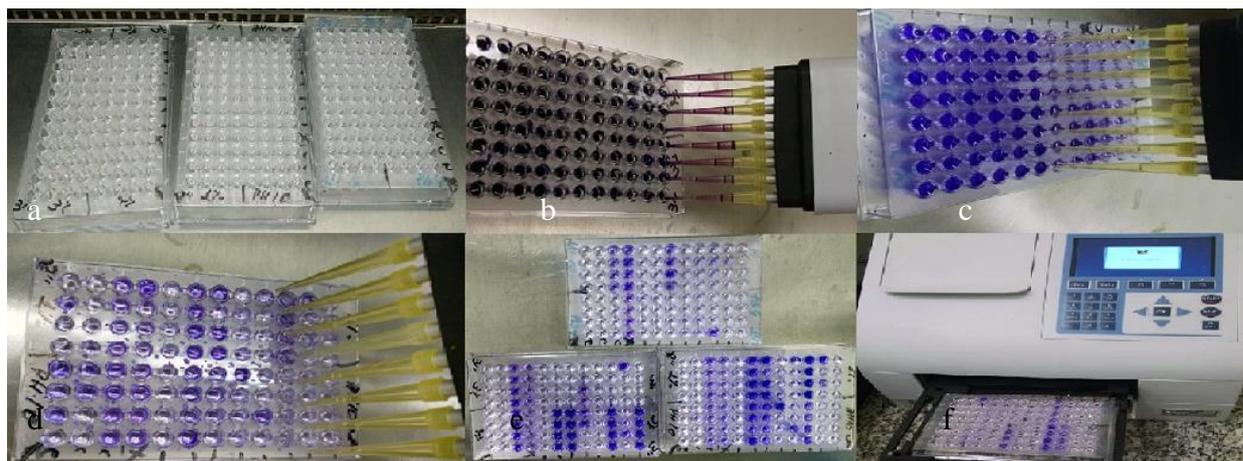
Para os tratamentos controles foi usado o mesmo volume do inoculo contendo a bactéria e meio YM sem modificações. No controle absoluto foi usado o meio YM com e sem modificações e, no momento de leitura, 10 µL de um cultivo bacteriano autoclavado ajustado para 0.1 foi adicionado. As bactérias foram crescidas sob as condições descritas acima durante tempo mínimo de 5 dias de acordo com o tempo de crescimento de cada bactéria.

As placas de ELISA foram incubadas a 28° C em estufa tipo BOD e as avaliações foram realizadas de acordo com o tempo de crescimento dos isolados. Para o teste de tolerância a NaCl e pH as leituras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm.

A avaliação da formação de biofilme foi realizada seguindo metodologia de Nostro *et al.* (2004) adaptada. Quando decorrido o tempo necessário para o crescimento dos isolados, nos experimentos com NaCl e pH, descritos acima e após a leitura da DO<sub>540</sub>, os caldos de cultivo foram descartados e foram realizadas três lavagens com 200 µL de ADE em cada poço das microplacas. Após as lavagens as placas secaram à temperatura ambiente e foi adicionado 100 µL de Violeta de Genciana a 0,25% (p/v) por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente como descrito acima e foi adicionado uma solução álcool-acetona na proporção 80:20. A quantificação do biofilme formado foi feita em

espectrofotômetro a 620 nm para todo o experimento para a leitura do grau de coloração roxa-azulada (Figura 2). Para estimar a formação de biofilme, uma curva padrão foi construída com diferentes diluições de violeta genciana 0,25% (p/v) e solução álcool-acetona (80:20), constituído com 10 pontos com as seguintes concentrações de 0, 1; 2; 3; 4; 5,2; 6,4; 7,5 e 10%.

Tanto para a avaliação de tolerância a NaCl e pH quanto para a formação de biofilme,



**Figura 2:** Metodologia para avaliação de formação de biofilme de isolados de solos de Juazeiro-BA sob condições de estresse *in vitro*. Bactérias crescidas em meio YM com diferentes concentrações de NaCl e pH em (a) placas de ELISA após a primeira série de lavagem; (b) adição de violeta genciana a 0,25%; (c) segunda série de lavagens para retirada da violeta genciana; (d) e (e) adição da solução álcool-acetona para quantificação da formação de biofilme em (f) espectrofotômetro.

para cada placa de ELISA o experimento foi inteiramente casualizado com 4 repetições para cada tratamento avaliado. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Os dados foram transformados pela raiz quadrada de  $Y^{0,5}$ , usando o programa estatístico SISVAR.

### 3.9- Experimento de autenticação e eficiência simbiótica

O experimento de eficiência simbiótica e autenticação dos 27 isolados selecionados no agrupamento do RFLP-IGS foi realizado no período de fevereiro a março de 2018 em condições de casa de vegetação da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE.

Além destes 27 isolados, duas bactérias de referência BR 3267 (Martins et al. 2003) e ESA 17 (Marinho et al., 2017), um tratamento controle absoluto (sem nenhum tipo de inoculação e sem suplementação com N) e um controle nitrogenado (com aplicação de 50 mg de N semana<sup>-1</sup> na forma de  $NH_4NO_3$ ).

Para o preparo do inoculo, os isolados foram inoculados em placas de Petri com meio YMA pelo tempo mínimo de seis dias, em seguida, com o auxílio de uma alça de platina uma pequena quantidade da cultura bacteriana foi transferida para erlenmeyers com capacidade para 125mL contendo 20 mL de meio YM sem adição de corante. Essas bactérias foram cultivadas sob agitação orbital de 160 rotações por minuto (rpm) por 5 dias à temperatura ambiente.

Para o plantio foram usados vasos de poliestireno com capacidade para 500 mL, [desinfestados com álcool 96° GL e hipoclorito de sódio 2,5% (comercial) e lavados com água destilada estéril]. Esses vasos foram preenchidos com areia esterilizada duas vezes por autoclavagem a pressão de 1,0 atm e temperatura de 120°C por 2 horas, com ao menos 48 horas de intervalo entre uma esterilização e outra.

Foram semeadas três sementes da variedade BRS Pujante desinfestadas superficialmente conforme descrito anteriormente. Em cada vaso foram semeadas 3 sementes e cada uma recebeu 1 mL de inóculo (caldo de cultivo) do respectivo tratamento aplicado diretamente na semente, em seguida, as sementes foram cobertas com areia estéril. Aos cinco dias após a germinação o desbaste foi realizado, deixando apenas uma planta por vaso. Uma solução nutritiva esterelizada isenta de N (Norris e T'Mannetje, 1964) foi aplicada uma vez por semana iniciando após a queda dos cotilédones até a última semana da condução do experimento. A irrigação foi realizada sempre que necessário com ADE.

As plantas foram coletadas aos 45 dias após a emergência. No momento da coleta, parte aérea foi separada da raiz e as raízes foram lavadas com água corrente e os nódulos destacados e contados. As raízes, partes aéreas e nódulos foram acondicionados em sacos de papel e secos em estufa de circulação forçada de ar a 65° C até peso constante, quando foram pesados em balança analítica. Após a pesagem as partes aéreas foram moída em moinho para a determinação do teor de N na parte aérea.

Para esse ensaio foram avaliados massa seca total (MST) massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos (NN), massa nódulos secos (MNS), massa da raiz seca (MRS), teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA) e acúmulo na parte aérea (ANPA). O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de combustão seca no analisador Elementar Vario EL TrupSpec (Leco, EUA), no Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal da Embrapa Semiárido. O ANPA foi calculado multiplicando-se o peso da MPAS (g) pelo teor de N na parte aérea (%) / 100. A relação entre ANPA e MNS foi usada para estimar a eficiência nodular.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Todos os dados, exceto MRS e MTS, foram transformados pela raiz quadrada de  $Y+0,5$ .

#### **4- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No experimento de prospecção de rizóbios foi possível verificar a presença de raízes noduladas em todas os genótipos e solos testados (Tabela 3). No entanto, as amostras de solos das áreas de sequeiro e vegetação nativa da caatinga mostraram médias significativamente inferiores para essa variável quando comparada com às áreas com uso de irrigação, exceto para a amostra da área 1 de manga com feijão-caupi na entrelinha, em que a cultivar BRS Acauã apresentou média estatisticamente igual às áreas de sequeiro.

Houve diferença estatística para os genótipos estudados em todas as amostras de solos das áreas irrigadas (manga com feijão-caupi na entrelinha, rotação feijão-caupi e cebola, cultivo agroecológico, área experimental UNEB), com destaque para a BRS Pujante com maior média de nódulos formados (Tabela 3). A disponibilidade de água quando associada com outros fatores limitantes pode afetar a comunidade rizobiana sua funcionalidade e diversidade (Voung *et al.*, 2017).

Aspectos como nodulação e fixação de N, abrangendo desde a sobrevivência e crescimento, infecção e nodulação até os benefícios da simbiose são afetados pela disponibilidade de nutrientes (Voung *et al.*, 2017).

No presente estudo, o nível de fósforo (P) no solo pode ter influenciado diretamente a nodulação. As áreas de Caatinga e feijão-caupi em sequeiro sem ou com adubação nitrogenada apresentaram, respectivamente, 7,48, 10,14 e 15,47  $\text{mg.dm}^{-3}$  de P (Tabela 2). As amostras de solo com maior concentração de fósforo apresentaram concentração de fósforo 4 vezes maior do que a soma de fósforo nas três áreas com menor nodulação. A limitação de P

pode impactar o status energético e o metabolismo das reações nos nódulos (Valentine, Kleinert, Benedito, 2017), o que poderia explicar o menor número de nódulos nas áreas com limitação desse nutriente.

**Tabela 3:** Valores médios de números de nódulos obtidos de três genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) sob diferentes sistemas de uso do solo.

Solos amostrados	Genótipos		
	Canapu ligeiro	BRS Acauã	BRS Pujante
1- Consórcio (manga-feijão-caupi)	100,00aB	67,67cB	189,00bA*
2- Rotação de cultura (feijão-caupi e cebola)	114,67aC	188,33aB	311,67aA
3- Cultivo Agroecológico (IRPAA)	102,00aB	110,67bB	207,33bA
4- Área experimental UNEB	111,00aB	78,00cB	161,67bA
5- Cultivo de feijão-caupi de sequeiro com adubação nitrogenada	24,67bA	35,67cA	87,67cA
6- Cultivo de feijão-caupi de sequeiro sem adubação nitrogenada	24,00bA	31,00cA	27,00cA
7- Caatinga	24,33bA	31,00cA	42,33cA
CV (%)	33,35		

\*As médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Quanto a massa seca da parte aérea, não houve interação entre genótipos e áreas avaliadas. Houve diferença significativa na produção de massa seca entre as diferentes áreas, no entanto os diferentes genótipos não apresentaram diferença para essa variável.

Foram isolados 630 nódulos, no entanto, nem todos os nódulos apresentaram crescimento bacteriano. Ao final da purificação foram obtidos 460 isolados a partir do experimento de planta-isca em casa de vegetação com as 7 amostras de solo usadas neste estudo. Mais de 60% desses isolados apresentaram crescimento lento (seis ou mais dias para formação de colônias), reação de pH em meio YMA e produção de muito muco.

A identificação de um isolado se inicia na caracterização fenotípica e genética e posterior alocação deste isolado caracterizado a uma espécie conhecida, após a verificação de certo grau de similaridade. Características morfo-culturais como mudança da reação de pH no meio de cultura YMA para ácida ou básica, tempo de crescimento, diâmetro de colônia formado e produção de exopolissacarídeos são considerados como parâmetros para distinguir rizóbios (Martins et al., 1997).

A maioria dos isolados que apresentaram crescimento lento, foi oriundo das áreas irrigadas de manga com feijão-caupi na entrelinha, IRPAA, área experimental da UNEB e rotação de cultura feijão-caupi e cebola (61, 65, 65,5 e 67,5% respectivamente), (Figura 3). Isolados com crescimento lento também foram verificados nas demais áreas, no entanto, com menor frequência. As áreas de feijão-caupi cultivadas em sequeiro com e sem adubação

nitrogenada apresentaram 41 e 44% de isolados que cresceram com seis ou mais dias, respectivamente. Para área de caatinga 34% dos isolados apresentaram crescimento lento. No entanto, para essa área, houve maior ocorrência de isolados rápidos 46% dos isolados cresceram em até 3 dias quando comparado com as demais.

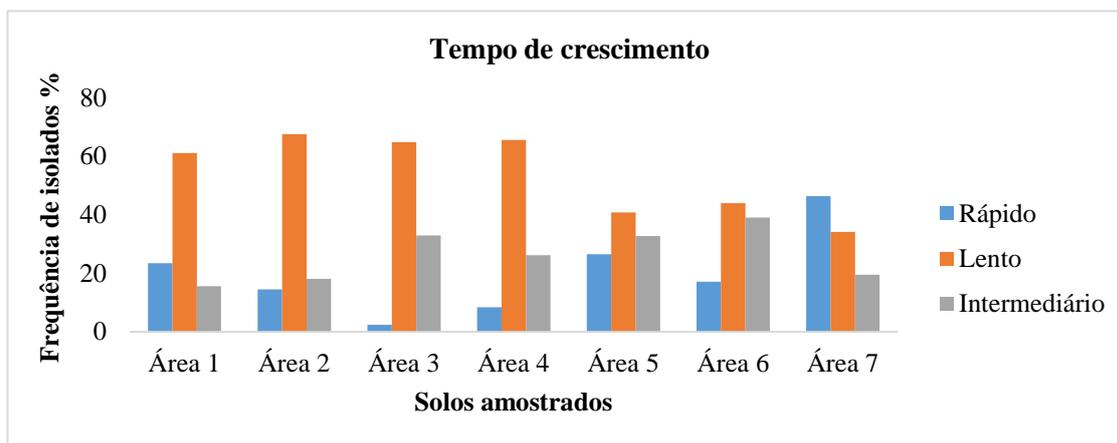
Além da área de Caatinga, outras áreas também apresentaram isolados que cresceram em até três dias. Com destaque para as áreas 5 (sequeiro com adubação mineral) e 1 (áreas de consórcio de manga e feijão-caupi), que apresentaram 23 e 26% de isolados com crescimento rápido, respectivamente.

O tempo de crescimento é uma das características mais importantes para caracterizar rizóbios. De modo geral, os isolados lentos e rápidos são oriundos de regiões específicas, lentos de regiões tropicais e rápidos de regiões temperadas (Moreira; Siqueira, 2006). Apesar dessa informação, inúmeros trabalhos realizados na região semiárida do Nordeste relatam alta frequência de isolados de crescimento rápido (Freitas *et al.*, 2007, Teixeira *et al.*, 2010). Até mesmo para isolados em associação com feijão-caupi (Leite *et al.*, 2009).

No presente trabalho, para os solos submetidos a irrigação, houve uma frequência superior a 60% dos isolados com crescimento lento, o que pode ser justificado pela preferência do feijão-caupi em estabelecer simbiose com bactérias de crescimento lento com características típicas de *Bradyrhizobium* (Xavier, 2000) ou, ainda, pelas características das áreas estudadas.

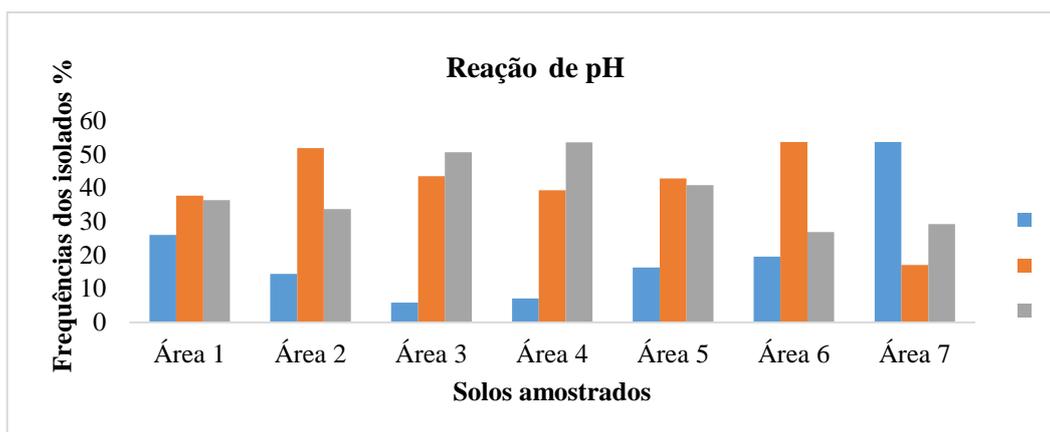
Além de estar sob irrigação, essas áreas com maior ocorrência de isolados lentos apresentaram pH variando de 7,1 a 7,9 (TABELA 2), com exceção do solo sob cultivo de manga e feijão-caupi na entrelinha (pH 5,7). Segundo Leite *et al.*, (2009), existe relação entre o pH do solo e a predominância de isolados lentos, o que foi constatado por estes autores em estudo de diversidade de bactérias nodulíferas em leguminosas no Submédio do Vale do São Francisco, em que a única área que apresentou isolados de crescimento lento apresentou pH 8,0.

A alta frequência de isolados com crescimento rápido em estudos de diversidade com condições adversas, como altas temperaturas, pH ácido do solo, entre outras, é, normalmente, atribuída à maior adaptabilidade desses isolados nessas áreas (Teixeira *et al.*, 2010). Isolados de crescimento rápido oriundos de regiões de deserto possuem capacidade de tolerar concentrações de sais de 40dS m<sup>-1</sup> em meio de cultura YMA e de água de irrigação com até 12dS m<sup>-1</sup> quando em simbiose, mostrando que isolados obtidos de solos sob estresse ambiental podem carregar característica de resistência a fatores limitantes (Sharma *et al.*, 2013).



**Figura 3:** Crescimento em meio de cultivo YMA de isolados de rizóbios oriundos de nódulos de feijão-caupi, cultivado em sete amostras de solos de áreas agrícolas do município de Juazeiro-BA. Manga com feijão-caupi na entrelinha (área 1), Rotação de cultura feijão-caupi com cebola (área 2), cultivo agroecológico - IRPPA (área 3), área experimental UNEB (área 4), cultivo de feijão-caupi com adubação mineral de N (área 5), cultivo de feijão-caupi sem adubação mineral de N (área 6) e Caatinga (área 7).

A capacidade dos isolados em alterar a reação de pH do meio YMA para alcalino foi verificada em todas as áreas (FIGURA 4), podendo destacar as áreas 3 (IRPPA) e 4 (área experimental da UNEB) com mais de 50% dos isolados com essa característica. Já nas áreas 2 (rotação de culturas) e 6 (sequeiro sem adubação mineral), a reação de pH predominante foi neutra, ou seja, os isolados não alteraram o pH do meio de cultura. Mais de 50% dos isolados da área de Caatinga alteraram o pH para ácido. A frequência de isolados que apresentaram reação ácida do pH do meio foi menor que 10% nas áreas 3 e 4.



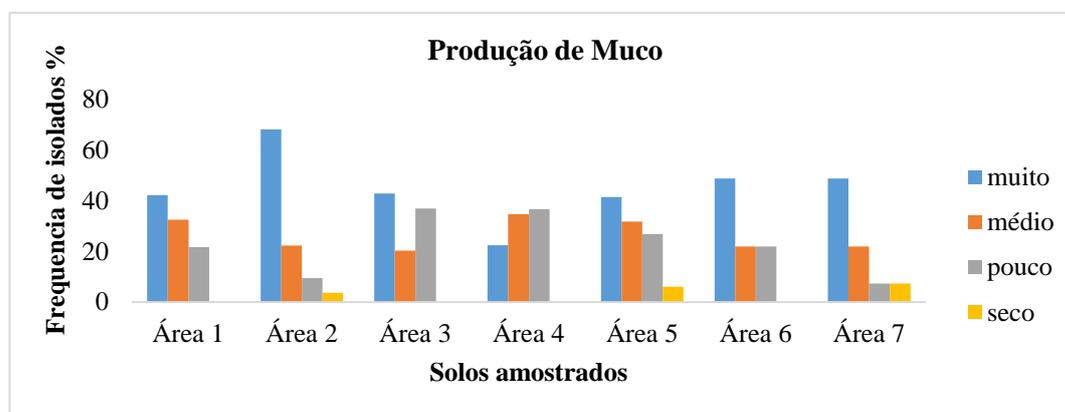
**Figura 4:** Alteração do pH em meio de cultivo YMA de isolados de rizóbio de nódulos de Feijão-Caupi, cultivado em sete amostras de solos agrícolas do município de Juazeiro-BA. Manga com feijão-caupi na entrelinha (área 1), Rotação de cultura feijão-caupi com cebola (área 2), cultivo agroecológico - IRPPA (área 3), área experimental UNEB (área 4), cultivo de feijão-caupi com adubação mineral de N (área 5), cultivo de feijão-caupi sem adubação mineral de N (área 6) e Caatinga (área 7).

Assim como a característica de crescimento, a reação de pH dos isolados parece ter relação com o pH do solo. A maior concentração de isolados com reação de pH ácida ocorreu na área com menor pH, na área de Caatinga. As áreas com maior ocorrência de isolados com reação ácida de pH, apresentaram pH variando de 5,3 a 5,7. Solos com pH baixo podem limitar o desenvolvimento de isolados com características de *Bradyrhizobium* devido à sensibilidade desse gênero a acidez do solo (KAPEMBWA *et al.*, 2016), como pode ser visto na área de Caatinga, onde há o predomínio de isolados rápidos e com reação ácida de pH. No entanto, Tampakaki *et al.*, (2017) encontrou bactérias do gênero *Bradyrhizobium* distribuídos pelos solos ácidos da Grécia e relataram a ocorrência de isolados de crescimento rápido em solos alcalinos. Do mesmo modo, em solos da China, estirpes de *Bradyrhizobium* foram mais abundantes em solos ácidos seja em associação com soja (Yan *et al.*, 2014) ou com feijão comum (Cao *et al.*, 2014).

A produção de exopolissacarídeos (muco) também variou nas áreas estudadas, apresentando produção de pouco à muito muco (FIGURA 5). De modo geral, houve um predomínio de isolados com alta produção de muco, com destaque para a área 2 de rotação de cultivo que apresentou mais de 60% dos isolados com alta produção de muco. Já a área 4 de área experimental da UNEB, menos de 30% dos isolados apresentaram alta produção de muco. Ainda, foi observado em três áreas (2, 5 e 7) a presença de isolados que não produziram muco, os quais compreendem menos de 10% dos isolados das áreas.

A produção de exopolissacarídeos está associado à capacidade dos isolados de tolerarem condições ambientais adversas (Bomfeti *et al.*, 2011), a exemplo da acidez do solo (Moreira, Siqueira, 2006, Staudt, Wolfe, Shrout, 2012).

A produção desses exopolissacarídeos permite a adaptação de estirpes de rizóbios a diferentes condições ambientais e melhora a interação com a planta hospedeira (Ghosh, Maiti, 2016). Os exopolissacarídeos produzidos possuem alta capacidade de retenção de água, contribuindo para formação de um microambiente onde há a proteção do micro-organismos e, ainda, essas moléculas podem servir como reserva de energia em condições de limitação nutricional (Sayyed, Jamadar, Patel, 2011).

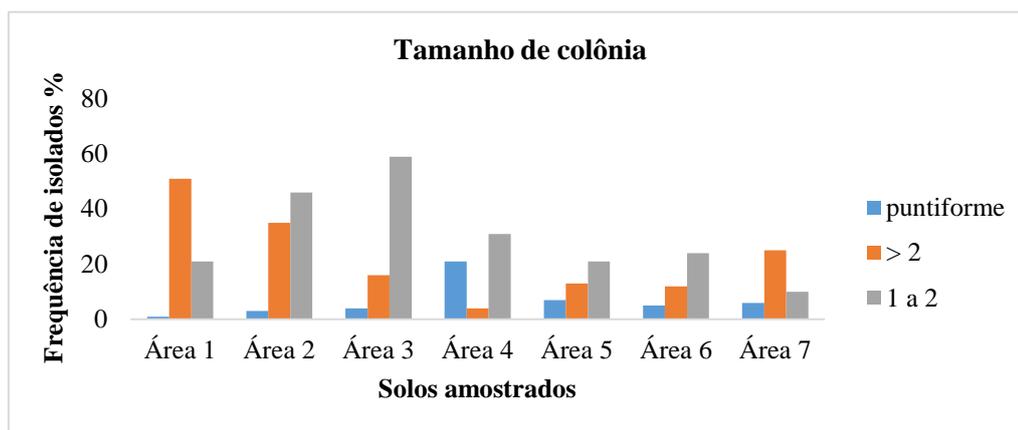


**Figura 5:** Produção de muco produzido pelos isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi cultivado em sete amostras de solos de áreas agrícolas do município de Juazeiro-BA. Manga com feijão-caupi na entrelinha (área 1), Rotação de cultura feijão-caupi com cebola (área 2), cultivo agroecológico - IRPPA (área 3), área experimental UNEB (área 4), cultivo de feijão-caupi com adubação mineral de N (área 5), cultivo de feijão-caupi sem adubação mineral de N (área 6) e Caatinga (área 7).

As áreas 1, 6 e 7 com pH mais ácido podem ter favorecido a produção de muco pelos isolados, uma vez que é possível observar maior frequência de isolados produzindo muito muco nessas áreas. Para a área 4 de pH neutro, os isolados com produção de muito muco não foram tão representativos quanto nas demais áreas.

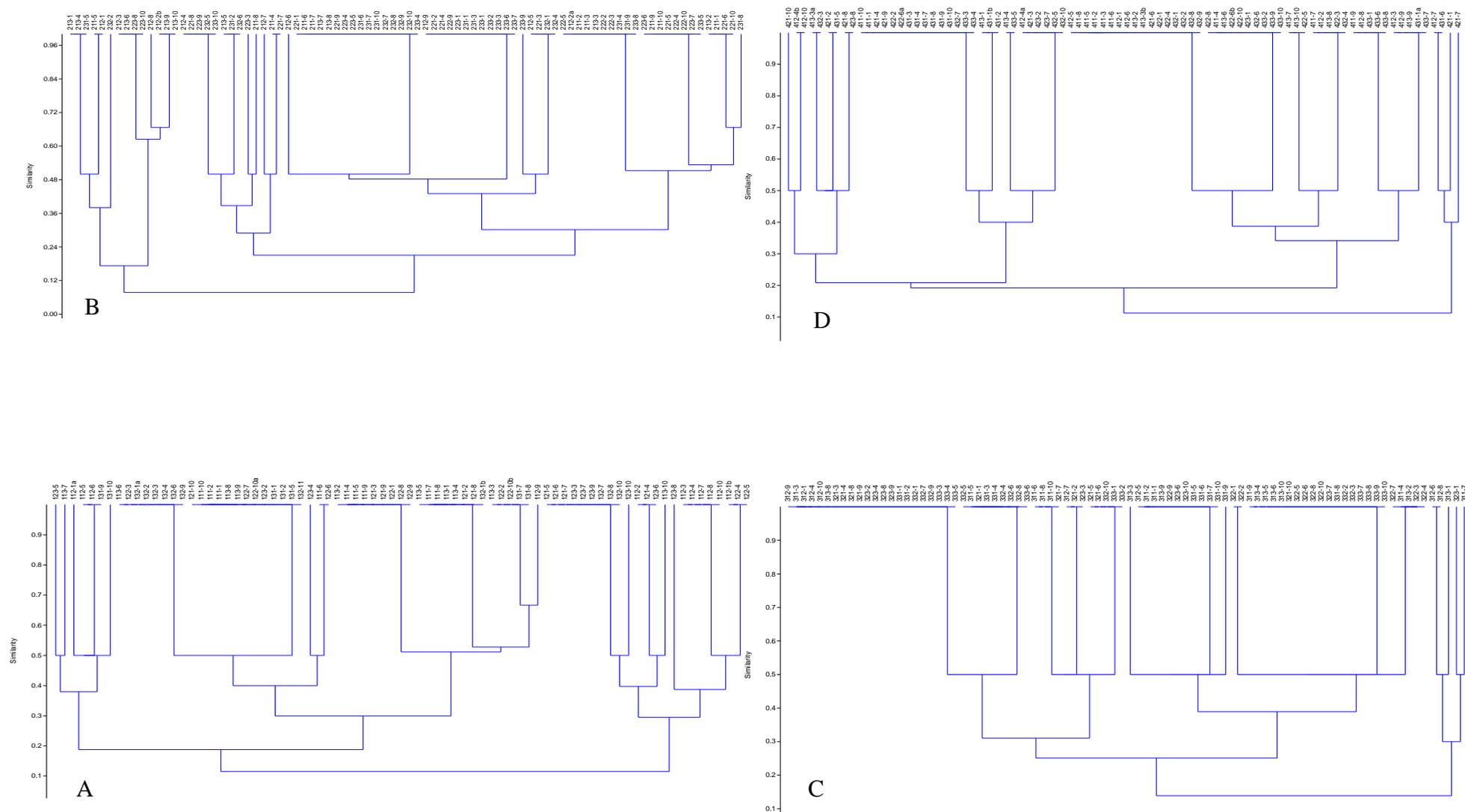
Quanto ao tamanho das colônias formadas pelos isolados, houve uma grande variação entre as áreas estudadas. As áreas 1 e 7 apresentaram maior frequência de isolados que formaram colônias maiores que 2 mm. Nas demais áreas houve o predomínio de isolados com tamanho de colônia variando de 1 a 2 mm, com destaque para a área 3 (Cultivo agroecológico -IRPAA-) com mais de 70% dos isolados com esse tamanho de colônia. Isolados com tamanho de colônia menor que 1 mm (puntiforme) foram mais frequentes na área 4 (área experimental da UNEB).

O tamanho de colônia de isolados obtidos de feijão-caupi de 20 diferentes localidades do Iraque foi a característica mais marcante na formação de grupos após a análise filogenética do gene 16S rRNA (Al-Saed *et al.*, 2017). O que mostra o potencial discriminatório dessa característica para testes preliminares de caracterização.

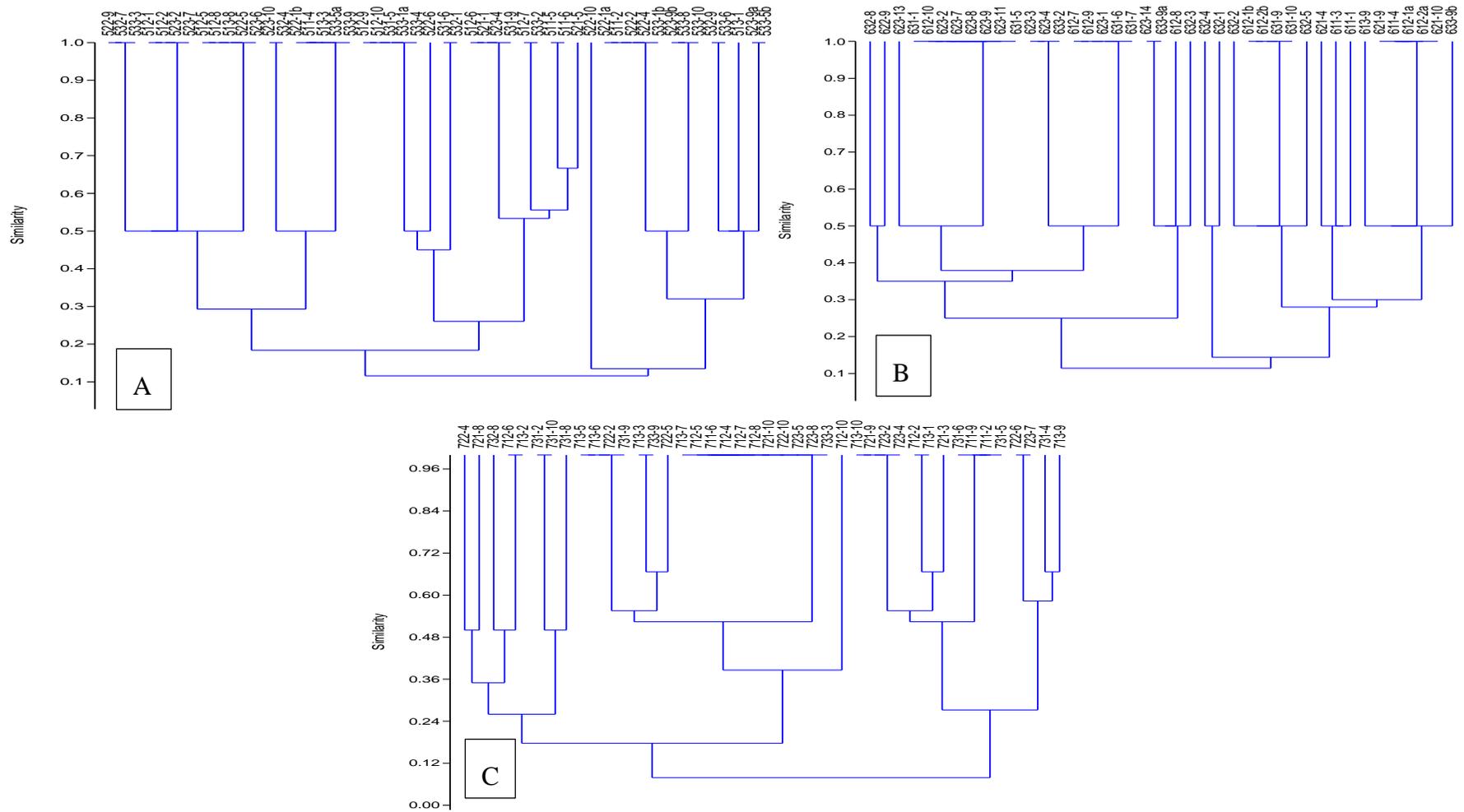


**Figura 6:** Tamanho de colônia formadas por isolados obtidos de nódulos de BRS Acauã, Canapu ligeiro e BRS Pujante cultivado em sete amostras de solos de áreas agrícolas do município de Juazeiro-BA. Manga com feijão-caupi na entrelinha (área 1), Rotação de cultura feijão-caupi com cebola (área 2), cultivo agroecológico - IRPPA (área 3), área experimental UNEB (área 4), cultivo de feijão-caupi com adubação mineral de N (área 5), cultivo de feijão-caupi sem adubação mineral de N (área 6) e Caatinga (área 7).

A partir das características morfo-culturais como tempo de crescimento, tamanho de colônia, reação de pH e produção de muco dos isolados obtidos das sete áreas estudadas foram construídos dendrogramas de similaridade por solo, usando o coeficiente de Jaccard (FIGURA 7 e 8). Das áreas irrigadas MC, C-ceb, AGROE e UNEB foram isolados 77, 84, 86 e 84 isolados, respectivamente. Esses isolados foram agrupados em 20, 21, 15 e 18 grupos a 80% de similaridade nas áreas irrigadas, sendo 20 grupos na área cultivada com manga e feijão-caupi na entrelinha, 21 na área de rotação de cultura feijão-caupi, 15 na área experimental da UNEB e 18 na área de cultivo agroecológico (IRPAA). Já nas áreas dependentes de chuva, isolados 50, 41 e 42 bactérias que foram agrupados em 18, 20 e 18 grupos para área de cultivo de feijão-caupi com e sem adubação nitrogenada e área de Caatinga, respectivamente.



**Figura 7:** Dendrograma de similaridade de características fenotípicas (tempo de crescimento, reação de pH e produção de exopolissacarídeos) dos isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi cultivado em 4 diferentes usos de terra sob irrigação de Juazeiro-BA, 2017. Área de manga com feijão na entrelinha (A), área de rotação de cultivo com feijão-caupi e cebola (B), área agroecológica do IRPPA (C), e área experimental da UNEB (D).



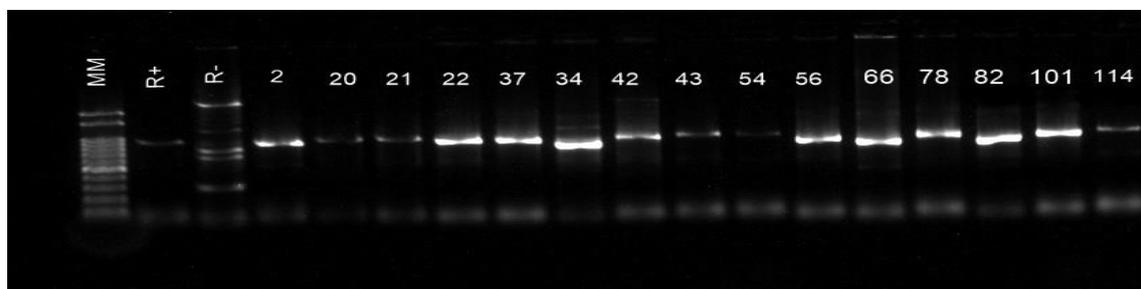
**Figura 8:** Dendrograma de similaridade de características fenotípicas (tempo de crescimento, reação de pH e produção de exopolissacarídeos) dos isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi cultivado em 3 usos de terra em sistemas dependente de chuva de Juazeiro-BA, 2017. Área de sequeiro com adubação nitrogenada (A), área de sequeiro sem adubação nitrogenada (B), e área de Caatinga (C).

Em todas as amostras de solos estudados foram formados grupos raros e grupos frequentes (Figuras 7 e 8), onde os raros são compostos por apenas um isolado e os frequentes por dois ou mais, chegando a 23 isolados no mesmo grupo na amostra de solo com cultivo agroecológico (Figura 7 C). Houve maior número de isolados prospectados das áreas irrigadas e maior número de grupos formados (mais diversos). Já para as áreas de cultivos dependentes de chuvas foram encontrados menor número de isolados o que pode ser atribuído a condição de estresse ambiental nessas áreas, em que a falta de irrigação submeteu os micro-organismos ao estresse particular do semiárido. O estresse causado pela seca tem papel efetivo na diversidade de rizóbios (Riah *et al.*, 2014), sendo possível afirmar que os isolados obtidos das áreas sob estresse são mais adaptados às condições limitantes do semiárido.

As áreas irrigadas, com destaque para as áreas 2, 3 e 4, mostraram maior número de isolados nos grupos frequentes, estas áreas também apresentaram maior fertilidade como pode ser visto na tabela 2. A área 3 de cultivo agroecológico foi a com menor diversidade, formando apenas 15 grupos. As características dessa área podem ter favorecido o estabelecimento de um grupo de bactérias específico de bactéria o que explicaria a presença de grupos com muito isolados e o menor número de grupos formados.

Dos isolados avaliados apenas aqueles em associação com Canapu Ligeira e BRS Pujante foram usados para as demais avaliações, uma vez que os diferentes genótipos não apresentam diferença marcante quanto as características morfo-culturais. Dessa forma, os isolados de nódulos do genótipo BRS Acauã não foram avaliados.

Para as avaliações a nível molecular, 251 isolados dos genótipos Canapu Ligeiro e BRS Pujante com características de tempo de crescimento lento ou intermediário e reação de pH neutra ou alcalina foram selecionados e submetidos à amplificação do fragmento do gene *nodC* (Figura 9), como estratégia para aumento da probabilidade do isolado selecionado de



fato ser rizobiano.

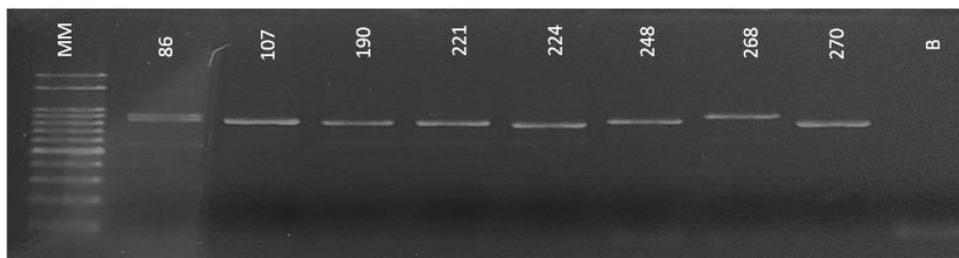
**Figura 9:** Amplificação do fragmento de gene *NodC* com os primers *nodCF* e *nodCR* de representantes de isolados de Canapu ligeiro. O marcador molecular 100pb DNA ladder (MM), duas referências BR1436 (R+), (R-) e 15 isolados

Dos 128 isolados oriundos dos nódulos do genótipo Canapu ligeiro, 92 amplificaram o fragmento do gene *nodC*. Já os isolados oriundos dos nódulos do BRS Pujante, 57% dos isolados amplificaram o fragmento desse gene, um total de 69 isolados das 123 bactérias.

O estudo de genes simbióticos, como o gene *nodC*, é frequentemente usado para investigar a diversidade de rizóbios e ou a especificidade com a planta hospedeira (Laguerre *et al.*, 2001, Menezes *et al.*, 2017). A não amplificação de genes simbióticos a exemplo do *nodC* pode ser devido a divergências nos genes simbióticos dos isolados (Estrella *et al.*, 2009) ou os primers usados na amplificação podem não ser correspondentes aos *loci* gene *nodC* das bactérias em estudo (Laguerre *et al.*, 2001). Ou, ainda, como relatado por Leite *et al.* (2017), dentro de nódulos de feijão-caupi pode existir uma grande diversidade de bactérias que não nodulam e são co-isoladas no processo de obtenção das estirpes rizobianas. Apesar destas limitações, a amplificação de um gene simbiótico é uma ferramenta importante na seleção de bactérias rizobianas e aumenta a probabilidade do isolado considerado positivo ser de fato um rizóbio, reduzindo o tamanho, ou até mesmo dispensando a necessidade de um experimento de autenticação na planta hospedeira (Fernandes Júnior *et al.*, 2013; Mothapo *et al.*, 2013, Rodrigues *et al.*, 2018)

Os 161 isolados com resultado positivo da amplificação do gene *nodC* foram selecionados para realização de posteriores análises. Estes isolados foram submetidos à reação para a amplificação do fragmento do IGS (Intergenic Spacer). Esta região intergênica vêm sendo usada para estimar a relação filogenética e a evolução entre rizóbios (Jaiswal *et al.*, 2017).

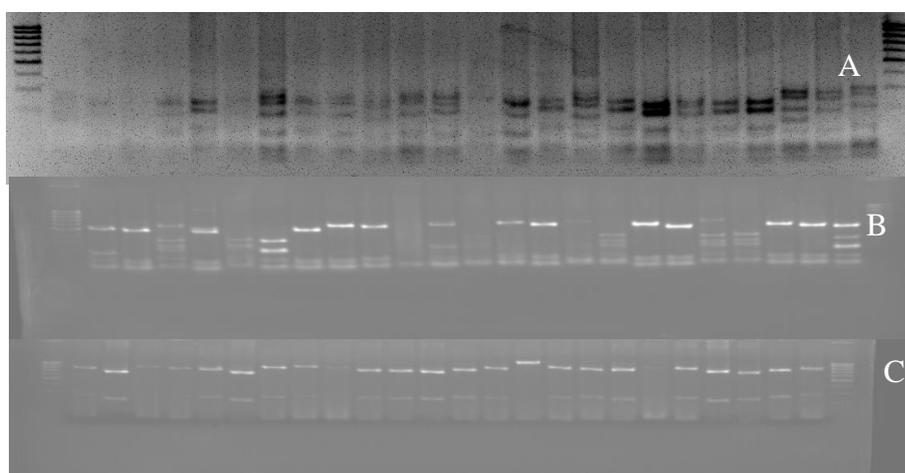
Todos os 161 isolados amplificaram o fragmento do IGS, variando de 860 a 1010pb (Figura. 10). Apesar de ser uma região muito variável, o comprimento dos fragmentos de IGS dos isolados aqui estudados mostraram baixa variação. A análise da região intergênica tem sido alvo de diversos estudos (Riah *et al.*, 2014, Tampakaki *et al.*, 2017, Jaiswal *et al.*, 2017), devido sua capacidade de diferenciar micro-organismos com grau de similaridade muito alto.



**Figura 10:** Amplificação do fragmento IGS (região intergênica do 16S-23S rRNA) de representantes de isolados de nódulos de BRS Pujante, Marcador molecular 100pb DNA ladder (MM) e reação controle. (B).

A técnica de IGS-RFLP tem sido relatada como uma técnica discriminatória de alta qualidade e robustez filogenética para a seleção preliminar de bradirrizóbios (Jaiswal *et al.*, 2017). Esta técnica pode ser usada para distinguir entre grupos filogeneticamente próximos, mesmo em gêneros bacterianos com resolução complexa, como é o caso do *Bradyrhizobium*, gênero provável das bactérias selecionadas com base em suas características fenotípicas.

Cada enzima mostrou um padrão de corte específico, gerando padrão de bandas diferentes quando submetido à eletroforese em gel de agarose (FIGURA 11). A restrição do fragmento do IGS gerou 99 perfis que se agruparam em 33 grupos a 85% de similaridade (FIGURA 12). A grande heterogeneidade evidenciada nos perfis gerados pela restrição do fragmento do IGS pode indicar uma alta diversidade entre os isolados e também foi relatado por Jaiswal *et al.*, (2017) em avaliação da variabilidade genética de uma coleção de rizóbios de amendoim. Os agrupamentos observados neste estudo variaram de grupos com 1 isolado



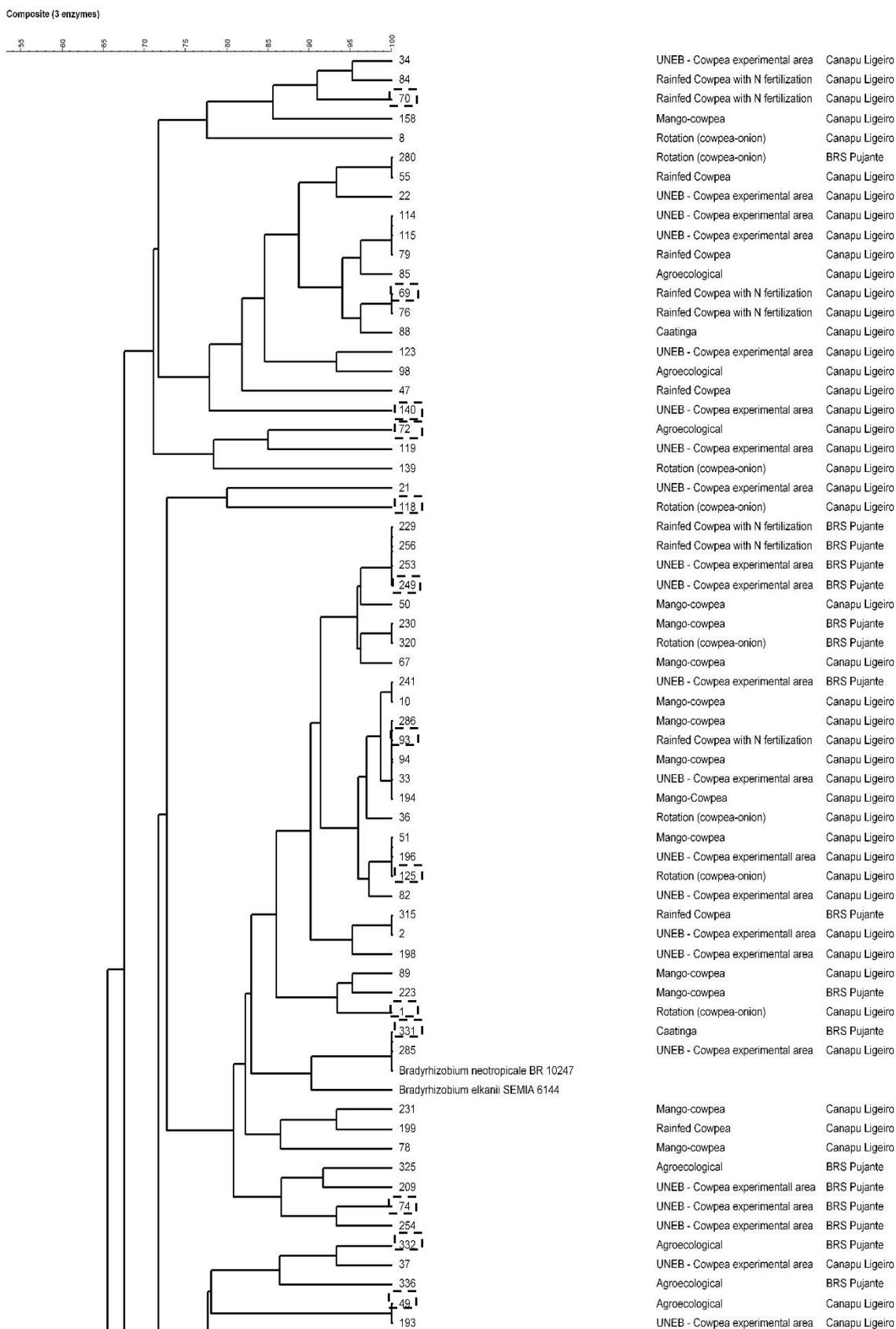
**Figura 11:** Imagem de gel de agarose à 1 % após eletroforese de amostras da análise PCR-RFLP de representantes de isolados de nódulos de Canapu ligeiro e BRS Pujante das sete diferentes áreas estudadas de Juazeiro-Ba. AluI (A), HaeIII (B), HindIII (C), marcador DNA ladder de 100pb.

(raro) e um grupo mais abundante com 48 isolados.

Com base no dendrograma gerado a partir da análise dos perfis de bandas do IGS-RFLP (Figura 12), genótipo hospedeiro exerceu forte influência no agrupamento. No entanto, para alguns grupos, como o caso do grupo 22, a área de origem pode ter influenciado tanto quanto o genótipo. Leite *et al.*, (2017) estudando a diversidade de bactérias associadas a nódulos de feijão-caupi encontrou maior influência dos solos estudados na diversidade de micro-organismos endofíticos não-rizobianos, se comparado com a influência do genótipo hospedeiro. Da mesma forma, Pires *et al.* (2018) avaliaram que as características edáficas foram determinantes na seleção dos isolados de espécies de *Mimosa* sp. em solos do Cerrado. A influência dos diferentes usos de terra sobre a diversidade de rizóbio tem sido destacada em diversos estudos, visando conhecer o impacto da agricultura sobre a população desse grupo de micro-organismos tão importante para os sistemas naturais e/ou agrícolas (Leite *et al.*, 2009; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014; Voung *et al.*, 2016).

Comparando o agrupamento dos novos isolados com as estirpes referência como *Bradyrhizobium japonicum* (USDA 06), *Bradyrhizobium neotropicale* (BR 10247), *Bradyrhizobium* sp. (BR 2003), *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 6144), *Rhizobium etli* (CFN42), *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* (LMG 8820), *Bradyrhizobium ingae* (BR 10250) e *Ensifer* sp. (USDA 192) na construção do dendrograma foi possível constatar o caráter filogenético da técnica usada para fazer agrupamento (Figura 12).

Na figura 12 podemos ver a formação de um grupo com menor similaridade com as demais bactérias, contendo as estirpes *Rhizobium etli* CFN42, *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* LMG 8820 e *Ensifer* sp. USDA 192, enquanto as bactérias referência do gênero *Bradyrhizobium* e as bactérias obtidas no presente estudo se mesclaram em um grande grupo com 75% de similaridade. Esse agrupamento é condizente com a filogenia dos  $\alpha$ -rizóbios (Shamseldin, Abdelkhalek, Sadowsky, 2016) corroborando com o caráter filogenético do agrupamento gerado a partir da técnica de IGS-RFLP demonstrado por Jaiswal *et al.* (2017).



**Figura 12:** Dendrograma gerado a partir do padrão de bandas da restrição de IGS (16S-23S rRNA) RFLP digerido com as enzimas de restrição *HaeIII*, *HindIII* e *AluI* de isolados de BRS Pujante e Canapu Ligeiro, obtidos de áreas com diferentes usos da terra em Juazeiro-BA. Os isolados destacados com a linha tracejada foram os selecionados para as demais análises.



**Figura 12:** Continuação

De acordo com o resultado do agrupamento do IGS-RFLP, um isolado de cada grupo dentre os grupos considerados como frequentes, com mais de um isolado, foram selecionados para as etapas posteriores. Com este critério foram selecionados 27 isolados.

O sequenciamento do IGS foi realizado a partir dos amplicons com tamanho entre 850-1075pb. Todas as sequências obtidas foram alinhadas com sequências tipo e sequências de bactérias não-tipo no banco de dados GenBank. De acordo com a comparação com as sequências disponíveis no banco de dados, 26 bactérias foram identificadas como pertencentes ao gênero, *Bradyrhizobium* e um isolado foi relacionado a *Microvirga*. (Tabela 4)

O gênero *Bradyrhizobium* foi delineado para englobar os rizóbios de crescimento lento e com reação de pH alcalina (Jordan, 1982) e pode ser dividido em dois grandes clados: *B. japonicum* e *B. elkanii* de acordo com a análise filogenética por meio das sequências de genes constitutivos e simbióticos. Neste estudo, foram obtidas bactérias de ambos os clados (Figura 13) bem como observado em outros trabalhos (Menna *et al.*, 2009; Sarr *et al.*, 2011, Marinho *et al.*, 2017). Outros trabalhos avaliando a diversidade de *Bradyrhizobium* no Semiárido observou a predominância de bactérias pertencentes ao clado *B. japonicum* (Santos *et al.*, 2017), indicando a elevada diversidade dos rizóbios identificados neste estudo.

Dentre os 26 isolados identificados no gênero *Bradyrhizobium* por meio da avaliação das sequências da região IGS, 21 foram classificados como pertencentes ao clado I *B. japonicum* e apenas 5 ao Clado II, *B. elkanii*. No clado I estão os isolados 259, 35, 69 (SEQ-N) 46, 201 (SEQ), 302, 331(CAAT), 306,107 (C-ceb), 249, 299, 66, 140, 74 (UNEB), 72, 324, 332, 34, 264, 96 (AGROE), 92(MC). Apesar de quase todos isolados deste grupo terem sequências com certa similaridade com a da estirpe tipo *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, não foi possível fazer o alinhamento com a sequência dessa estirpe, pois o número de “gaps” formados interferia negativamente por obrigar a restrição do tamanho das sequências mais longas e assim, reduzindo a confiabilidade do agrupamento.

**Tabela 4.** Identificação de 27 isolados bacterianos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* Walp) isolados de áreas com diferentes usos terra de Juazeiro BA por meio de comparações de sequências da região intergênica 16S-23S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados do GenBank.

Isolates	Genotype	Growth time/ pH reaction*	Land use**	RFLP-IGS groups	Best correspondence	Similarity (%)	Tamanho do fragmento (Pb)
<b>ESA 366</b>	BRS Pujante	L/N	AGROE	24	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	98	955
<b>ESA 367</b>	BRS Pujante	I/N	AGROE	17	<i>Microvirga ossetica</i> V5/3M <sup>T</sup>	87	776
<b>ESA 371</b>	BRS Pujante	L/AL	AGROE	7	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	99	958
<b>ESA 375</b>	BRS Pujante	I/N	AGROE	21	<i>B. yuanmingense</i> BR 3267	99	1004
<b>ESA 383</b>	BRS Pujante	L/AL	AGROE	19	<i>B. yuanmingense</i> BR 3267	99	1031
<b>ESA 387</b>	Canapu Ligeiro	L/AL	AGROE	25	<i>B. yuanmingense</i> BR 3267	99	920
<b>ESA 389</b>	Canapu Ligeiro	I/N	AGROE	16	<i>B. yuanmingense</i> BR 3267	99	912
<b>ESA 390</b>	Canapu Ligeiro	I/AL	AGROE	22	<i>B. yuanmingense</i> BR 3267	99	940
<b>ESA 385</b>	Canapu Ligeiro	L/N	CAAT	18	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	99	911
<b>ESA 388</b>	Canapu Ligeiro	L/AL	CAAT	13	<i>B. canariense</i> CCBAU 51257	99	963
<b>ESA 364</b>	BRS Pujante	L/AL	C-ceb	12	<i>B. elkanii</i> <sup>T</sup>	95	863
<b>ESA 376</b>	Canapu Ligeiro	L/AL	C-ceb	18	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	99	949
<b>ESA 377</b>	BRS Pujante	L/N	C-ceb	11	<i>B. elkanii</i> CI-19F	99	883
<b>ESA 378</b>	BRS Pujante	I/N	C-ceb	12	<i>B. elkanii</i> CI-1	99	1007
<b>ESA 386</b>	Canapu Ligeiro	L/AL	C-ceb	18	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CI-41	97	921
<b>ESA 373</b>	BRS Pujante	L/N	MC	20	<i>B. vignae</i> 7-2 <sup>T</sup>	91	1035

<b>ESA 380</b>	Canapu Ligeiro	L/N	SEQ	18	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	99	950
<b>ESA 365</b>	BRS Pujante	L/AL	SEQ-N	30	<i>B. canariense</i> CCBAU 51257	94	851
<b>ESA 369</b>	BRS Pujante	L/N	SEQ-N	3	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	99	1075
<b>ESA 370</b>	BRS Pujante	L/N	SEQ-N	1	<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 <sup>T</sup>	99	1038
<b>ESA 374</b>	BRS Pujante	L/AL	SEQ-N	12	<i>B. elkanii</i> <sup>T</sup>	95	898
<b>ESA 382</b>	Canapu Ligeiro	I/N	SEQ-N	18	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	98	975
<b>ESA 368</b>	BRS Pujante	I/AL	UNEB	20	<i>B. yuanmingense</i> BR 3267	100	1074
<b>ESA 372</b>	Canapu Ligeiro	L/N	UNEB	15	<i>B. canariense</i> CCBAU 51257	94	874
<b>ESA 379</b>	BRS Pujante	L/AL	UNEB	6	<i>B. yuanmingense</i> BR 3267	100	843
<b>ESA 381</b>	Canapu Ligeiro	L/N	UNEB	12	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 <sup>T</sup>	99	920
<b>ESA 384</b>	Canapu Ligeiro	L/AL	UNEB	18	<i>B. yuanmingense</i> BR 3267	99	905

\* Slow time of growth (L) ou intermediate (I) e Alkaline pH reaction (AL) ou neutral (N) of the isolates characterized in YMA culture medium with bromothymol blue dye.

\*\*Área com cultivo de feijão-caupi na entrelinha de manga (MC); área feijão-caupi em rotação de cultivo com cebola (C-ceb), cultivo agroecológico do IRPAA (AGROE), área experimental da UNEB (UNEB), área de feijão-caupi cultivado em sequeiro com adubação nitrogenada (SEQ-N), área de feijão-caupi cultivado em sequeiro sem adubação nitrogenada (SEQ) e vegetação nativa de caatinga (CAAT).

Os isolados 259, 46, 68, 302, 306, 249, 107, 201 e 72 mostraram-se próximos da estirpe tipo *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071<sup>T</sup>, com similaridade variando de 98 a 99%. Essa estirpe foi isolada da leguminosa com tolerância a seca *Lespedeza* spp. e descrita como capaz de nodular com feijão-caupi (Yao *et al.*, 2002). Diversas estirpes desta espécie são capazes de nodular o feijão-caupi com destaque para a estirpe BR 3267, utilizada como inoculante comercial para o feijão-caupi no Brasil (Martins *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2017). Os isolados com alta similaridade com o *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 mostraram similaridade variando de 99% a 100%. No entanto, nenhum dos isolados apresentou cobertura maior que 89% das sequências, havendo a possibilidade dos isolados serem variações da BR 3267, uma vez que essa estirpe foi isolada da mesma região de origem dos isolados estudados neste trabalho.

Ainda no clado *B. japonicum*, o isolado 92 teve como melhor correspondência a estirpe tipo *Bradyrhizobium vignae* 7-2<sup>T</sup> com 91% de similaridade. Essa estirpe foi isolada de feijão-caupi só que em solo da Namíbia (Grönemeyer *et al.*, 2016). Segundo estes autores as áreas agrícolas dessa região possuem baixa fertilidade e, normalmente, utilizam do consórcio com leguminosas de grãos e cereais para maximizar a produção. A bactéria 92 foi isolada do genótipo Canapu ligeiro uma *landrace* de feijão-caupi muito popular entre os agricultores de Juazeiro-BA e cidades circunvizinhas, cultivada em solo sob uso de consórcio com manga e feijão-caupi. Condição semelhante à condição de isolamento da estirpe tipo. Até o momento, não há registro de isolamento de estirpes similares a *B. vignae* no Brasil. O isolamento geográfico entre estas regiões com bactérias relativamente próximas, apesar de uma similaridade de apenas 91%, indica que o isolado 92 possa pertencer uma nova espécie brasileira de *Bradyrhizobium*.

Os isolados 35 e 74 apresentaram 100% de similaridade entre eles, embora façam parte de diferentes grupos do RFLP-IGS. Quando as sequências do isolado 35 e 74 foram comparadas foi possível agrupa-las a 94% de similaridade com a estirpe tipo *B. canariense* CCBAU 51257<sup>T</sup>. Alta similaridade também foi constatada quando confrontamos as sequências do isolado 331 e a estirpe tipo *B. canariense* CCBAU 51257<sup>T</sup> com bootstrap de 100%, o que indica que, apesar desse alinhamento fornecer uma cobertura baixa quando a sequência foi comparada com aquelas disponíveis no GenBank, a combinação possui alta confiabilidade.



**Figura 13.** Phylogenetic tree of IGS sequences of isolates obtained from cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.) nodules, using Neighbor Joining grouping method and bootstrap adjusted for 1000 replicates with values greater than 49% are not showed.

Apenas cinco isolados dos avaliados neste trabalho apresentaram similaridade com o clado II *Bradyrhizobium elkanii*. (Figura 13). Os isolados 118, 125, 01, 93 e 70 associados a esse clado pertencem a três diferentes grupos do IGS-RFLP, grupo 11, 12 e 1, sendo apenas o isolado 70 pertencente ao grupo 1. O isolado 118 apresentou 99% de similaridade com a referência *Bradyrhizobium elkanii* CI-19F com suporte do bootstrap de 100%. Já os isolados 125, 01, 93 e 70 apresentaram alta similaridade com a estirpe tipo *Bradyrhizobium ferriligni* CCBAU 51502<sup>T</sup> e a referência *Bradyrhizobium elkanii* CI-1A, bem com a estirpe tipo *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76<sup>T</sup>.

De modo geral, fica claro o predomínio do clado I *B. japonicum* entre os isolados avaliados assim como relatado por outros autores estudando a diversidade de rizóbios associados ao feijão-caupi (Sarr *et al.*, 2011; Chidebe *et al.*, 2017), conforme já observado em outros estudos de diversidade de *Bradyrhizobium* no Semiárido Brasileiro (Santos *et al.*, 2017).

Na área de sequeiro sem adubação mineral, foi possível identificar isolados próximo a *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071<sup>T</sup> ou com a estirpe referência BR 3267 (*Bradyrhizobium yuanmingense*), aprovada para uso como inoculante para feijão-caupi, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA). Na área de cultivo agroecológico, cultivado com Crotalária, houve a presença de dois gêneros *Bradyrhizobium* e *Microvirga*, no entanto, a maioria dos isolados foram identificados no gênero *Bradyrhizobium*.

Na área de Caatinga, os dois isolados (331 e 302) representantes foram relacionados ao clado *B. japonicum*: *Bradyrhizobium canariense* CCBAU 51257 e *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071<sup>T</sup>.

O gênero *Microvirga* possui espécies descritas como fixadora de nitrogênio atmosférico, dentre elas há espécies que estabelecem simbiose com leguminosas arbóreas (Ardley *et al.*, 2012) e de grãos como a *Microvirga vignae*, isolada de nódulos de feijão-caupi em solos de Canindé de São Francisco, no Estado de Sergipe (Radl *et al.*, 2014). Apesar desta espécie ter sido isolada de amostras de solo da região, o isolado 49 de área sob manejo agroecológico, mostrou-se 87% semelhante a estirpe tipo de *Microvirga osseptica* V5/3M<sup>T</sup>, estirpe isolada recentemente de solo no norte da Rússia (Safronova *et al.*, 2017).

A baixa similaridade do isolado 49 com a estirpe russa de *M. ossetica* (87%) e a baixa cobertura de sequências de *Microvirga* spp. e outras bactérias se deve ao fato de haver poucas sequências da região intergênica 16-23S no banco de dados, tanto que a sequência do isolado 49 alinhou com a região intergênica de *M. ossetica* V5/3M<sup>T</sup> depositada a partir do sequenciamento do genoma completo no GenBank. A baixa cobertura (aproximadamente 300 pb) se deve ao alinhamento apenas da porção do gene 16S rRNA na região 5' da sequência alinhada. Entretanto, a possibilidade de termos um isolado pertencente a uma nova espécie de *Microvirga* em nossa coleção não deve ser descartada e merece ser investigada.

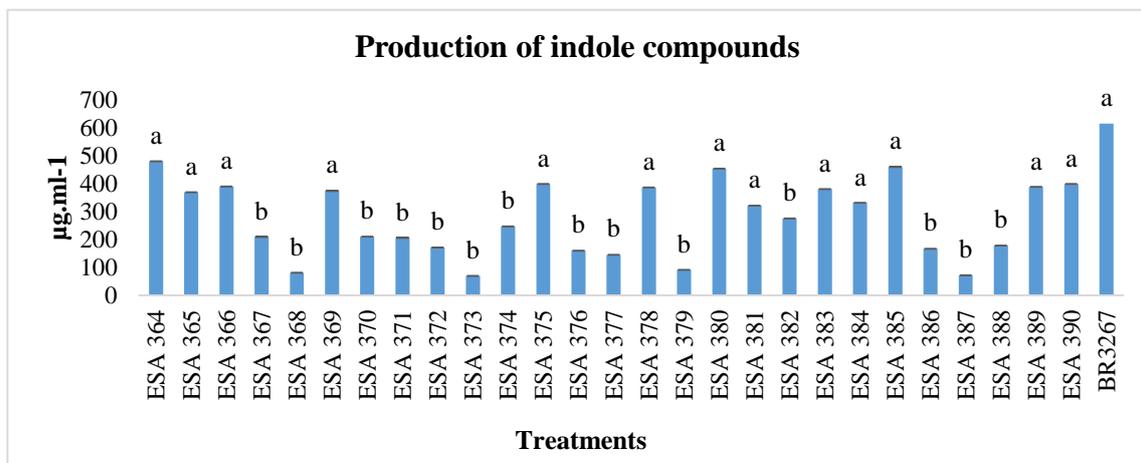
Quando em simbiose com a planta hospedeira, bactérias do solo, como os rizóbios, são capazes de beneficiar a planta através de mecanismos que visam fornecer nutrientes (fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato), tolerância a estresses abióticos e produção de compostos indólicos que estimulam o crescimento das plantas (Souza *et al.*, 2015).

Os isolados foram testados quanto à capacidade de produzir sideróforos, no entanto, foi constatado que eles não possuem esses mecanismos de promoção de crescimento. A falta da capacidade de produzir sideróforos não é um indicativo de que esses isolados sejam pouco competitivos e/ou eficientes na promoção do crescimento. No solo, diversos microorganismos produzem sideróforos e o gênero *Bradyrhizobium* já foi identificado como produtores destes quelantes de ferro (Plessner; Klapatch; Guerinot; 1993). Assim como para produção de sideróforos, os isolados testados não foram capazes de solubilizar fosfato, mas formaram colônia no meio.

Os isolados testados e a referência BR 3267 sintetizaram os compostos indólicos na presença de triptofano (Figura 14). Os tratamentos 249, 299, 35, 69, 264, 125, 332, 46, 96, 341, 201, 302 e 1 foram estatisticamente superiores juntamente com a referência BR3276 aos demais tratamentos (Figura 14) com os valores sintetizados variando de 69,53 mg/L a 614,42mg/L.

Costa *et al.* (2013) relataram que bactérias isoladas de feijão-caupi foram capazes de sintetizar compostos indólicos na presença de triptofano e que a síntese não depende apenas dos isolados, mas também do meio utilizado para o crescimento dos mesmos, uma vez que houve uma redução na síntese dos compostos indólicos quando o teste foi realizado em meio DYGS. Dessa forma, é possível que os valores encontrados neste estudo podem ter subestimado o potencial dos isolados para esse mecanismo de promoção de crescimento. A produção dos compostos indólico em meio de cultura por rizóbios pode ser relacionada com a capacidade de promoção do crescimento em experimentos de inoculação (Brígido *et al.*, 2017). Dessa forma, a elevada produção dos compostos indólicos por ao menos 13 isolados

obtidos neste estudo apontam para o seu potencial para a promoção do crescimento vegetal em feijão-caupi.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Figura 14:** Production of indole compounds in the presence of tryptophan by cowpea nodule isolates from Juazeiro-BA areas.

Quanto a tolerância dos isolados a diferentes concentrações de NaCl, foi possível constatar a presença de 7 grupos, considerando a comparação das médias (Tabela 5) na concentração 1%, onde o melhor resultado foi verificado para o isolado 140 com valores médios próximos ao controle YMA padrão (tabela 5). Os tratamentos BR 3267, 331, 49, 324 e 70 também apresentaram capacidade de crescer em meio com 1% de NaCl, representando o segundo grupo capaz de suportar a condição imposta. Os demais isolados se dividiram em outros 4 grupos, sendo grupo 3 com 5 (96, 66, 69, 125 e 332) isolados, grupo 4 com 11 (35,46, 72, 92, 107, 118, 264, 299, 306 e 341) isolados, 5 com 5 (74, 93, 201, 259 e 302) isolados e o 6 com 1 único isolado (01).

**Table 5:** Tolerance of isolates from cowpea nodules under different concentrations of NaCl and acidic and alkaline pH.

Treatments	Tolerance					
	NaCl			pH		
	1%	2%	3%	4,0	7,0	10
ESA 364	0,19f	0,4d	0,36e	0,32f	0,44e	0,12e
ESA 365	0,39d	0,5d	0,58d	0,74d	0,78c	0,86d
ESA 366	0,35d	0,7c	0,85b	0,13g	1,31a	1,29b
ESA 367	0,64b	0,8b	0,66b	0,62d	1,23b	1,3b
ESA 368	0,47c	0,6c	1,06a	0,3f	1,2b	1,12c
ESA 369	0,55c	0,8b	0,59c	0,84c	1,22b	1,44a
ESA 370	0,67b	0,6c	0,66c	0,49e	1,27b	1,26b
ESA 371	0,41d	0,7c	0,6c	1,02b	1,4a	1,33b
ESA 372	0,31e	0,5d	0,53c	0,56e	1,15b	1,18c
ESA 373	0,41d	0,5d	0,49d	0,51e	0,68c	0,87d
ESA 374	0,26e	0,4d	0,48d	1,18a	1,35a	1,36b
ESA 375	0,45c	0,7c	0,62c	0,18g	1,1b	1,4a
ESA 376	0,42d	0,7c	0,65c	0,91c	1,49a	1,41a
ESA 377	0,4d	0,6c	0,66c	0,7d	1,52a	1,52a
ESA 378	0,45c	0,5d	0,55c	0,24f	1,43a	1,43a
ESA 379	1,15a	1,3a	1,32a	1,15a	1,37a	1,42a
ESA 380	0,26e	0,3d	0,34e	0,11g	0,12d	0,14e
ESA 381	0,66b	0,7c	0,7c	0,47e	1,44a	1,36b
ESA 382	0,32e	0,4d	0,39d	0,13g	1,03b	1,09c
ESA 383	0,41d	0,6c	0,64c	0,34f	1,49a	1,45a
ESA 384	0,37d	0,7c	0,58c	0,32f	1,44a	1,29b
ESA 385	0,26e	0,5d	0,51d	0,33f	1,31a	1,42a
ESA 386	0,37d	0,5d	0,43d	0,79c	1,42a	1,12c
ESA 387	0,61b	0,7c	0,68c	0,27f	1,49a	1,4a
ESA 388	1,04b	1b	0,83b	1b	1,1b	1,12c
ESA 389	0,48c	0,5d	0,56c	0,28f	1,51a	1,43a
ESA 390	0,38d	0,5d	0,74c	0,25f	1,39a	1,42a
BR 3267	0,97b	1,1a	1,11a	1,37a	1,36a	1,29b
%CV	2,5	4,2	3,73	4,35	3,52	1,69

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Foram formados 4 grupos quanto a tolerância dos isolados a 2% de NaCl. Para essa concentração, os tratamentos 140 e BR 3267 apresentaram melhores resultados, sendo significativamente iguais a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Os 12 tratamentos com as menores médias, significativamente inferiores a 2%, também apresentaram limitação de crescimento na concentração 3%. O isolado 140 foi capaz de crescer até 3% de NaCl.

Raza *et al.* (2001) relatam o decréscimo no crescimento de isolados do gênero *Bradyrhizobium* com o aumento da concentração de NaCl. Esse comportamento foi visto em alguns isolados do presente trabalho, mas para esse experimento não é possível destacar esse comportamento como padrão. Talvez, a concentração 3% não tenha sido suficiente para avaliar a tolerância desses isolados às condições de estresse salino. Além disso, é possível que a tolerância ao estresse salino esteja mais ligada a características específicas de cada isolado (Dong *et al.*, 2017).

Os isolados 140, 66, 249, 299 e 74 são oriundos na mesma área de uso de solo (UNEB), entretanto, apresentaram comportamento diferente sob a condição de estresse de NaCl. Para essa área os melhores desempenhos foram encontrados nos isolados 140 e 66, mostrando que mesmo sendo oriundo de um mesmo uso de solo os isolados podem mostrar comportamentos diferentes sob condição de estresse.

Os isolados 331, BR 3267, 140, 35, todos do clado *B. japonicum*, apresentaram menor variação de crescimento quando sob estresse, o que demonstra a maior adaptabilidade às condições de estresse salino. Segundo Abdelmoumen *et al.*, (1999), a condição de estresse oferecida às bactérias em condições com diferentes concentrações de NaCl é capaz de estimar a tolerância dessas bactérias ao estresse salino.

A capacidade de tolerar condições de estresse salino é frequentemente correlacionada com a origem dos isolados (Xavier *et al.*, 2007; Cardoso, Feitas e Figueira 2014). Os resultados deste trabalho indicam não haver uma ligação direta entre o uso da terra de onde a bactéria foi isolada e tolerância desses isolados ao estresse salino. Exceto para os isolados 35 e 331 com maior destaque, esses dois isolados sofreram menor limitação de crescimento nas diferentes concentrações do NaCl e são oriundos de áreas de sequeiro, ou seja, com restrição hídrica por longos períodos do ano (SEQ-N e CAAT). Apesar disso, esse padrão não foi visto em todos os isolados oriundos de áreas sob estresse.

Rizóbios com maior tolerância ao estresse salino podem apresentar maior eficiência simbiótica sob condições de estresse (Dong *et al.*, 2017). Em outra abordagem, bactérias promotoras de crescimento de não leguminosas apresentaram correlação negativa entre a capacidade de promoção do crescimento e tolerância a estresse salino (Lima *et al.*, 2018). Dessa forma a avaliação da capacidade de tolerar estresses abióticos devem ser relacionadas à sua eficiência simbiótica criteriosamente.

A inoculação dos isolados em meio YM com pH 4 apresentou maior limitação no crescimento dos isolados, ao se comparar com o pH 10. Os tratamentos 140, 96 e BR 3267 apresentaram maior crescimento do que os demais tratamentos DO<sub>620</sub> 1,14; 1,18 e 1,37,

respectivamente. A sensibilidade dos isolados ao pH 4, traduzida aqui pela menor leitura de densidade óptica, pode indicar que esses isolados apresentariam limitações de desenvolvimento em solos afetados por pH ácido.

O pH 10 parece não ter afetado o crescimento dos isolados. Apesar disso, houve diferença significativa entre os tratamentos. Dos isolados testados, 11 apresentaram-se estatisticamente superiores ao demais, sendo o melhor grupo dos 5 formados. A maior limitação do crescimento foi constatada para os tratamentos 01 e 201.

Neste trabalho não houve relação direta entre o pH dos solos de origem dos isolados e a tolerância dos mesmos ao pH 10, dentre os isolados mais tolerantes a esse pH está o isolado 302 de área de Caatinga com pH 5,3.

Todos os isolados apresentaram formação de biofilme em meio YM com pH 7,0, havendo a formação de 3 grupos diferentes a 5 % de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Os tratamentos 72, 70, 201 e 118 foram capazes de produzir mais biofilme, sendo significativamente superiores aos demais tratamentos.

A formação de biofilme sob condições de estresse abiótico foi testada para todos os isolados. Em pH ácido (4,0), não houve diferença significativa entre os tratamentos. Já com o aumento do pH para 10 os tratamentos mostraram diferenças a 5% de probabilidade (Tabela 6), com destaque para os isolados 118 e 69 por mostrarem resultados superiores aos demais. Seguidos de seis isolados 49, 66, 201, 140 e a BR 3267.

A produção de biofilme por micro-organismos é uma estratégia que visa proteger e/ou auxiliar os micro-organismos sob condições de estresse (Nocelli *et al.*, 2016), além de ser imprescindível para o desencadeamento de diversos processos ecológicos na interação planta-micro-organismos, como a formação de nódulos, por exemplo (Wang *et al.*, 2008).

**Table 6:** Average values of biofime production by isolates of cowpea nodules under different concentrations of NaCl and acidic and alkaline pH.

Isolates	Biofilm formation					
	NaCl			pH		
	1%	2%	3%	4,0	7,0	10
ESA 364	0.8660d	0.8696b	0.8669a	0.8665a	0.8664c	0.8664c
ESA 365	0.8666d	0.8669c	0.8672a	0.8665a	0.8665c	0.8664c
ESA 366	0.8662d	0.8661c	0.8668a	0.8662a	0.8667c	0.8668c
ESA 367	0.8683b	0.8671c	0.8670a	0.8668a	0.8665c	0.8672b
ESA 368	0.8675b	0.8718a	0.8666a	0.8666a	0.8669c	0.8673b
ESA 369	0.8662c	0.8704b	0.8666a	0.8661a	0.8666a	0.8679a
ESA 370	0.8690a	0.8666c	0.8666a	0.8666a	0.8665c	0.8664c
ESA 371	0.8697a	0.8691b	0.8672a	0.8668a	0.8678a	0.8663c
ESA 372	0.8697a	0.8695b	0.8671a	0.8663a	0.8672b	0.8664c
ESA 373	0.8681b	0.8689b	0.8668a	0.8667a	0.8667c	0.8667c
ESA 374	0.8689b	0.8667c	0.8666a	0.8668a	0.8666c	0.8665c
ESA 375	0.8686b	0.8689b	0.8668a	0.8667a	0.8667c	0.8667c
ESA 376	0.8670c	0.8670c	0.8665a	0.8662a	0.8663c	0.8664c
ESA 377	0.8692a	0.8682c	0.8666a	0.8666a	0.8681a	0.8678a
ESA 378	0.8700a	0.8704b	0.8666a	0.8667a	0.8669c	0.8665c
ESA 379	0.8663d	0.8667c	0.8668a	0.8667a	0.8668c	0.8669b
ESA 380	0.8688b	0.8694b	0.8668a	0.8671a	0.8678a	0.8670b
ESA 381	0.8677b	0.8695b	0.8667a	0.8665a	0.8666c	0.8664c
ESA 382	0.8665d	0.8669c	0.8667a	0.8663a	0.8667c	0.8662c
ESA 383	0.8665d	0.8674c	0.8667a	0.8661a	0.8666c	0.8660c
ESA 384	0.8682b	0.8691b	0.8668a	0.8668a	0.8666c	0.8666c
ESA 385	0.8672b	0.8720a	0.8675a	0.8666a	0.8668c	0.8665a
ESA 386	0.8664d	0.8694b	0.8665a	0.8668a	0.8668c	0.8663a
ESA 387	0.8684b	0.8670c	0.8666a	0.8664a	0.8665c	0.8665a
ESA 388	0.8687b	0.8696b	0.8668a	0.8671a	0.8668c	0.8665c
ESA 389	0.8666d	0.8667c	0.8667a	0.8670a	0.8667c	0.8666c
ESA 390	0.8688b	0.8694b	0.8666a	0.8665a	0.8669c	0.8664c
BR 3267	0.8661b	0.8665c	0.8667a	0.8670a	0.8672b	0.8670b
%CV	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em diferentes concentrações de NaCl a formação de biofilme foi estatisticamente igual a 3% de NaCl para todos os tratamentos. A formação de biofilme na concentração de 1% possibilitou a formação de 5 grupos. Os tratamentos 118, 125, 74, 70 e 72 apresentaram resultados superiores aos demais e, ainda, superiores ao encontrado sob condições ideais para

o crescimento dos isolados (YMA padrão). Comportamento semelhante também foi verificado para os mesmos isolados na concentração de 2% de NaCl. Possivelmente a maior produção de biofilme sob condições de estresse pode ser uma resposta fisiológica das bactérias ao estresse.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a concentração de 3% de NaCl, entretanto, os isolados sob essa concentração apresentaram médias inferiores às observadas na concentração de 2%, indicando que a concentração de 3% limitou o crescimento dos isolados. Exceto para os isolados 70, 72, 107, 125, 140 e a referência BR 3267 com médias de crescimento maiores do que as obtidas a 2%.

O principal componente do biofilme são os exopolissacarídeos que podem envolver as bactérias numa região protegida dos estresses (Souza; Ambrosini; Passaglia; 2014). A mudança na taxa de crescimento, observado a partir da redução das densidades ópticas das bactérias em meio YM sem alterações das características, aumenta a produção de exopolissacarídeos, o que representa uma estratégia de sobrevivência que é desencadeada sob condição de estresse ambiental (Bogino; Sorroche, Giordani, 2013) seja ela salinidade ou pH (meio ácido ou alcalino). Situação evidenciada nos testes de formação de biofilme a diferentes pHs e concentrações de NaCl, sendo mais representativo no teste sob estresse salino.

No teste de eficiência simbiótica, todas as variáveis analisadas nesse experimento foram significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott, exceto a variável número de nódulos como pode ser visto na tabela 6. Os 29 tratamentos inoculados foram capazes de nodular sem aparente limitação. Nenhum dos tratamentos controle, nitrogenado ou absoluto, apresentaram nodulação, confirmando as condições assépticas do experimento.

Quanto à massa de nódulos secos (MNS), houve diferenças significativas entre os tratamentos inoculados. Os tratamentos 118, 1, 125, 306 (C-ceb), 249, 299, 140 (UNEB), 264, 341, 96, 49 (AGROE), 46(SEQ) 70, 93(SEQ-N) e BR 3267 foram significativamente superiores aos demais tratamentos, incluindo a estirpe referência ESA 17 (Tabela7). Do mesmo modo, Marinho *et al.* (2017) relataram maior massa de nódulos secos para BR 3267 quando comparada com a ESA 17.

As maiores médias de massa da parte aérea seca não mostraram diferenças significativas quando comparadas aos tratamentos com as referências BR 3267, ESA 17 e o tratamento suplementado com nitrogênio (80 kg/ha de N). Somente oito dos isolados testados apresentaram menor MPAS do que o controle nitrogenado. Das vinte e sete bactérias testadas, dezenove não diferiram dos tratamentos controles citados acima. Os tratamentos com desempenho intermediários foram 118, 1 (C-ceb), 35, 259,70 (SEQ-N), 49 (AGROE), e 92

(MC). A MPAS variou de 0,79 a 1,62 g, sendo a menor média do tratamento controle absoluto e a maior do tratamento inoculado com o isolado 69 (SEQ-N).

Feijão-caupi é frequentemente relatado na literatura como promíscuo, no entanto, quando em simbiose com isolados do gênero *Bradyrhizobium* há resultados superiores nas variáveis de acúmulo de biomassa (Zilli *et al.*, 2004). A alta similaridade da estirpe tipo *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071<sup>T</sup> com a BR 3267 (*B. yuanmingense*) podem justificar o comportamento significativamente iguais da maioria dos isolados testados nesse estudo.

Com relação ao acúmulo e o teor de nitrogênio na parte aérea seca, tanto os tratamentos inoculados com as referências BR 3267 e ESA 17, quanto com suplementação de N não diferiram estatisticamente dos tratamentos inoculados, exceto para a inoculação com 118, 93 e 70, representantes do clado *B. elkanii* que apresentaram médias significativamente inferiores, além das médias observadas em plantas inoculadas com o isolado 35 que, é próximo à estirpe tipo de *B. canariense* do clado *B. japonicum*. A maior média de TNPA e ANPA foi para o isolado 125, sendo este tratamento aproximadamente 14% maior do que o tratamento suplementado com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> nitrogenado. Assim como os tratamentos 118, 93 e 70, o 125 teve sua melhor correspondência com o clado *B. elkanii*, no entanto, diferentemente dos outros representantes desse clado, obteve melhor eficiência simbiótica em associação com feijão-caupi.

Os tratamentos 125, 107 (C-ceb), 66, 74 (UNEB), 69, 259 (SEQ-N), 72, 324 (AGROE), 201 (SEQ), 331 (CAAT) e ESA17 apresentaram melhor desempenho no parâmetro eficiência nodular (EN), apresentando diferença estatística. Os isolados 118, 93 e 70 foram aqueles que apresentaram menor eficiência nodular. A eficiência nodular intermediária foi constatada na maioria dos tratamentos testados, bem como no tratamento referência BR 3267. Melo e Zilli, (2010) relataram que a cultivar Pretinho precoce quando associada com a BR 3262 apresentou maior eficiência nodular do que quando inoculada com a BR 3267. A baixa eficiência nodular pode indicar baixa especificidade entre planta hospedeira e o inoculante, ou comprometimento da FBN nas condições testadas. Os isolados com EN significativamente iguais ao tratamento com a BR 3267, ainda podem ser considerados com alto potencial de fixação de N uma vez que apresentaram resultado semelhante ao de uma estirpe recomendada para essa cultura.

De acordo com Pule-Meulenberg *et al.* (2010) existe uma relação direta entre o NN e MNS e o ANPA, TNPAS e MPAS. Porém, nesse trabalho as maiores médias de NN e MNS não garantiram maior ANPAS ou TNPAS, bem como a menor média de NN não prejudicou o

desempenho simbiótico dos isolados. Os resultados observados pelos autores podem se dever à grande variabilidade da eficiência dos isolados observada em seu estudo. No presente trabalho, todas as bactérias foram eficientes simbioticamente, pois incrementaram o N em comparação com o tratamento controle absoluto. Possivelmente por este motivo, pela falta de uma grande amplitude de eficiência, a correlação positiva entre os parâmetros de nodulação e o N acumulado não puderam ser observados.

Todos os isolados avaliados no experimento de eficiência simbiótica proporcionaram ganhos no acúmulo de nitrogênio. O isolado 118 que proporcionou menor incremento no ANPA no feijão-caupi acumulou 198% a mais de nitrogênio na parte aérea quando comparado ao tratamento controle sem adição de nitrogênio mineral, já o tratamento inoculado com maior ANPA (isolado 125), incrementou mais de 650% de nitrogênio quando comparado ao tratamento sem inoculação e sem suplementação mineral e mais de 14% quando comparado com o tratamento nitrogenado ( $80 \text{ kg.ha}^{-1}$  de N). Apesar desse experimento não avaliar produtividade os incrementos no acúmulo de N no feijão-caupi, nos permite inferir que o uso dos isolados nativos de solos agrícolas e da Caatinga de Juazeiro-BA possuem grande potencial biotecnológico.

**Table 7:** Mean values of total dry matter (TDM), dry shoot matter (DSM), dry root matter (DRM), dry nodule matter (DNM), number of nodules (NN), total dry nitrogen content (TDNC), nitrogen accumulation in the dry shoot (NADS) and nodular efficiency (NE) of cowpea (*Vigna unguiculata* Walp) isolates.

Tratament	TDM	DSM G	DRM	DNM Mg	NN nodules.plant <sup>-1</sup>	TDNC % ou g.kg	NADS mg.plant <sup>-1</sup>	NE mgN.mg nod <sup>-1</sup>
ESA 364	2,62 a	1,11 b	1,38 a	241,25 a	139,25 a	34,71 a	347,17 a	1,45 b
ESA 365	2,27 b	1,18 b	1,00 b	175,00 b	146,50 a	29,93 b	299,30 b	1,71 b
ESA 366	2,60 a	1,37 a	0,85 b	227,50 a	124,66 a	47,68 a	476,82 a	2,36 b
ESA 367	2,59 a	1,10 b	1,25 a	238,50 a	161,33 a	37,32 a	373,24 a	1,54 b
ESA 368	2,78 a	1,45 a	1,11 b	192,50 b	132,33 a	48,45 a	484,50 a	2,52 a
ESA 369	2,94 a	1,62 a	1,12 b	198,50 b	122,50 a	54,78 a	547,90 a	2,67 a
ESA 370	2,34 b	0,97 b	1,08 b	299,75 a	177,50 a	31,61 b	316,12 b	1,13 c
ESA 371	2,58 a	1,38 a	1,14 b	169,50 b	149,33 a	49,23 a	492,37 a	2,91 a
ESA 372	2,66 a	1,51 a	0,94 b	169,33 b	172,75 a	55,87 a	558,72 a	3,46 a
ESA 373	2,34 b	1,21 b	1,11 b	214,00 b	185,75 a	44,04 a	440,42 a	2,13 b
ESA 374	2,35 b	1,09 b	1,00 b	357,66 a	207,75 a	29,18 b	291,79 b	0,83 c
ESA 375	2,53 a	1,40 a	0,90 b	224,00 a	190,75 a	48,57 a	485,75 a	2,20 b
ESA 376	2,60 a	1,42 a	1,43 a	162,50 b	100,75 a	45,21 a	452,07 a	2,73 a
ESA 377	1,85 c	1,06 b	0,85 b	230,16 a	139,50 a	23,50 b	232,79 b	1,00 c
ESA 378	2,94 a	1,56 a	1,16 b	240,66 a	139,00 a	59,11 a	591,09 a	2,48 a
ESA 379	3,02 a	1,44 a	1,06 b	246,25 a	135,00 a	53,30 a	533,01 a	2,27 b
ESA 380	2,48 a	1,26 a	1,04 b	185,25 b	99,75 a	46,81 a	468,10 a	2,59 a
ESA 381	2,54 a	1,36 a	0,95 b	240,00 a	129,33 a	53,60 a	535,99 a	2,25 b
ESA 382	2,37 b	1,12 b	1,06 b	163,00 b	157,25 a	42,83 a	428,34 a	2,61 a
ESA 383	2,86 a	1,36 a	1,32 a	282,75 a	199,25 a	43,61 a	436,17 a	1,58 b
ESA 384	2,67 a	1,43 a	1,00 b	229,25 a	163,00 a	48,71 a	487,10 a	2,26 b
ESA 385	2,72 a	1,35 a	1,28 a	204,50 b	155,00 a	37,02 a	370,19 a	1,80 b
ESA 386	2,27 b	1,28 a	0,81 b	216,66 a	194,75 a	43,43 a	434,33 a	2,02 b
ESA 387	3,47 a	1,33 a	1,57 a	204,75 b	144,00 a	46,37 a	463,67 a	2,54 a
ESA 388	2,98 a	1,50 a	1,28 a	188,75 b	125,33 a	56,18 a	561,85 a	3,04 a
ESA 389	3,33 a	1,39 a	1,72 a	215,25 b	139,00 a	42,48 a	424,83 a	2,43 b
ESA 390	3,06 a	1,54 a	1,30 a	219,00 a	149,25 a	50,08 a	500,80 a	2,32 b
BR 3267	3,36 a	1,54 a	1,34 a	326,33 a	166,66 a	55,80 a	558,05 a	1,71 b
ESA 17	3,15 a	1,39 a	1,58 a	171,25 b	142,00 a	50,33 a	502,98 a	3,14 a
Testemunha nitrogenada	2,96 a	1,29 a	1,66 a	0 c	0 b	51,64 a	516,45 a	-
Testemunha absoluta	1,36 c	0,79 c	0,56 b	0 c	0 b	7,81 c	78,13 c	-
%CV	20,76	5,59	15,74	16,52	15,00	14,26	15,08	11.54

Médias seguidas da mesma letra dentro de cada coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

## 5- CONCLUSÕES

Os diferentes usos de solos agrícolas e área de Caatinga apresentaram grande diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio de nódulos de feijão-caupi. Foi possível identificar isolados com alta eficiência simbiótica, capacidade de tolerar 3% de NaCl, pH ácido e alcalino, sintetizar compostos indólicos e formar biofilme em condição de estresse salino e de pH *in vitro* indicando que estes solos são um repositório de bactérias eficientes simbioticamente e com características bioquímicas peculiares;

Os isolados oriundos das áreas estudadas mostraram similaridade com *Bradyrhizobium* e *Microvirga* e muitos isolados, pelas suas características bioquímicas e moleculares, podem pertencer a novos *taxa* de rizóbio.

## 6- REFERÊNCIAS

- ABDELMOUMEN H.; FILALI-MALTOUF A.; NEYRA M.; BELABED A.; EL IDRISSEI M.M. Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmoticum. *Journal of applied microbiology*, v. 86, p. 889-98, 1999.
- ALCANTARA, M. C.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; DE MOURA ROCHA, M.; DOS SANTOS CARVALHO, J. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. *Revista Ciência Agronômica*, v. 45, p 1-9, 2014.
- ALMEIDA, A. L.; ALCANTARA, R. M.; NÓBREGA, R. S.; NÓBREGA, J. C.; LEITE, L. F.; SILVA, J. A. Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 5, p. 364-369, 2010.
- AL-SAEDI, S. A.; LAKHSSASSI, N.; KASSEM, M. A.; RAZAQ, I. B.; MEKSEM, K. Characterization of diversity of bradyrhizobia on cowpea in Iraq reveals unusual strain characteristics. *Atlas Journal of Biology*, v.14 p.392-401, 2017.
- ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES F. M.; HECKLE J. C.; MACEDO R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.41, p.449-456, 2006.
- ARAÚJO, G. J. F.; SILVA, M. M. Crescimento econômico no semiárido brasileiro: o caso do polo frutícola Petrolina/Juazeiro. *Caminhos de Geografia*, v. 14, p. 246-264, 2013.
- ARDLEY J. K.; PARKER M. A.; MEYER S. E.; TRENGOVE R. D.; O'HARA G. W. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, p. 2579–2588, 2012.
- BARBERI, A.; MOREIRA, F.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D. Growth of *Bradyrhizobium elkanii* strain BR 29 in culture media with different pH values. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, p. 397-405. 2004.
- BOGINO P. C.; OLIVA M. D.; SORROCHE F. G.; GIORDANO W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 30, p. 15838-15859, 2013.
- BOMFETI, C. A.; FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; CARDOSO, P. G.; GUERREIRO, M. C.; MOREIRA, F. M. D. S. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 35, p. 657-671, 2011.
- BRÍGIDO, C.; GLICK, B. R.; OLIVEIRA, S. Survey of plant growth-promoting mechanisms in native Portuguese chickpea *Mesorhizobium* isolates. *Microbial Ecology*, v. 73, n. 4, p. 900–915, 2017.
- BUAINAIN A. M.; GARCIA J. R. Desenvolvimento rural do semiárido brasileiro: transformações recentes, desafios e perspectivas. *Confins*, v.12, 2013
- CAO, Y.; WANG, E. T.; ZHAO, L.; CHEN, W. M.; WEI, G. H. Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 78, p.128-137. 2014.

CARDOSO, P.; FREITAS, R.; FIGUEIRA, E. Salt tolerance of rhizobial populations from contrasting environmental conditions: understanding the implications of climate change. *Ecotoxicology*, v. 24, p. 143-152, 2015.

CARVALHO, M.; LINO-NETO, T.; ROSA, E.; CARNIDE, V. Cowpea: a legume crop for a challenging environment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 97, p. 4273–4284, 2017.

CHAU, J. F.; BAGTZOGLOU, A. C.; WILLIG, M. R. The effect of soil texture on richness and diversity of bacterial communities. *Environmental Forensics*, v. 12, p. 333-341. 2011.

CHIDEBE, I. N.; JAISWAL, S. K.; DAKORA, F. D. Distribution and phylogeny of microsymbionts associated with cowpea (*Vigna unguiculata*) nodulation in three agro-ecological regions of Mozambique. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1700 - 1712, 2017.

CONNOR, R.; RENATA, A.; ORTIGARA, C.; KONCAGÜL, E.; UHLENBROOK, S.; LAMIZANA-DIALLO, B. M.; ZADEH, S. M.; QADIR, M.; KJELLÉN, M.; SJÖDIN, J.; HENDRY, S. The United Nations World Water Development Report. Wastewater: The Untapped Resource. 2017.

COSTA, E. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. D.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. D. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, p. 1275-1284, 2013.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S.; SILVA, A. F.; FERREIRA, V. M. L.; NÓBREGA, J. C.; MOREIRA, F. M. D. S. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 9, p. 489-494. 2014.

COSTA, E. M.; MARTINS, L. V.; SILVA, A. F. T.; AMARAL, F.H.C.; NÓBREGA, J. C. A.; NOBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; JESUS, A. A. Interação entre cepas de rizóbio e cultivares de feijão-caupi em Bom Jesus PI. In XXXIII congresso brasileiro de ciência do solo, 2011, Uberlândia, MG. Anais do XXXIII congresso brasileiro de ciência do solo. 2011.

SILVA, V. P.; PEREIRA, E. R.; AZEVEDO, P. V.; SOUSA, F. D. A.; SOUSA, I. F. Análise da pluviometria e dias chuvosos na região Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, v. 15, p. 131-138, 2011.

DANHORN T.; FUQUA C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiol*, v. 13, p. 401-422, 2007

DONG, R.; ZHANG, J.; HUAN, H.; BAI, C.; CHEN, Z.; LIU, G. High salt tolerance of a Bradyrhizobium strain and its promotion of the growth of *Stylosanthes guianensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 118, p. 1625-1633, 2017.

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

ESTÉVEZ, J.; SORIA-DÍAZ, M. E.; CÓRDOBA, F. F.; MORÓN, B.; MANYANI, H.; GIL, A.; THOMAS-OATES, J.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; DARDANELLI, M. S.; SOUSA, C.; MEGÍAS, M. Different and new nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na<sup>+</sup> stress. *FEMS Microbiology letters*, v. 293, p. 220-231, 2009.

ESTRELLA, M. J.; MUNOZ, S.; SOTO, M. J.; RUIZ, O.; SANJUÁN, J. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 1088-1098, 2009.

FAGHIRE, M.; BARGAZ, A.; FARISSI, M.; PALMA, F.; MANDRI, B.; LLUCH, C.; GARCÍA, T. N. A.; HERRERA-CERVERA, J. A.; GHOULAM, C. Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, v. 55, p. 69-75, 2011.

FAORO, H.; ALVES, A. C.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; CRUZ, L. M.; AL-JANABI, S. M.; PEDROSA, F. O. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. *Applied and environmental microbiology*, v. 76, p. 4744-4749, 2010.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; BARBOZA, J. A. C.; MARTINS, L. M. V. Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas. Semiárido-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2013.

FERREIRA, P. A. A.; BOMFETI, C. A.; SOARES, B. L.; SOUZA MOREIRA, F. M. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p. 1947-1959, 2012.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. 623, 2010.

FORTELEZA, J. M.; LEITE, L. F.C. Fixação biológica do nitrogênio em feijão-caupi: uma alternativa tecnológica para o aumento da produção no semi-árido. Disponível em: <<http://www.nordeste rural.com.br>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2017.

FREIRE FILHO F. R. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Embrapa Meio-Norte-Livro científico (ALICE). 2011.

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

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, p.1-6, 2013.

GEETHA, S. J.; JOSHI, S. J. Engineering rhizobial bioinoculants: a strategy to improve iron nutrition. *The Scientific World Journal*, v.6, 2013.

GHOSH, P. K.; MAITI, T. K. Structure of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Rhizobia and their Functions in Legume–Bacteria Symbiosis:—A Review. *Achievements in the Life Sciences*, v.10, p.136-143, 2016.

GRÖNEMEYER, J. L.; HUREK, T.; BÜNGER, W.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, p. 62-69.2016.

HARTMANN, M.; FREY, B.; MAYER, J.; MÄDER, P.; WIDMER, F. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME journal*, v. 9, n. 5, p.1177-1194, 2015.

- HERRIDGE D. F.; PEOPLES M. B.; BODDEY R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*, v.311, p. 1–18, 2008.
- HTWE, A. Z.; YAMAKAWA, T.; SARR, P. S.; SAKATA, T. Diversity and distribution of soybean-nodulating bradyrhizobia isolated from major soybean-growing regions in Myanmar. *African Journal of Microbiology Research*, v. 9, p. 2183-2196, 2015.
- ISHMAEL, F.T; STELLATO, C. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma e Immunology*, v. 101, p.437-443, 2008.
- JAISWAL, S. K.; MSIMBIRA, L. A.; DAKORA, F. D. Phylogenetically diverse group of native bacterial symbionts isolated from root nodules of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in South Africa. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 40, p.215-226, 2017.
- JARCHO, J. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Current Protocols in Human Genetics*, v. 3 p. 2-7, 2001.
- JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 32, n. 1, p. 136–139, 1982.
- KAPEMBWA, R., MWEETWA, A.M., NGULUBE, M., YENGWE, J. Morphological and Biochemical Characterization of Soybean Nodulating Rhizobia Indigenous to Zambia, *Sustainable Agriculture Research*, v.5, p.84-96, 2016.
- KURAMAE, E. E., YERGEAU, E., WONG, L. C., PIJL, A. S., VAN VEEN, J. A., KOWALCHUK, G. A. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 79, p. 12-24, 2012.
- LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. de S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupí. *Revista Ceres*, v. 51, p. 67-82, 2004.
- LAGUERRE G, NOUR SM, MACHERET V, SANJUAN J, DROUIN P, AMARGER N. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, v. 147, p.981-93, 2001.
- LEÃO É. L., MOUTINHO L., M. O arranjo produtivo local de fruticultura irrigada do vale do submédio do São Francisco como objeto de política. *RACE-Revista de Administração, Contabilidade e Economia*, v. 13, n.3, p. 829-858, 2014.
- LEITE J, SEIDO SL, PASSOS SR, XAVIER GR, RUMJANEK NG, MARTINS LM. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 33, p.1215-26, 2009.
- LIMA J. P, MIRANDA E. D. Fruticultura irrigada no Vale do São Francisco: incorporação tecnológica, competitividade e sustentabilidade. *Revista Econômica do Nordeste*, v. 32, p.11-32, 2001.
- LIMA, L M, OLIVEIRA, M. S. de, MALAQUIAS, N. A. M., DIDONET, C. C., NAVES, P. L. F. Quantificação da biomassa de biofilme formado por rizóbios In *Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE)*, vol. 2. 2015.
- LIMA, D. R. M.; SANTOS, I. B.; OLIVEIRA, J. T. C.; BARBOSA, J. G.; SILVA DINIZ, W. P.; FARIAS, A. R. B.; FREIRE, F. J.; KUKLISNKY-SOBRA, J. Tolerance of potentially diazotrophic bacteria to adverse environmental conditions and plant growth-promotion in sugarcane. *Archives of Agronomy and Soil Science*, p. 1–15, 2018.

- MAGDANOVA L. A, GOLYASNAYA, N. V. Heterogeneity as an adaptive trait of microbial populations. *Microbiology*, v. 1, p. 1-10.2013.
- MARINHO, R. D. C. N., FERREIRA, L. D. V. M., SILVA, A. F. D., MARTINS, L. M. V., NÓBREGA, R. S. A., FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. *Bragantia*, v. 76, p. 232-281, 2017.
- MARINHO, R. de C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. É., XAVIER, G. R., SANTOS, C. A. F., AIDAR, S. DE T., MARTINS, L. M. V., FERNANDES JÚNIOR, P. I. Desempenho em campo de novas cultivares de feijão-caupi inoculadas com estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio no Semiárido brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 49, p.395-402. 2014.
- MARTINS, L. M. V., XAVIER, G. R., RANGEL, F. W., RIBEIRO, J. R. A., NEVES, M. C. P., MORGADO, L. B., RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biology and fertility of soils*, v. 38, p.333-339, 2003.
- MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, p.1005–1010, 1997.
- MELO S. R, ZILLI J. É. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 29, p. 1177-1183, 2010.
- MENDES, L. W., TSAI, S. M., NAVARRETE, A. A., DE HOLLANDER, M., VAN VEEN, J. A., KURAMAE, E. E. Soil-borne microbiome: linking diversity to function. *Microbial ecology*, v. 70, n. 1, p. 255-265. 2015.
- MENEZES K.A. S., ESCOBAR I. E. C., FRAIZ A.C.R., MARTINS L. M. V., FERNANDES-JÚNIOR P.I. Genetic Variability and Symbiotic Efficiency of *Erythrina velutina* Willd Root Nodule Bacteria from the Semi-Arid Region in Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Ciências Solo*, v. 41. 2017.
- MENNA, P., BARCELLOS, F. G. HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 59, p. 2934-2950, 2009.
- MOREIRA FD. SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*; Lavras : Editora UFLA, p. 729,2006.
- MOTHAPO, N. V.; GROSSMAN, J. M.; MAUL, J. E.; SHI, W.; ISLEIB, T. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes. *Applied Soil Ecology*, v. 64, 2013.
- NISTE, M.; VIDICAN, R.; POP, R.; ROTAR, I. Stress factors affecting symbiosis activity and nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured in vitro. *ProEnvironment/ProMediu*, v. 6, p. 42-45, 2013.
- NOCELLI, N.; BOGINO, P. C; BANCHIO, E; GIORDANO, W. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia. *Materials*, v. 26, p.:412-418, 2016.
- NORRIS, D. O.; T'MANNETJE, L. 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.

NOSTRO, A.; ROCCARO A. S.; BISIGNANO G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal Med Microbiology*, v. 56, p. 519–523, 2007.

OLIVEIRA, L. de L. M. A.; SOUZA, R. C. D. Impactos socio ambientais da irrigação no submédio são francisco, municípios de juazeiro e petrolina. *Seminário Estudantil de Produção Acadêmica*, v.13.2014

ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL-HERNÁNDEZ, M. A.; LLORET, L., LÓPEZ-LÓPEZ, A.; MARTÍNEZ, J.; BAROIS, I.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Change in land use alters the diversity and composition of Bradyrhizobium communities and led to the introduction of *Rhizobium etli* into the tropical rain forest of Los Tuxtlas (Mexico). *Microbial ecology*, v. 63, n. 4, p. 822-834, 2012.

PAZ-LIMA, M. L., DA SILVA, F. C., DE JESUS SANTANA, Í., MARTINS, R. D., LEMES, N. M., RIETJENS, A. R. Quantificação da microbiota e diversidade ecológica da meso e macrofauna do solo sob diferentes usos no município de Urutaí (região Sudeste Goiano). *Multi-Science Journal*, v.1, p. 12-18, 2016.

PEIXOTO, R. S., CHAER, G. M., FRANCO, N., JUNIOR, F. R., MENDES, I. C., ROSADO, A. S. A. Decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 98, p. 403-413, 2010.

PEREIRA JÚNIOR, J. de S. Nova delimitação do semi-árido brasileiro 2007.

PIRES, R. D. C.; BUENO, F.; ZILLI, J. E.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; JAMES, E. K. Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of *Mimosa* in central Brazil. *Plant and Soil*, v. 423, p. 411–428, 2018.

PLESSNER, O.; KLAPATCH, T.; GUERINOT M. L. Siderophore utilization by *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and environmental microbiology*, v. 1, p. 1688-90. 1993

PULE-MEULENBERG, F.; BELANE, A. K.; KRASOVA-WADE, T.; DAKORA, F. D. Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. *BMC microbiology*, v. 10, p.80-89, 2010.

QURASHI, A. W.; SABRI, A. N. Osmoadaptation and plant growth promotion by salt tolerant bacteria under salt stress. *African Journal of Microbiology Research*, v. 5, p. 3546-3554, 2011.

RAZA, S.; JØRNSGÅRD, B.; ABOU-TALEB, H.; CHRISTIANSEN, J. L. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp.(Lupini) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Letters in applied microbiology*, v. 32, p. 379-383, 2001.

RIAH, N.; BÉNA, G.; DJEKOUN, A.; HEULIN, K.; LAJUDIE, P.; LAGUERRE, G. Genotypic and symbiotic diversity of *Rhizobium* populations associated with cultivated lentil and pea in sub-humid and semi-arid regions of Eastern Algeria. *Systematic and applied microbiology*, v.37, p.368-375, 2014.

RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*, v. 167, n. 2, p. 69–78, 2012

ROCHA, W. S.; SANTOS, M. M DOS; COLONIA, B S. O; CHAGAS JUNIOR, A. F. The ability of rhizobacteria to solubilize phosphate and synthesize of indoleacetic acid in cowpea. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v.13, p. 116-121, 2018.

RODRIGUES, D. R.; SILVA, A. F. da; CAVALCANTI, M. I. P.; ESCOBAR, I. E. C.; FRAIZ, A. C. R.; RIBEIRO, P. R. de A.; FERREIRA NETO, R. A.; FREITAS, A. D. S. de; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1–10, 2018.

RUFINI M, da SILVA MA, FERREIRA PA, DE SOUZA CASSETARI A, SOARES BL, DE ANDRADE MJ, DE SOUZA MOREIRA FM. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutrudox. *Biology and Fertility of Soils*. 2014 Jan 1;50(1):115-22.

RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P. Feijão-caupi tem uma nova estirpe de rizóbio, BR3267, recomendada como inoculante. *Embrapa Agrobiologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, 2006.

SAFRONOVA, V. I.; KUZNETSOVA, I. G.; SAZANOVA, A. L.; BELIMOV, A. A.; ANDRONOV, E. E.; CHIRAK, E. R.; OSLEDKIN, Y. S.; ONISHCHUK, O. P.; KURCHAK, O. N.; SHAPOSHNIKOV, A. I.; WILLEMS A. *Microvirga ossetica* sp. nov., a species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Vicia alpestris* Steven. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 67, p. 94-100, 2017.

SANTOS NETO, J. T., LUCAS, F. T., FRAGA, D. F., OLIVEIRA, L. F., PEDROSO NETO, J. C. Adubação nitrogenada, com e sem inoculação de semente, na cultura da soja. *FAZU em Revista*, v. 10, 2013.

SANTOS, J. W. M.; SILVA, J. F. da; FERREIRA, T. D. dos S.; DIAS, M. A. M.; FRAIZ, A. C. R.; ESCOBAR, I. E. C.; SANTOS, R. C.; LIMA, L. M.; MORGANTE, C. V.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Molecular and symbiotic characterization of peanut bradyrhizobia from the semi-arid region of Brazil. *Applied Soil Ecology*, v. 121, p. 177–184, 2017.

SARITA, S.; SHARMA, P. K.; PRIEFER, U. B.; PRELL, J. Direct amplification of rhizobial nodC sequences from soil total DNA and comparison to nodC diversity of root nodule isolates. *FEMS microbiology ecology*, v. 54, p. 1-11, 2005.

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

SARWAR, KREMER, Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, v 20, p. 282-285, 1994.

SAYYED, R. Z.; JAMADAR, D.D.; PATEL, P.R. Production of exo-polysaccharide by *Rhizobium* sp. *Indian Journal of Microbiology*, v. 51, p. 294-300, 2011

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987.

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, p. 102-108, 2013.

SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M. J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis*, p. 1–19, 2016.

- SOARES, A. L. L. Eficiência Agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas que nodulam feijão e caupi em Perdões, MG. 2004. 71p. Dissertação (Mestrado) Perdões, Minas Gerais. 2004, Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG
- SOUZA, R. de; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetic and Molecular. Biology*, v. 38, p. 401-419, 2015.
- STAUDT, A. K.; WOLFE, L. G.; SHROUT, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. *Archives of microbiology*, v. 194, p. 197-206, 2012.
- SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, v. 1, p. 222-227, 2001.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Quantitative survey of phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of grasses and legumes in the Amazon. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 12, p. 15-22, 1982.
- TAW, M. N.; LEE, H. I.; LEE, S.H.; CHANG, W. S. Characterization of MocR, a GntR-like transcriptional regulator, in *Bradyrhizobium japonicum*: its impact on motility, biofilm formation, and soybean nodulation. *Journal of Microbiology*, v. 1 p, 518-25, 2015.
- TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. *Brazilian Journal Microbiology*. v.41, 2010.
- VALENTINE, A. J.; KLEINERT, A.; BENEDITO, V. A. Adaptive strategies for nitrogen metabolism in phosphate deficient legume nodules. *Plant Science*, v. 256, p. 46-52. 2017.
- VUONG, H. B.; THRALL, P. H.; BARRETT, L. G. Host species and environmental variation can influence rhizobial community composition. *Journal of Ecology*, v. 105, p. 540-548, 2017.
- WANG, P.; ZHONG, Z.; ZHOU, J.; CAI, T.; ZHU, J. Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: Plant host interaction. *Archives of Microbiology*, v. 189, n. 5, p. 525–530, 2008.
- WIELBO, J.; PODLEŚNA, A.; KIDAJ, D.; PODLEŚNY, J.; SKORUPSKA, A. The diversity of pea microsymbionts in various types of soils and their effects on plant host productivity. *Microbes and Environments*, v. 30, p. 254-261. 2015.
- XAVIER, G.R. Estudo da ocupação nodular de genótipos de caupi (*Vigna unguiculata*) agrupados pela técnica de RAPD. 2000. 113p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2000
- XAVIER, G.R.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. de A.; RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), *Revista Caatinga*, v.19, p.25-33, 2007.
- YAN, J.; HAN, X. Z.; JI, Z. J.; LI, Y.; WANG, E. T.; XIE, Z. H.; CHEN, W. F. Abundance and diversity of soybean-nodulating rhizobia in black soil are impacted by land use and crop management. *Applied and environmental microbiology*, v. 80, p. 5394-5402. 2014.
- Yao, Z. Y.; Kan F. L.; Wang E.; Wei G. H.; Chen W. X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, n. 6 p. 2219-2230, 2002

ZHANG, Y. F.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; WANG, F. Q.; HAN, L. L.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *FEMS microbiology letters*, v. 4, p. 146-154, 2008.

ZILLI, J. É.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE FILHO, F. R.; RUMJANEK, N. G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 281-287, 2004.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Symbiotic efficiency of cowpea *Bradyrhizobium* strains in Cerrado soils. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.1, p. 811-818, 2006.

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